

“Evaluación del Estado Oxidativo y Salud Intestinal de Pollos de Carne en Respuesta a la Alimentación con Grasas Recicladas”

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR José Alfredo Choque López

BAJO LA DIRECCIÓN DE LAS DOCTORAS: María D. Baucells y Ana C. Barroeta

PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR EN VETERINARIA DESDE EL PROGRAMA DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL Y DE LOS ALIMENTOS

BELLATERRA 2008



LO DIFÍCIL TAMBIÉN PASARÁ

Hubo un momento en el que la noche parecía eterna y hoy todo eso parece tan lejano.

Hubo un momento en el que nada de lo que hacías resultaba, cuando de pronto apareció la respuesta.

Hubo un momento en el que dejaste de creer en el amor y de repente tu corazón, con más intensidad que nunca, lo encontró de nuevo.

Hubo un momento en el que por el desierto se esparcían tus palabras y hoy dan retoño sus semillas.

Hubo un momento en el que creíste que era lo peor que te podía pasar y hoy agradeces tu destino.

Hubo un momento en el que jurabas que no podrías pasar esa prueba y hoy es tan sólo un paso más.

Hubo un momento en el que creíste que no podías hacer algo y hoy te sorprendes de lo bien que lo haces.

Hubo un momento en el que los monstruos y los ogros intimidaban tu vida y hoy sonrías al ver cómo tus miedos engrandecían sus sombras.

Nunca olvides que la vida, renovada por la gracia de nuestro Creador, es más grande que tus miedos, y que tu fuerza en el Señor es mayor que tus dudas.

Aunque tu mente esté confundida, tu corazón siempre sabrá la respuesta, y con el tiempo, lo que hoy es difícil... ¡mañana será un tesoro!

"Todo lo puedo en Cristo que me fortalece" Filipenses 4:13

El presente trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del proyecto “Quality And Safety of Feeding Fats Obtained From Waste or Byproducts From the Food Chain” (Food-ct-2004-007020) y a la concesión de una beca predoctoral de la Agencia Española de Cooperación Internacional, Becas MAE-AECI

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios, porque me ha permitido cumplir mis sueños y me ha dado la posibilidad de acceder a una beca, gracias a la cual he conocido al mejor grupo de trabajo, no solo por la calidad académica y científica, sino también por la calidad humana de sus integrantes. ¡No me gustaría estar en otro lugar!!

A mis doctoras favoritas, Ana Cris y Mariola (que casualmente son mis directoras) por su paciencia y por haber creído en mi, poniendo en mis manos un proyecto de tal envergadura. Gracias no solo por su guía y enseñanza, sino también por ser algo así como mis "jóvenes mamás" (jóvenes para tener un hijo tan viejo jjejeje) en mi incursión por el mundo de las ciencias. "...aprendí a caminar, espero mantenerme en pie solo y empezar a correr.."

(Ahora viene lo duro, porque si me olvido de alguien....lo pasaré mal)

Josep (gran jefe), Francisco, Roser (¡será posible..!! y a la pequeña Aina Kai desde luego), Susana (¡Doctora!, parece becaria por lo joven que es). Cuando crezca quiero ser como ustedes, no se imaginan su aporte en mi formación; a veces con solo oírles hablar ya aprendía algo nuevo, gracias.

Papá pitufo o sea "Yo" y "..Srta. Rottenmeyer..", al igual que las jefas, creo que con ustedes he aprendido más cosas, desde el principio y aún ahora, hay que ser paciente para aguantarme he...muchísimas gracias.

Oolgaaaaaa (haber...) que bueno que estabas ahí, que si no el laboratorio habría sido para mí, algo así como un laberinto, donde no sabía encontrar nada. Tal vez no te lo decimos, pero te queremos...

Los que estaban, Carol (Carolinaaaa), Juan Carlos (rey de espan...), Fredy (saludos a Carmen y la peque), Marisol, Ceci (muy correcta), Eva (siempre me sorprendí de su energía), Alba (eres un bálsamo para tus amigos), Gabri (hombre, haber cuando le echamos un partido de boley..), Montse (creo que siempre tenías la respuesta), Achille

(estoy convencido que la gente que más sabe es la más humilde), Leo (este es un petardo), Sabrina (sin chan, jjeje), Joseane (y por extensión a Josep María), Mauricius, Caio, André, Rafa y Tisci (haber cuando comemos torta), Nuria (que apañá), Mara.. de Deu.., Stefany, y no podía faltar Muzaffer (mi gran amigo turco, malabac malá..).

Los que están, Sandricapel (viva Motrimérica), Rosa (perelló.. no cambies..), Marta (siempre fashion), Gemma (inspiras paz cuando hablas), Hugo (muchachoo..), Francesc (largo, jjej hemos andao en varias cosas he), Ramón (chico majo de Manlleu, no dejes el nutri news), David (Dr. Solá, habría sido bueno conocerte antes) y Somaye (aunque no te conozco mucho).

A todos, gracias por vuestra compañía, por haber hecho llevadera la estancia y compartir buenos y mejores momentos, también he aprendido muchas cosas con ustedes he...

A los diferentes "Partners" del proyecto Feeding Fats Safety. Es bueno trabajar con gente que sabe... Al personal de la granja experimental de la UAB, en especial a Ricard, al personal de informática, Julia.., me has salvado el ordenador varias veces. A las señoras secretarias del departamento en especial a Julia y Laura, gracias, la cosa administrativa es mejor y más eficiente con personas así.

A mis hermanos en la fé, miembros de mí Iglesia Baptista de Cerdanyola y a los Gedeones Internacionales. ¡Tan lejos de casa he encontrado una familia!

Y no es para menos, muchísimas gracias a los culpables de que yo esté aquí, es decir a mis padres Pablo y Yola y a mis hermanos Cesar y Jeanette, Mary, Sandra y Ángela. Al pequeño Cesarín (Wichi) y a los abuelos Justino y Antonia. No sé de otras familias, pero esta familia es lo mejor, por unidad y por apoyo mutuo, saben hacer que los sueños se conviertan en realidad y siempre están ahí donde los dejé. Si no fuera por ellos no sería lo que soy o lo que puedo llegar a ser.

¡¡Que Dios les bendiga siempre!!!!

Walkiria...has traído luz a mi vida

Se llevaron a cabo cuatro experimentos con el objetivo de evaluar el efecto de la utilización de grasas alteradas o contaminadas recicladas de la alimentación humana, sobre el rendimiento productivo y la salud de pollos de carne, Para ello se utilizaron los siguientes indicadores: incidencias y productividad durante el período experimental; niveles de oxidación en sangre (tasa de hemólisis y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARs); variación de la microbiota intestinal por t-RFLP; actividad microbiana fermentativa (AGVs) y presencia de microorganismos patógenos (coccidias), además de variaciones en la histomorfología intestinal (longitud de vellosidades, profundidad de criptas y conteo de linfocitos intraepiteliales).

Los tratamientos dietéticos fueron elaborados en la planta de fabricación de la Universidad Politécnica de Valencia sobre una ración base constituida de maíz y soja, suplementada con un 6 % de la grasa reciclada y se diferenciaban según el nivel de alteración alto (H) y bajo (L). De esta manera, los cuatro experimentos contenían los siguientes niveles de alteración o contaminación: **Experimento T**, Ácidos grasos *trans* (HT=12,40 % y LT=0,65 %); **Experimento D**, dioxinas y PCBs (HC=28,80 pg y LC=9,64 pg TEQ/g PCDD/Fs+DL-PCBs de aceite); **Experimento P**, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HP=5,291 ng HAPs/g y LP<18 ngHAPs/g de aceite) y **Experimento O**, productos de oxidación (HO=6,61 % Polímeros y 67,43 p-anisidina y LO=0,35 % Polímeros y 2,74 p-anisidina).

En cada experimento se utilizaron 80 pollos hembra de la estirpe ROSS 308 de un día de edad, alojadas en 8 corrales (4 /tratamiento) de 10 aves cada uno. Los distintos controles, así como la toma de muestras se realizó en sacrificios seriados a 9, 13, 21 y 37 días de vida de las aves y en el caso de las muestras de excreta (determinación del número de coccidias) a 18 y 37 días de vida.

Rendimientos Productivos e Incidencias Observadas Durante el Período Experimental.- Un factor común entre las cuatro pruebas experimentales fue la ausencia de incidencias y mortalidad de las aves. De igual manera, no se observaron lesiones patológicas en los exámenes *post-mortem*, que permitan suponer un efecto negativo en la respuesta de los animales, como consecuencia de los contaminantes o productos de alteración a los que fueron expuestos. La productividad de los animales, no fue afectada por los tratamientos experimentales, excepto en el caso de la primera prueba experimental (T), en la que los animales alimentados con la dieta que contenía el nivel de alteración

bajo (LT), presentaron un mejor índice de transformación alimenticia ($P=0,003$), que los animales alimentados con la dieta HT. Entre experimentos, las ganancias de peso (GMD) de las pruebas experimentales D y P, superiores ($P=0,022$) a las obtenidas en las pruebas T y O, explican las diferencias estadísticas significativas ($P=0,025$), observadas en el peso vivo final de los animales, superiores (próximos a 1900 g) en los experimentos D y P, que los observados en los experimentos T y O (próximos a 1800 g).

Tasa de hemólisis y valores TBARs en muestras de sangre.- Los tratamientos experimentales no generaron diferencias estadísticamente significativas, salvo en el caso del experimento T, en el que un mayor grado de saturación de la grasa del tratamiento HT, se tradujo en una mayor fragilidad de la membrana de los eritrocitos ($P=0,002$), en comparación a su homólogo LT. El efecto de la edad, se tradujo en diferencias estadísticamente significativas ($P<0,001$), entre animales jóvenes (9 días) y animales de mayor edad (37 días de vida). A medida en que el animal crece, aumenta la resistencia de los eritrocitos y la integridad de la membrana mejora. Este hecho fue notorio en los experimentos D, P y O que, partiendo de elevadas tasas de hemólisis a 9 días de vida (entre 45 y 65 %), presentaron menores tasas de hemólisis a 37 días de vida (entre 5 y 15 %). Pero en el experimento T, también se observó una mejora de la integridad de la membrana con la edad aunque de menor magnitud (de 60 % a 28 %). Con relación a los valores TBARs, el análisis realizado al final del periodo experimental a los 37 días de vida, permitió establecer diferencias estadísticamente significativas entre los experimentos ($P<0,01$), en tanto que los tratamientos, prácticamente no demostraron efecto. Una mayor concentración de productos secundarios de oxidación fue establecida en el experimento D (dioxinas y PCBs), cuyos valores sobrepasaron los 0,400 nmol TBARs/ml, en contraste, con los experimentos T, P y O que alcanzaron valores próximos a 0,220 nmol TBARs/ml de sangre.

Microbiota intestinal (contenido cecal).- A. Por t-RFLP.- La evaluación de los dendogramas obtenidos en los cuatro experimentos, demostró que la composición de la flora microbiana no fue influenciada por los tratamientos. Por el contrario, los microorganismos o grupos de microorganismos presentes en cada muestra, mostraron porcentajes de homología relativamente elevados entre animales de la misma edad (esto fue más notorio a los 37 días de vida). La proporción de microorganismos tras la restricción enzimática (enzima HhaI) muestra una mayor abundancia para aquellos fragmentos comprendidos entre 70 y 260 bp (pares de bases), dichos fragmentos estaban presentes en todos los animales independientemente del tratamiento y edad estudiados e incluyen especies o grupos bacterianos considerados como grupos mayoritarios (entre

las que se encuentran *Bacteroides* y *Flavobacterium*). Paralelamente, las muestras fueron procesadas con otra enzima de restricción, la *RsaI*, con la finalidad de ayudarnos a identificar más grupos bacterianos, en este caso, se observó una mayor presencia de grupos microbianos a partir de los 400 bp, hasta los 921 bp. La restricción realizada con el enzima *RsaI*, podría servir de complemento a los resultados obtenidos con el enzima *HhaI*, en el estudio de un mayor espectro de bacterias presentes en las muestras analizadas. Los resultados no son excluyentes, sino complementarios. Con relación a la biodiversidad microbiana (riqueza de picos), ni la interacción entre variables (edad x tratamiento) ni la presencia de niveles alto y bajo de contaminantes o productos de alteración, provocaron diferencias de significación estadística. No obstante, se observó un aumento estadísticamente significativo ($P < 0,001$), en el número de picos conforme aumentaba la edad en los experimentos D y P, que no fue evidente en los experimentos T y O.

B. Actividad microbiana: producción de AGVs.- La concentración total de AGVs en las muestras de contenido cecal de los cuatro experimentos no fue afectada por los tratamientos. De manera general la concentración total no superó los 90 $\mu\text{mol/g}$ de muestra analizada, de hecho, el segundo experimento (D), presentó las concentraciones más bajas, próximas a 50 $\mu\text{mol/g}$. El contenido en ácido láctico de las muestras cecales fue muy variable en los distintos experimentos y muestras analizadas. La concentración de lactato, fue influenciada significativamente por los tratamientos ($H > L$) en los experimentos D ($P = 0,002$) y O ($P < 0,1$), no observándose diferencias estadísticas significativas en los otros dos experimentos (T y P). A pesar de las ligeras diferencias observadas entre los 4 experimentos, la relación acético: propiónico: butírico, fue bastante similar, situándose entre 70 y 74 % para el caso del ácido acético, 9 y 12 % para el ácido propiónico y 12 a 14 % para el ácido butírico. En general, la relación acético > propiónico < butírico fue constante entre las 4 pruebas experimentales. El efecto de la edad en este parámetro fue muy variable.

C. Microorganismos patógenos: Presencia de coccidias en excreta.- A pesar de que la determinación de la presencia de coccidias de *Eimeria* en la excreta de las aves fue la única técnica analítica en la que se observó un claro efecto de los tratamientos ($P = 0,001$), estos no sobrepasaron los niveles de concentración considerados peligrosos desde el punto de vista epidemiológico y no se acompañaron de manifestaciones clínicas. Las diferencias estuvieron orientadas a un menor conteo de OPGs (ooquistes por gramo de excreta), del tratamiento bajo (L) en los experimentos D, P y O, que su homólogo H (nivel alto). En general, el efecto de la edad fue estadísticamente significativo ($P < 0,001$) en las cuatro pruebas experimentales. La concentración de OPGs, aumentó con la edad.

Histomorfología del Tracto Gastrointestinal (secciones de yeyuno).- Tanto la ausencia de diferencias significativas provocadas por los tratamientos en las cuatro pruebas experimentales, como la ausencia de lesiones en el epitelio intestinal observada en el examen post-mortem, indican que el nivel de alteración o contaminación estudiado, no tienen un efecto directo sobre estos parámetros. Por el contrario, la edad tuvo un efecto significativo, traducido en un general aumento ($P<0,001$) de la longitud de la vellosidades (LV), una disminución ($P<0,001$) en la profundidad de criptas (PC) y un descenso ($P<0,001$) en la proporción de linfocitos intraepiteliales (IEL). Con relación al cociente V/C (relación vellosidad/cripta), en todos los experimentos se alcanzaron los mayores cocientes a 21 días de vida ($P<0,001$), que a los 9 días de vida de las aves.

En conclusión, el nivel de alteración o contaminación estudiado, no presenta un claro efecto sobre los indicadores de salud o productividad analizados. Por el contrario, con la edad del ave aumenta la resistencia a la hemólisis de los eritrocitos, la complejidad de la microbiota cecal y en paralelo, incrementa la longitud de las vellosidades acompañado de un descenso proporcional de la profundidad de criptas y del número de linfocitos intraepiteliales.

ÍNDICE GENERAL Pág.

- 1. INTRODUCCIÓN 1**
- 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 5**
 - 2.1. EL AVE Y SU DESARROLLO 7**
 - 2.1.1. DESARROLLO DEL TRACTO GASTROINTESTINAL 7
 - 2.1.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y DE ABSORCIÓN 14
 - 2.1.3. ECOSISTEMA MICROBIANO 16
 - 2.2. UTILIZACIÓN DE MATERIAS GRASAS EN ALIMENTACIÓN AVIAR: GRASAS Y ACEITES RECICLADOS 22**
 - 2.2.1. COMPUESTOS DE DEGRADACIÓN QUÍMICA 26**
 - 2.2.1.1. Ácidos Grasos *Trans* 26
 - 2.2.1.2. Productos de Oxidación 35
 - 2.2.2. CONTAMINACIÓN ORGÁNICA DE LAS GRASAS 44**
 - 2.2.2.1. Dioxinas y Policlorobifenilos 44
 - 2.2.2.2. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) 56
 - 2-A. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 67**
- 3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL 85**
- 4. MATERIALES Y MÉTODOS 89**
 - 4.1. ANIMALES E INSTALACIONES 91
 - 4.2. DIETAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL 92
 - 4.3. CONTROLES DE PRODUCCIÓN 94
 - 4.4. SACRIFICIO E INSPECCIÓN POST-MORTEM 94
 - 4.5. RECOGIDA DE MUESTRAS 95
 - 4.5.1. SANGRE 96
 - 4.5.2. CONTENIDO CECAL 96
 - 4.5.3. EXCRETA 96
 - 4.5.4. SECCIONES DE INTESTINO PARA HISTOMORFOLOGÍA 96
 - 4.6. DETERMINACIONES ANALÍTICAS 97

4.6.1.	ANÁLISIS DEL PIENSO	97
4.6.2.	TASA DE HEMÓLISIS	98
4.6.3.	NIVEL DE OXIDACIÓN EN SANGRE (TBARS)	99
4.6.4.	PERFIL MICROBIANO POR t-RFLP	99
4.6.5.	PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES	100
4.6.6.	TÉCNICA DE McMASTER PARA LA DETERMINACIÓN DE COCCIDIAS	101
4.6.7.	HISTOMORFOLOGÍA	101
4.6.8.	OTRAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS	102
4.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	102
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
5.1.	PRIMERA PRUEBA EXPERIMENTAL: “Evaluación de la presencia de ácidos Grasos <i>Trans</i> (T)”	107
5.1.1.	RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS E INCIDENCIAS OBSERVADAS DURANTE EL PERÍODO EXPERIMENTAL	108
5.1.2.	TASA DE HEMÓLISIS Y VALORES TBARS EN MUESTRAS DE SANGRE	110
5.1.3.	MICROBIOTA GASTROINTESTINAL (contenido cecal)	112
5.1.4.	HISTOMORFOLOGÍA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL (secciones de yeyuno)	119
5.2.	SEGUNDA PRUEBA EXPERIMENTAL: “Evaluación de la presencia de Policloro-dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), Policloro-dibenzo-furanos (PCDFs) y Policloro-bifenilos (PCBs) (D)”	121
5.2.1.	RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS E INCIDENCIAS OBSERVADAS DURANTE EL PERÍODO EXPERIMENTAL	122
5.2.2.	TASA DE HEMÓLISIS Y VALORES TBARS EN MUESTRAS DE SANGRE	123
5.2.3.	MICROBIOTA GASTROINTESTINAL (contenido cecal)	126
5.2.4.	HISTOMORFOLOGÍA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL (secciones de yeyuno)	132
5.3.	TERCERA PRUEBA EXPERIMENTAL: “Evaluación de la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAPs (P)”	135

5.3.1.	RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS E INCIDENCIAS OBSERVADAS DURANTE EL PERÍODO EXPERIMENTAL	136
5.3.2.	TASA DE HEMÓLISIS Y VALORES TBARs EN MUESTRAS DE SANGRE	138
5.3.3.	MICROBIOTA GASTROINTESTINAL (contenido cecal)	140
5.3.4.	HISTOMORFOLOGÍA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL (secciones de yeyuno)	145
5.4.	CUARTA PRUEBA EXPERIMENTAL: “Evaluación de la presencia de productos de oxidación (O)”	147
5.4.1.	RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS E INCIDENCIAS OBSERVADAS DURANTE EL PERÍODO EXPERIMENTAL	148
5.4.2.	TASA DE HEMÓLISIS Y VALORES TBARs EN MUESTRAS DE SANGRE	150
5.4.3.	MICROBIOTA GASTROINTESTINAL (contenido cecal)	152
5.4.4.	HISTOMORFOLOGÍA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL (secciones de yeyuno)	157
6.	ANÁLISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS E IMPLICACIONES	161
6.1.	RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS E INCIDENCIAS OBSERVADAS DURANTE EL PERÍODO EXPERIMENTAL	163
6.2.	TASA DE HEMOLISIS Y VALORES TBARs	165
6.3.	MICROBIOTA GASTROINTESTINAL	167
6.4.	HISTOMORFOLOGIA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL	177
6.5.	IMPLICACIONES	179
7.	CONCLUSIONES	183
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	187
9.	ANEXOS	203

ÍNDICE DE TABLAS Pág.

Tabla 2.1. Diversidad bacteriana del Tracto Gastrointestinal de pollos, en función de la variación del pH y el tiempo medio de retención (TMR) de la digesta en la fase sólida. **18**

Tabla 2.2. Tipos y fuentes de grasa. **22**

Tabla 2.3. Ácidos grasos de algunas grasas recicladas. **23**

Tabla 2.4. Puntos de fusión de ácidos grasos y sus isómeros. **29**

Tabla 2.5. Composición y características químicas de las grasas hidrogenadas. **31**

Tabla 2.6. Principales radicales libres implicados en las reacciones de oxidación lipídica. **37**

Tabla 2.7. Productos de la oxidación térmica de las grasas de freiduría. **39**

Tabla 2.8. «**Sección 5. Dioxinas.**» Suma de policlorodibenzo-*para*-dioxinas (PCDD), policlorodibenzofuranos (PCDF) y policlorobifenilos (PCB) expresada en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (EQT-WHO), utilizando los factores de equivalencia de toxicidad de la misma organización (Reglamento (CE) N° 199/2006, 2006). **46**

Tabla 2.9. Posibles congéneres de dioxinas y PCBs, según el n° de átomos de Cl. **48**

Tabla 2.10. Fuentes de generación de dioxinas. **48**

Tabla 2.11. Factores de equivalencia tóxica (TEFs), establecidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO). **54**

Tabla 2.12. Principales manifestaciones clínicas causadas por las dioxinas en los seres vivos. **55**

Tabla 2.13. Hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en diferentes muestras analizadas. **61**

Tabla 2.14. Factor de Toxicidad equivalente (TEF) para los HAPs más conocidos. **64**

Tabla 2.15. Capacidad carcinogénica, genotóxica y mutagénica de algunos HAPs. **65**

Tabla 4.1. Ingredientes y composición nutricional estimada del pienso base empleado en los cuatro ensayos. **92**

Tabla 4.2. Nivel de alteración o contaminación de las grasas utilizadas en los 4 experimentos. **94**

Tabla 4.3. Días de control y número de muestras recogidas para las determinaciones analíticas realizadas en los 4 ensayos experimentales. **95**

Tabla 4.4. Valoración de la composición nutricional de los piensos experimentales. **97**

Tabla 5.1. Perfil de ácidos grasos de las materias grasas de la primera prueba experimental (T). **107**

Tabla 5.2. Resultados productivos de la prueba experimental T. **109**

Tabla 5.3. Perfil de Ácidos grasos de cadena corta (%). **117**

Tabla 5.4. Número de linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos. **120**

Tabla 5.5. Perfil de ácidos grasos de las grasas incluidas en el segundo experimento (D). **121**

Tabla 5.6. Resultados productivos de la prueba experimental D. **123**

Tabla 5.7. Perfil de ácidos grasos de cadena corta. **131**

Tabla 5.8. Numero de linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos. **133**

Tabla 5.9. Perfil de ácidos grasos de las materias grasas incluidas en el tercer experimento (P). **135**

Tabla 5.10. Resultados productivos de la prueba experimental P. **138**

Tabla 5.11. Perfil de ácidos grasos de cadena corta. **143**

Tabla 5.12. Número de linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos. **146**

Tabla 5.13. Perfil de ácidos grasos de las materias grasas de la cuarta prueba experimental (O). **147**

Tabla 5.14. Resultados productivos de la prueba experimental O. **149**

Tabla 5.15. Perfil de ácidos grasos de cadena corta. **156**

Tabla 5.16. Numero de linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos. **159**

Tabla 6.1. Resumen de resultados productivos de las cuatro pruebas experimentales. **164**

Tabla 6.2. Descripción de las especies microbianas identificadas como microbiota habitual del pollo, por otros autores. **170 - 171**

Tabla 6.3. Riqueza (número) de picos de las cuatro pruebas experimentales, obtenidas tras la restricción enzimática con el enzima Hha I (t-RFLP). **174**

Tabla 6.4. Parámetros histológicos de secciones de yeyuno-ileon de pollos a 9 y 21 días de vida, determinados en las cuatro pruebas experimentales. **178**

ÍNDICE DE FIGURAS Pág.

Figura 1.1. Principales modificaciones que pueden afectar a los componentes característicos de las materias grasas. **3**

Figura 2.1. Órganos del tracto gastrointestinal del pollo de carne adulto. **8**

Figura 2.2. Media \pm SEM de los pesos relativos (gramos/100 g de peso corporal) del proventrículo (A), molleja (B), intestino delgado (C) y páncreas (D) observados en diferentes días durante la última fase del desarrollo del embrión y el crecimiento temprano de pavos. **9**

Figura. 2.3. A: Pollo de 1 día de edad, vellosidades en forma de dedo. B: Pollo de 21 días de edad, vellosidades con un patrón regular de zig-zag. **12**

Figura 2.4. Secciones de criptas intestinales de yeyuno en diferentes estados de desarrollo. **13**

Figura 2.5. Media \pm SEM de las actividades totales de amilasa (A), lipasa (B), tripsina (C), pancreáticas y maltasa (D) del yeyuno. **15**

Figura. 2.6. Composición de la flora bacteriana del (A) ileon y (B) ciego de pollos de carne, determinado por secuenciación del 16S rDNA de una librería formada por 1.230 clones. **20**

Figura 2.7. Configuración de los dobles enlaces de un ácido graso. **27**

Figura 2.8. Estructura química del ácido linoleico (*cis*-9, *cis*-12) y del isómero ácido linoleico conjugado (*cis*-9, *trans*-11). **28**

Figura 2.9. Vías de hidrogenación del ácido linoleico en el rumen. **30**

Figura. 2.10. Progresión de la oxidación de las grasas. **36**

Figura 2.11. Fases en que se produce la autooxidación. **37**

Figura 2.12. Estructura del Malondialdehído (MDA). **39**

Figura 2.13. Estructura química de las principales, dioxinas, dibenzofuranos, y PCBs. **47**

Figura 2.14. Biomagnificación de la concentración de dioxinas en la cadena trófica. **49**

Figura 2.15. Posibilidades de entrada de las dioxinas en la cadena alimentaria. **50**

Figura 2.16. Vías de contaminación en las cadenas tróficas humana y animal. **50**

- Figura 2.17.** Concentración de la suma de 2, 3, 7, 8-PCDD/F congéneres, en base a la materia fresca (wet weight basis), encontrada en la excreta de aves durante el periodo de exposición de 12 semanas. **53**
- Figura 2.18.** Efectos de la toxicidad aguda de las dioxinas (cloroacné e hiperpigmentación). **56**
- Figura 2.19.** Efectos de la toxicidad crónica de las dioxinas (alteraciones teratogénicas). **56**
- Figura 2.20.** Estructura química de algunos HAPs, más representativos. **58**
- Figura 2.21.** Distribución de HAPs en órganos y tejidos de cerdo. **62**
- Figura 5.1.** Tasa de hemólisis. **111**
- Figura 5.2.** Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). **112**
- Figura 5.3.** Dendograma que presenta la similitud entre bandas patrón obtenidas por t-RFLP. **114**
- Figura 5.4.** Riqueza de picos. **115**
- Figura 5.5.** Ácidos grasos de cadena corta (SCFA) totales y concentración de ácido láctico. **117**
- Figura 5.6.** Coccidias en excreta. **118**
- Figura 5.7.** Longitud de vellosidades y profundidad de criptas. **119**
- Figura 5.8.** Tasa de hemólisis. **125**
- Figura 5.9.** TBARs en muestras de sangre. **126**
- Figura 5.10.** Dendograma que presenta la similitud entre bandas patrón obtenidas por t-RFLP. **128**
- Figura 5.11.** Riqueza de picos. **129**
- Figura 5.12.** Ácidos grasos de cadena corta (SCFA) totales y concentración de ácido láctico. **130**
- Figure 5.13.** Coccidias en excreta. **132**
- Figura 5.14.** Longitud de vellosidades y profundidad de criptas. **133**
- Figura 5.15.** Tasa de hemólisis. **139**
- Figura 5.16.** Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). **139**
- Figure 5.17.** Dendograma que presenta la similitud entre bandas patrón obtenidas por t-RFLP. **141**

- Figura 5.18.** Riqueza de picos. 142
- Figura 5.19.** Ácidos grasos de cadena corta (SCFA) totales y concentración de ácido láctico. 143
- Figura 5.20.** Coccidias en excreta. 144
- Figura 5.21.** Longitud de vellosidades y profundidad de criptas. 145
- Figura 5.22.** Tasa de hemólisis y Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) en muestras de sangre. 152
- Figura 5.23.** Dendograma que presenta la similitud entre bandas patrón obtenidas por t-RFLP. 153
- Figura 5.24.** Riqueza de picos. 154
- Figura 5.25.** Ácidos grasos de cadena corta (SCFA) totales y concentración de ácido láctico. 155
- Figura 5.26.** Coccidias en excreta. 157
- Figura 5.27.** Longitud de vellosidades y profundidad de criptas. 158
- Figura 6.1.** Tasa de hemólisis. 165
- Figura 6.2.** Valores TBARs en muestras de sangre (expresado en nmol/ml de sangre). 166
- Figura 6.3.** Fragmentos terminales obtenidos tras la restricción enzimática (enzima HhaI). 169
- Figura 6.4.** Fragmentos terminales obtenidos tras la restricción enzimática (enzima RsaI). 172
- Figura 6.5.** Presencia de coccidias en excreta observada en las cuatro pruebas experimentales. 177
- Figura 6.6.** Relación Vellosidad/cripta (V/C) de las cuatro pruebas experimentales. 178
- Figura 6.7.** Mucosa intestinal. 179

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AG: Ácidos Grasos

AGE: Ácidos Grasos Esenciales

AGI: Ácidos Grasos Insaturados

AGPI: Ácidos Grasos Poli Insaturados

AGS: Ácidos Grasos Saturados

AGT: Ácidos Grasos *Trans*

AGVs: Ácidos Grasos Volátiles

AhR: Aryl Hydrocarbon Receptor

ANOVA: Análisis de Varianza

CLA: Ácido Linoleico Conjugado

CMD: Consumo Medio Diario

DGGE: Denaturing Gradient Electrophoresis Inpolyacrylamide Gel

DNA: Desoxyribonucleic Acid

FD: Fibra Dietética

FFS: Feeding Fats Safety

GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue

GMD: Ganancia Media Diaria

HAPs: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

HDL: High Density Lipoprotein

IEL: Linfocitos Intraepiteliales

IT: Índice de Transformación Alimenticia

LDL: Low Density Lipoprotein

MDA: Malondialdehído

MUFA: Mono Unsaturated Fatty Acids

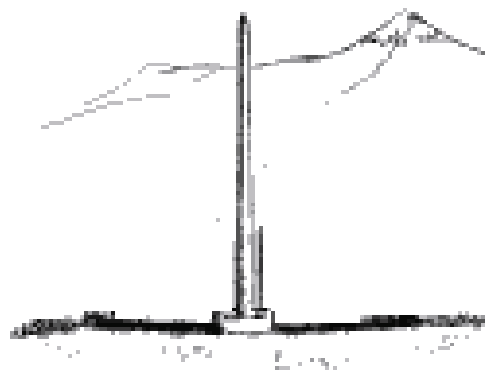
NRC: National Research Council

OPG: Ooquistes por Gramo de Excreta

PCBs: Policloro Bifenilos

PCDD: Poly Cloro Dibenzo-P-Dioxinas
PCDF: Policlorodibenzofuranos
PCR: Polimerase Chain Reaction
PNA: Polisacáridos No Amiláceos
PUFA: Poli Unsaturated Fatty Acids
PV: Peso Vivo
rDNA: Ribosomal Desoxyribonucleic Acid
RNA: Ribonucleic Acid
SCFA: Ácidos grasos de cadena corta (AGVs)
TBARs: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico
TCDD: Tetra Cloro Dibenzo-p-Dioxinas
TEFs: Toxic Equivalency Factors
TEI: Total Energy Intake
TEQ: Toxiequivalentes
TGI: Tracto Gastro Intestinal
TMR: Tiempo Medio de Retención
t-RFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorfism
UFC: Unidades Formadoras de Colonias
V/C: Relación Velloalidad / Cripta
VLDL: Very Low Density Lipoprotein
WHO: World Health Organization

1. INTRODUCCIÓN



Tanto las grasas como los aceites que utilizamos en alimentación animal provienen de lípidos, mayoritariamente de reserva, de animales y vegetales, y están compuestos principalmente por triglicéridos. Los triglicéridos contienen por unidad de peso 2,5 veces más energía bruta (38 kJ/g, 9 kcal/g aproximadamente) que los hidratos de carbono y las proteínas.

Utilizadas en la fabricación de los piensos, estas materias grasas son de distinta procedencia y tienen una composición muy variable. Pueden contener compuestos lipídicos insaponificables y compuestos no lipídicos (agua, impurezas, contaminantes) que además de no aportar la energía deseada pueden tener efectos perjudiciales.

Dependiendo de la forma en que han sido procesadas o almacenadas, las grasas sufrirán modificaciones en su estructura y composición, generando compuestos que pueden tener implicaciones nutricionales o, incluso, patológicas. Las principales alteraciones que afectan a las grasas se presentan en la Figura 1.1. Las más importantes se desglosarán con detalle en la revisión bibliográfica que sigue a esta introducción.

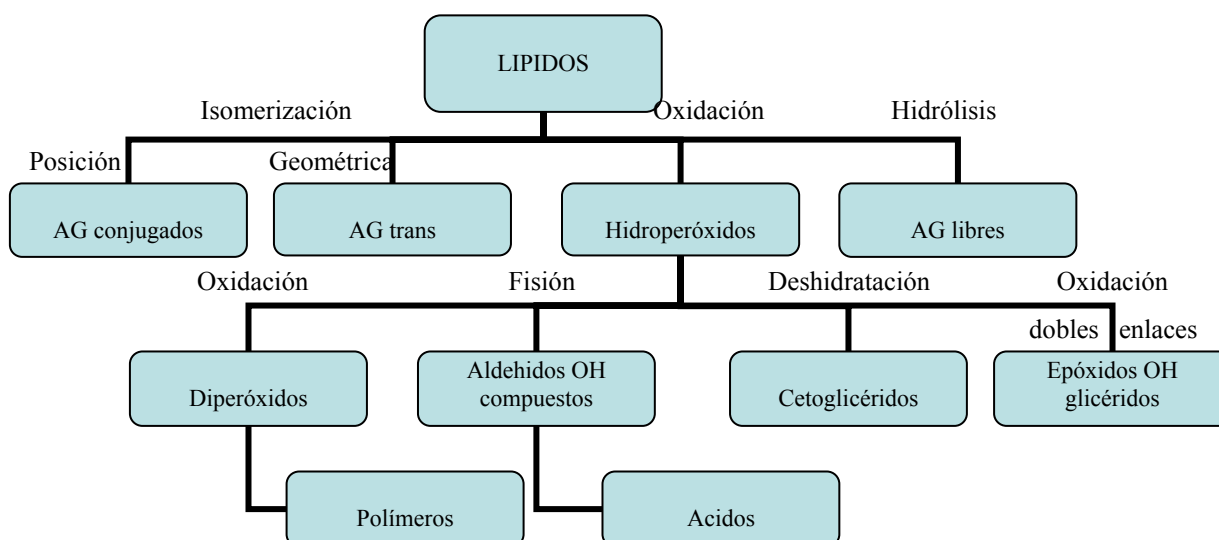


Fig. 1.1. Principales modificaciones que pueden afectar a los componentes característicos de las materias grasas (Codony, 1991)

Algunas de las fuentes grasas utilizadas en la alimentación animal son co- o sub-productos de la cadena alimentaria humana (se incluyen las materias grasas recicladas), y pueden presentar un contenido nada despreciable de sustancias perjudiciales como son los ácidos grasos *trans*; además, pueden estar asociadas a contaminantes como las dioxinas o compuestos coplanares, entre otros. Estas modificaciones afectan directamente a las cualidades nutricionales de las

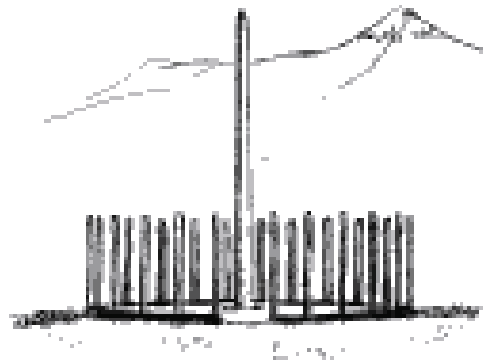
materias grasas, disminuyendo su aporte en la alimentación de los animales o provocando problemas relativos a seguridad alimentaria.

De esta manera, las materias grasas incorporadas en los piensos, en concreto las materias grasas recicladas, han despertado el interés de las autoridades sanitarias ya que se han visto involucradas en incidentes relacionados con la salud de los consumidores como el caso de Seveso en Italia o el incidente de los pollos belgas (Bernard *et al.*, 2002). En respuesta, se han generado una serie de iniciativas de investigación y control, que han terminado con la publicación de diversas normativas o directivas como la 75/442/EEC relativa al empleo de productos reciclados, la resolución 176/03 del 25 de junio de 1987 relativa a la seguridad del consumidor, o inclusive, normas específicas para el control de contaminantes como las dioxinas (Directiva 2006/13/CE, 2006).

Sin embargo, la mayoría de los compuestos perjudiciales que pueden estar presentes en las materias grasas no se han estudiado suficientemente. No están bien establecidos cuales podrían ser los niveles de seguridad para su empleo o el impacto que podrían tener tanto sobre el animal que los consume como sobre la transferencia al producto final.

Al respecto, a finales del año 2004, se inició el proyecto *"Quality and safety of feeding fats obtained from waste or byproducts from the food chain"* (Food-ct-2004-007020), que está orientado a responder algunos de estos interrogantes. El presente trabajo de investigación forma parte de este proyecto y tiene por objeto el estudio del efecto del empleo de materias grasas recicladas sobre los parámetros productivos y la salud de pollos de carne, tanto a nivel general (sistémico) como sobre el tracto gastrointestinal, además de su influencia sobre la dinámica poblacional de su ecosistema microbiano. Para ello, se han llevado a cabo cuatro pruebas experimentales, en las cuales se controlaron las variables productivas y se procesaron muestras de sangre, contenido cecal, tejido intestinal y excreta de las aves.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



La siguiente revisión bibliográfica presenta, inicialmente, el desarrollo del tracto digestivo aviar hasta constituirse en una estructura anatómica funcional. En paralelo, se describe la paulatina colonización por microorganismos desde el nacimiento hasta su estabilización en el aparato gastrointestinal. A partir de aquí, podremos determinar las modificaciones o alteraciones patológicas inducidas por la dieta. No debemos olvidar que la dinámica poblacional de los microorganismos gastrointestinales puede verse afectada por la digesta. Posteriormente, se presenta una breve descripción de algunos de los compuestos de alteración y contaminantes que pueden presentarse en las grasas de uso convencional en alimentación animal y que son objeto de la presente memoria.

Al respecto del uso de grasas recicladas, la conveniencia o no de su utilización en la alimentación animal, como alternativa ante su destrucción o vertido al medio ambiente, es otra de las causas que motivan la determinación de sus características y de los posibles efectos sobre el animal que las consume y, en concreto, sobre el alimento producido. Se ha demostrado que algunos compuestos químicos presentes en estas materias grasas (dioxinas y PCBs o productos de oxidación) pueden ser transferidos al producto final y, por tanto, pueden tener implicaciones negativas en el consumidor (Kim *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 1989a). A su vez, la salud y los rendimientos productivos de los animales que las consumen pueden también ser afectados (Chin Sou Fei, 1995; Hamilton y Kirstein, 2003).

2.1. EL AVE Y SU DESARROLLO

2.1.1. DESARROLLO DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

La longitud y composición del tracto gastrointestinal (TGI) de las aves varía de acuerdo al tipo de dieta que consumen. En el caso de las aves de corral predominantemente granívoras, en especial de los pollos de engorde, el rápido desarrollo de las actuales estirpes genéticas exige también un rápido desarrollo de su tracto digestivo. Este proceso se inicia antes de la eclosión y concluirá a las pocas semanas de vida del ave. La figura 2.1., presenta las diferentes secciones del tracto gastrointestinal del pollo de carne adulto.

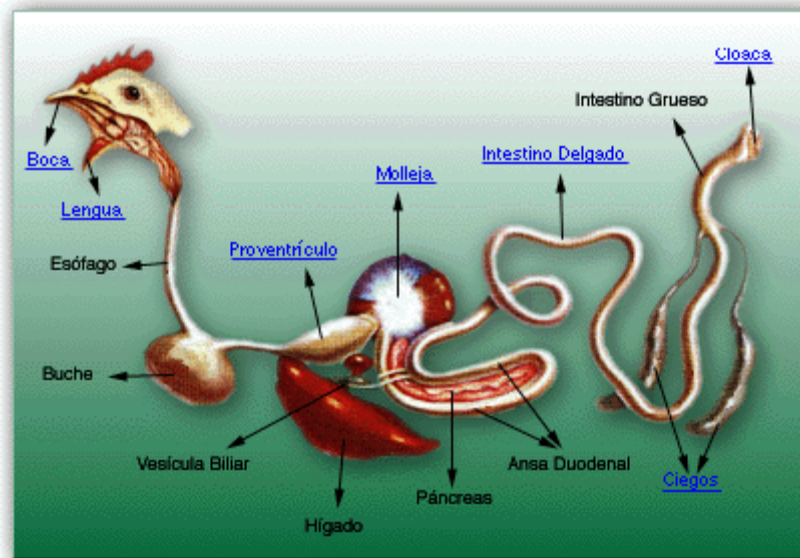


Figura 2.1. Órganos del tracto gastrointestinal del pollo de carne adulto

Los huevos fértiles pasan por un proceso de incubación cuya duración es de 21 días, período durante el cual los órganos del embrión se desarrollan paralelamente a su masa corporal. Sin embargo, el desarrollo corporal en el último tercio de la fase embrionaria, acompañado del desarrollo del TGI presenta una tasa de crecimiento superior a la masa corporal. Es decir, se observa un aumento en el tamaño y la funcionalidad intestinal y de los órganos anexos, superior al de otros órganos como el corazón, los pulmones o el tejido muscular. Este patrón se continúa y es más evidente en el periodo posterior a la eclosión, periodo en el cual la ingestión de alimento tiene una gran influencia. De hecho, se ha observado que el TGI presenta un rápido desarrollo alrededor de 24 horas después de que el ave ha tenido acceso a una fuente de alimento (Sklan, 2001; Uni *et al.*, 1998b). Por el contrario, un retraso en el acceso al alimento y agua (24 ó 48 horas) provoca mayores índices de mortalidad, menores ganancias de peso y disminución de la resistencia a las enfermedades (Uni y Ferket, 2007).

El patrón de desarrollo temprano del TGI no es el mismo en las diferentes especies de aves domesticas. Cuando se compara el desarrollo del TGI entre pavos y pollos de carne, el crecimiento del TGI observado en los pavos los primeros días post eclosión es generalmente menor al observado en los pollos (Sklan y Noy, 2003; Uni *et al.*, 1999). Sin embargo, conforme aumenta la edad, este patrón se hace más homogéneo.

Se han publicado diversos estudios (Chamblee *et al.*, 1992; Geyra *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 1998b; Klasing, 1998; Moran Jr, 2007; Sell *et al.*, 1991; Sklan, 2001; Sklan, 2004; Sklan y Noy, 2003; Uni *et al.*, 1998a; Uni *et al.*, 1999; Uni *et al.*, 1998b; Van Leeuwen *et al.*, 2004) relativos al desarrollo del tracto digestivo aviar, que van desde el desarrollo en la última fase embrionaria, la fase inmediata a la eclosión (post-eclosión), hasta aproximadamente los 21 días de vida del ave. En base a estos estudios, se presentan los acontecimientos más significativos del desarrollo del TGI del ave.

A pesar de que el embrión está completo estructuralmente a los 14 días de incubación, es a partir de los 6 últimos días de esta fase, cuando se incrementan las diferencias entre el desarrollo somático y el desarrollo del TGI. La relación (%) *peso del intestino delgado : peso corporal*, es aproximadamente 1 % a los 3 días anteriores a la eclosión y se incrementa a 3,5 %, el día de la eclosión de las aves (Sklan, 2004).

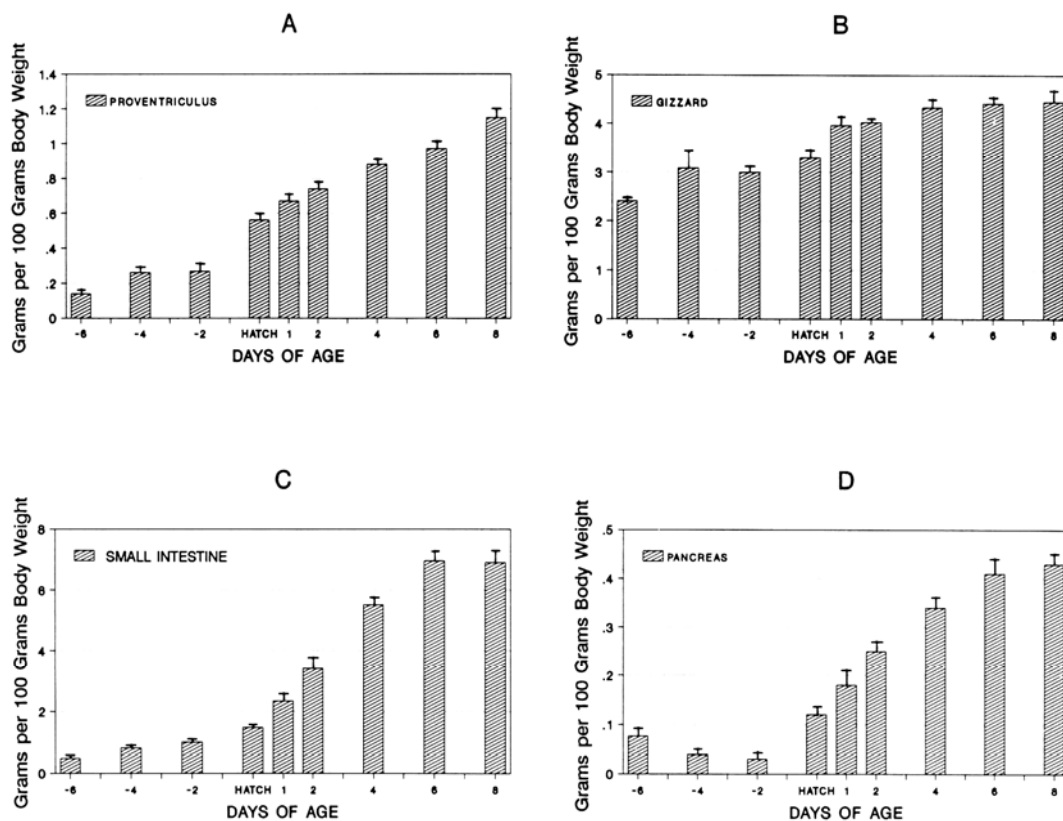


Figura 2.2. Media \pm SEM de los pesos relativos (gramos/ 100 g de peso corporal) del proventriculo (A), molleja (B), intestino delgado (C) y páncreas (D) observados en diferentes días durante la última fase del desarrollo del embrión y el crecimiento temprano de pavos (Sell *et al.*, 1991).

El progresivo incremento del peso de algunos de los segmentos y del páncreas en relación al peso corporal (gramos de tejido por 100 gramos de peso corporal) se presenta en la Figura 2.2.

Durante el desarrollo del embrión, la formación de la mucosa intestinal da lugar al desarrollo de las llamadas pre-vellosidades que serán notorias entre los 14 y 17 días de incubación y que iniciaran su actividad de absorción de nutrientes aproximadamente 2 días antes de la eclosión.

También 2 días antes de la eclosión, la yema del huevo residual contenida en un sáculo conocido como “saco vitelino” (the yolk sac) se introduce en la cavidad abdominal del embrión como una extensión del intestino, con la finalidad de suplir los nutrientes que el ave necesitará en el periodo inmediato a la eclosión hasta los 3 ó 5 días posteriores a ésta. Esta bolsa constituye entre el 20 y el 25 % del peso del embrión al momento de la eclosión y contiene aproximadamente 50 % de lípidos en forma de acilglicéridos como sustento energético destinado al mantenimiento y el desarrollo post-embriónal. Recientemente, Uni y Ferket (2007) enfatiza la importancia de una adecuada nutrición temprana, complementaria al aporte del saco vitelino. De hecho, la administración de nutrientes, principalmente carbohidratos de elevada disponibilidad como glucógeno, en el fluido amniótico de huevos fértiles los últimos días de incubación, se traduce en mejores rendimientos productivos y mayor desarrollo de los músculos pectorales. El método se describe como alimentación “*in ovo*” (in ovo feeding, IOF).

Durante la última parte del desarrollo del embrión y a través del proceso de eclosión, los lípidos de la yema (en forma de lipoproteínas de muy baja densidad) son transportados a la circulación sanguínea por dos vías; por fagocitosis o endocitosis, proceso en el que intervienen las células de la pared del saco vitelino, y por transporte a través del conducto que lo comunica con el intestino.

El desarrollo del TGI en la post-eclosión muestra un crecimiento acelerado en el que los segmentos intestinales incrementan significativamente hasta los 8 a 10 días de vida (Figura 2.2.). Este rápido crecimiento relativo del intestino delgado alcanza sus niveles más altos entre los 6 y 8 días de vida en el caso de pavos y entre los 6 a 10 días en el caso de pollos de carne.

La tasa de incremento es mayor en la sección duodenal, decreciendo progresivamente a medida que se acerca al colon. De hecho, el duodeno muestra una mayor tasa de crecimiento temprano que el yeyuno e ileon, posteriormente ésta decrece dando lugar al aumento de la tasa de crecimiento de estos dos últimos segmentos intestinales.

El peso relativo del páncreas presenta dos fases de crecimiento diferentes, una fase de crecimiento rápido desde la eclosión hasta aproximadamente 3 días y una segunda fase de crecimiento lento entre los 4 y 8 días de vida. Este patrón de desarrollo, tanto intestinal como pancreático, es similar en pollos de carne y en aves destinadas a la producción de huevos (Jin *et al.*, 1998b).

La molleja incrementa su tasa de crecimiento a un ritmo relativamente menor que los otros órganos, entre los 4 y 6 días, y el proventrículo apenas muestra un crecimiento relativo hasta los 8 días de vida del animal.

Tal vez el desarrollo de la mucosa intestinal en la post-eclosión sea lo que llame más la atención ya que, en el transcurso de algunas horas, la estructura morfológica de la mucosa iniciará un rápido desarrollo, sobre todo en presencia de alimento. No obstante, la evolución de la mucosa intestinal ya se había iniciado en la última fase embrional, aunque no era muy marcada.

Durante las primeras horas, las vellosidades intestinales son relativamente pequeñas y en los espacios entre vellosidades apenas son perceptibles algunas criptas intestinales de Lieberkung. Sin embargo, un continuo proceso de renovación y proliferación celular en la mucosa de las criptas, predominantemente de enterocitos que migraran hacia las vellosidades, y la proliferación de células goblet, incrementaran la actividad de digestión, absorción y la secreción de mucina.

Hay dos tipos de vellosidades en el duodeno y el ileon de pollos de 1 día de edad (Fig. 2.3.), vellosidades en forma de dedo (finger-like) y en forma de flecha (narrow plate-like) que presentan una disposición en zig-zag. Las primeras son predominantes a una edad temprana, en tanto que las segundas serán predominantes en aves con un mayor desarrollo epitelial. La disposición en zig-zag está relacionada con la función digestiva, ya que retrasa el paso de la digesta sobre la mucosa digestiva mejorando su contacto con el epitelio (mejores tasas de digestión y absorción), y es además característica de animales en buen estado de salud.

Cuando la digesta atraviesa por los diferentes segmentos provoca una respuesta fisiológica y mecánica, que puede traducirse en cambios en la morfología de la mucosa intestinal. Es posible que el desarrollo y posterior disposición anatómica normales de las vellosidades intestinales se vea afectada por elementos externos (sustancias tóxicas, microorganismos patógenos, cuerpos

extraños en el pienso) presentes en la luz intestinal; esto influirá negativamente en la capacidad digestiva y de absorción gastrointestinal, principalmente en animales jóvenes en crecimiento.

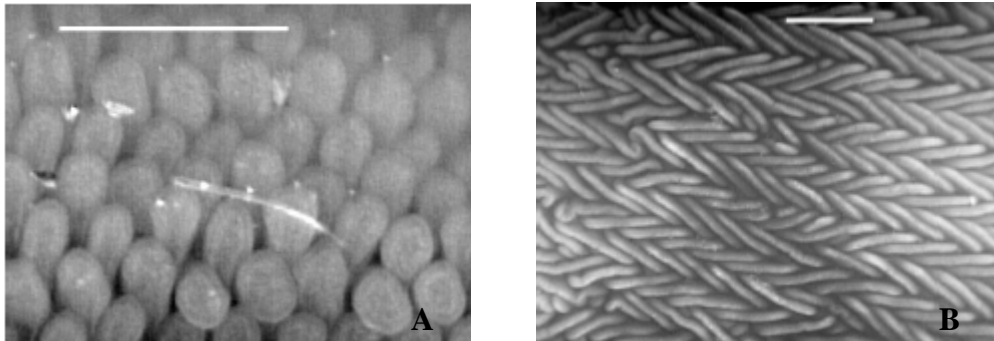


Figura. 2.3. A: Pollo de 1 día de edad, vellosidades en forma de dedo. B: Pollo de 21 días de edad, vellosidades con un patrón regular de zig-zag (Van Leeuwen *et al.*, 2004).

La longitud de las vellosidades es variable según el segmento intestinal medido, observándose generalmente una mayor longitud de las vellosidades del duodeno los primeros días de vida y un mayor desarrollo posterior de las vellosidades del yeyuno e ileon. Sin embargo y de manera general, se observa un rápido desarrollo (en altura y diámetro) de las vellosidades intestinales en todos los segmentos del 34 al 100 % entre 4 y 10 días post-eclosión.

Un patrón de desarrollo morfológico similar ocurre en las criptas intestinales y el número de enterocitos por sección longitudinal. No obstante, los cambios observados son más agudos con relación al tiempo, es decir, se producen en horas en lugar de días. En la post-eclosión las criptas están poco desarrolladas y contienen pocas células, sin embargo incrementan rápidamente en tamaño y complejidad, sobre todo en el yeyuno (Figura 2.4.).

La inmadurez de las criptas queda demostrada por la ausencia de una zona definida de proliferación de enterocitos (Figura 2.4.A), que concluirá con el establecimiento de un área específica de proliferación con una constante migración celular, aproximadamente a los 5 días de vida. El índice de proliferación celular es alto en la post-eclosión, entre 50 - 60 % y desciende conforme avanza la edad, hasta menos del 10 % a los 14 días de vida (Uni *et al.*, 2000).

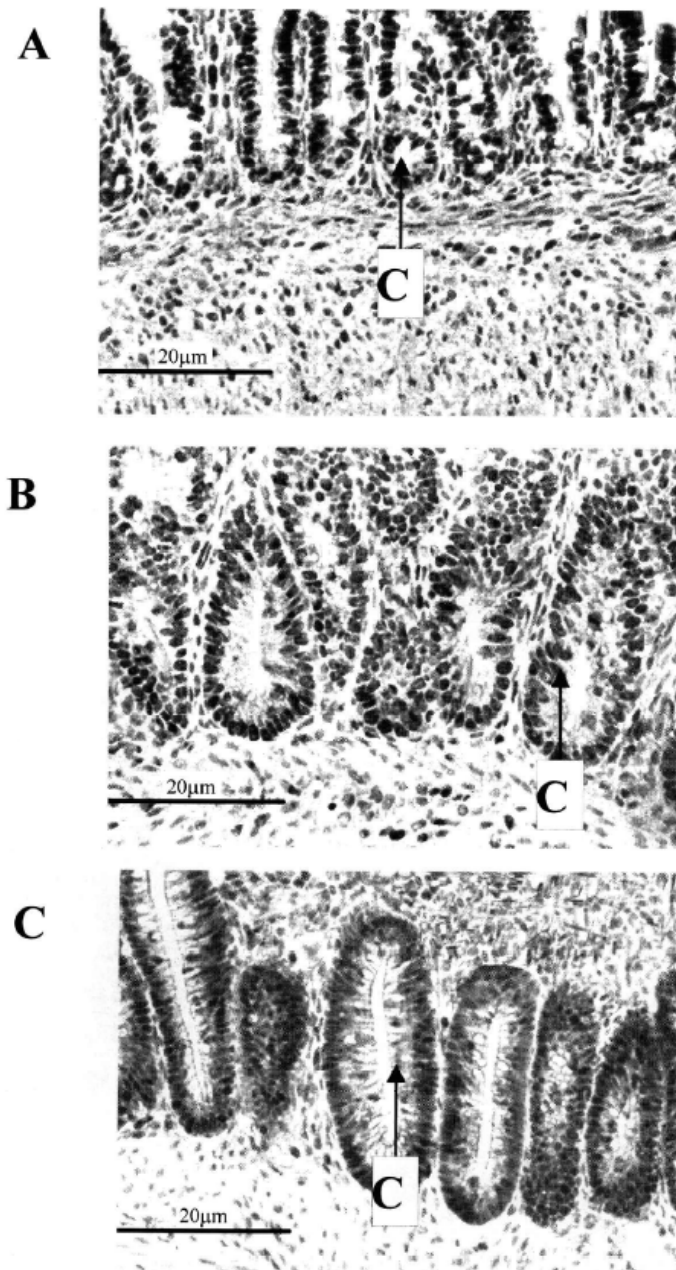


Figura 2.4. Secciones de criptas intestinales de yeyuno en diferentes estados de desarrollo: (A) 2 hrs. post-eclosión; (B) 108 hrs. post-eclosión; (C) 330 hrs. post-eclosión. C marca las criptas (Uni *et al.*, 2000).

Durante el desarrollo de la mucosa epitelial, en condiciones fisiológicas normales, la migración de enterocitos desde las criptas intestinales hacia la porción apical de las vellosidades promoverá su crecimiento (o renovación por descamación epitelial). Este crecimiento sin embargo, no es paralelo. Esto puede observarse al calcular la relación *vellosidad: cripta* que será aproximadamente de 2 a las 12 horas post-eclosión y que incrementara a 3 ó 4 después de las 240 horas post-eclosión.

El número de células goblet (productoras de mucus) por vellosidad aumenta conforme lo hace la vellosidad, pero su proporción se mantiene constante con la edad. A su vez, la densidad por mm² incrementa levemente en el duodeno y en una mayor proporción en el yeyuno e ileon. En la pre-eclosión el producto de su secreción es predominantemente una mucina ácida, en tanto que en la post-eclosión, su secreción estará compuesta de mucina ácida y neutra.

El sistema inmune, representado por el tejido linfoide asociado (gut associated lymphoid tissue, GALT), también manifiesta cambios en la post-eclosión, sobre todo en la población de linfocitos T y B intraepiteliales y en lámina propia. La maduración funcional linfocitaria ocurre en dos estadios: el primero durante los 1–7 días y el segundo entre 8-14 días post-eclosión, este último estadio está acompañado de un incremento en la población de linfocitos. Por lo tanto, la escasa respuesta de anticuerpos en animales jóvenes está sujeta principalmente a la inmadurez de linfocitos T (Bar-Shira *et al.*, 2003). El efecto de desafíos inmunológicos o la respuesta inmune ante antígenos de diversa naturaleza está bien documentado; en cambio, hay poca información acerca de los cambios en el GALT en los primeros días de vida del animal, en condiciones normales.

2.1.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y DE ABSORCIÓN.-

La mucosa relativamente desarrollada y la presencia de alimento tendrán una fuerte influencia en el inicio de la actividad enzimática digestiva. Se ha detectado una elevada actividad específica de maltasa y sacarasa a 1 día de edad; esta actividad presenta variaciones, aumentando y disminuyendo hasta estabilizarse a los 8 días de vida (Sell *et al.*, 1991).

En la última fase de la vida embrionaria, es posible observar una actividad fluctuante de la quimiotripsina que alcanza sus máximos niveles a los 2 días post-eclosión. Una dieta rica en proteína, propia de esta edad, hace que su actividad permanezca relativamente constante, asociada a proporciones crecientes de tripsina que inicia su actividad en este período.

Las actividades específicas de la amilasa, lipasa y tripsina pancreáticas aumentan progresivamente entre los días 1 y 4, seguidos por un sustancial incremento hasta el sexto día de edad de las aves (Figura 2.5.). El incremento de la actividad enzimática es acelerado durante los primeros 14 días y parece estabilizarse a los 21 días de edad.

El inicio de la actividad enzimática, estrechamente relacionado con la edad, exige que el pienso deba estar compuesto por ingredientes que contengan principios nutritivos de elevada disponibilidad. Este hecho permite establecer la necesidad de preparar piensos acordes al desarrollo del TGI de las aves (estárter, 1ª y 2ª edades y acabado, utilizados habitualmente en avicultura de carne).

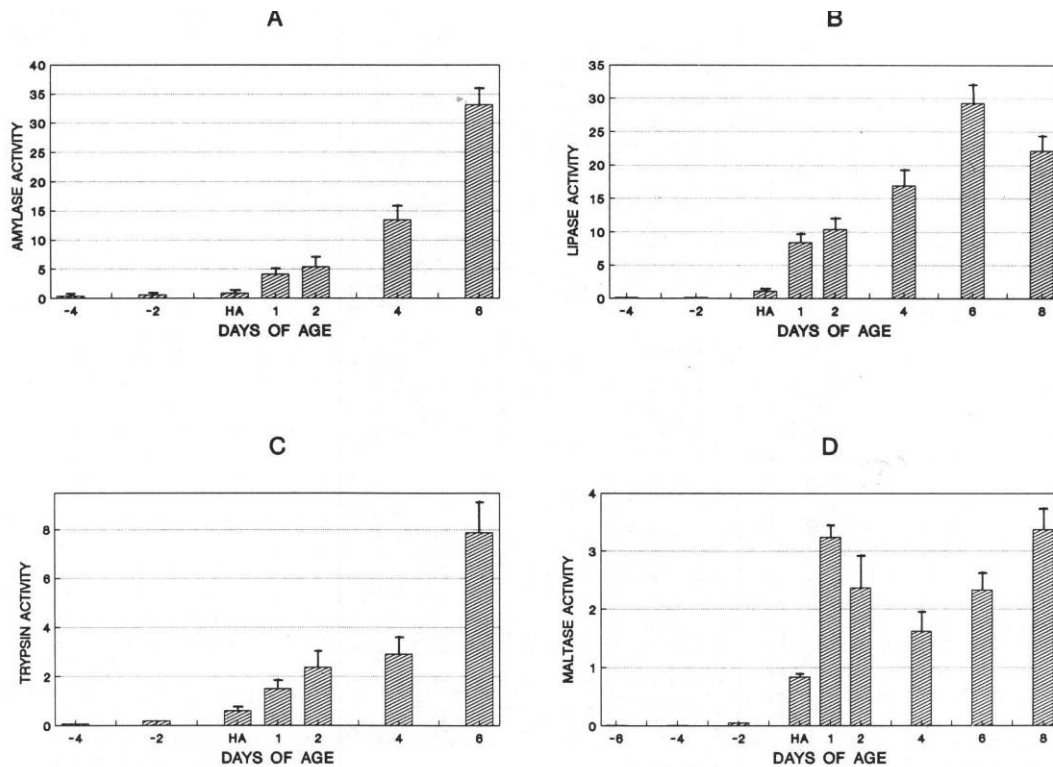


Figura 2.5. Media \pm SEM de las actividades totales de amilasa (A), lipasa (B), tripsina (C) pancreáticas y maltasa (D) del yeyuno, expresado en milimoles de sustrato hidrolizado/hora por 100 g de peso corporal, observado en diferentes días durante la última fase embrional y el crecimiento temprano de pavos. HA=día de la eclosión. Los datos de la actividad de lipasa al día 6 y de amilasa y tripsina a los días 6 y 8 no fueron medidos (Sell *et al.*, 1991).

La capacidad de absorción del TGI también se incrementa con la edad y está fuertemente influenciada por la presencia de alimento. Pequeñas cantidades de glucosa y de aminoácidos como la metionina contenidas en la residual yema del huevo son absorbidas el día de la eclosión en una tasa que oscila entre 47 y 56 %. Esta tasa de absorción se incrementa hasta el 65 % para la metionina y 74 % para la glucosa al 2º día, alcanzando los 74 y 81 % para la metionina y la glucosa respectivamente, a los 4 días de vida. A esta edad ya se observa una elevada capacidad de absorción de sustratos provenientes del alimento y a partir de aquí el ave dejará su dependencia de los nutrientes contenidos en el saco vitelino.

Cerca del 85 % tanto del almidón como de los ácidos grasos de la dieta pueden ser absorbidos a partir del día 5, mientras que la digestión de la proteína oscila entre 70-78 % y aumenta hasta un 85 % a los 14 días. Así, aunque la absorción de algunos nutrientes no es óptima en el periodo

próximo a la eclosión, aumenta considerablemente hasta los 10-15 días de vida de las aves. La digestibilidad de las materias grasas ha sido objeto de estudio en algunos de los trabajos realizados por nuestro grupo (Blanch *et al.*, 1995; Cortinas *et al.*, 2004; Villaverde, 2005). Los resultados obtenidos permiten concluir que a medida que aumenta la edad (primeras dos semanas de vida) lo hace también la capacidad de absorción de los lípidos. Esta capacidad, esta ligada al grado de saturación, ya que a mayor grado de insaturación se observa una mayor absorción. La digestión de materias grasas saturadas como sebo aumenta del 68 al 78 % entre los 0 y los 15 días de edad.

2.1.3. ECOSISTEMA MICROBIANO

El TGI de todas las especies (incluido el ser humano) presenta una interacción estrecha con microorganismos de distinta naturaleza. Mientras que algunos de ellos son considerados propios del hospedador (microorganismos indígenas o autóctonos), que están presentes en equilibrio simbiótico, otros (microorganismos no indígenas o alóctonos) pueden introducirse e iniciar un proceso de colonización, establecimiento y crecimiento. La incorporación o en su caso proliferación de algunos de estos microorganismos puede provocar cambios, muchas veces negativos, en el ecosistema microbial. Diversos autores han analizado esta temática (Apajalahti y Kettunen, 2002; Ewing y Cole, 1994b; MacFarlane y McBain, 1999; Mackie, 1997; Mackie *et al.*, 1999; Vispo y Karasov, 1997).

La interacción entre los microorganismos y el TGI se refleja a distintos niveles: participando en procesos digestivos; evitando el establecimiento de microorganismos potencialmente patógenos; produciendo metabolitos tóxicos; incrementando la tasa de renovación epitelial; degradando la capa de mucina e induciendo respuesta inmunitaria con la proliferación de células de defensa (Ewing y Cole, 1994b; Sklan, 2004; Van Der Klis y Jansman, 2002).

Aunque la mayoría de los trabajos coinciden en que la incorporación de microorganismos desde la eclosión es paulatina y que la carga microbiana al nacimiento es prácticamente inexistente; esto no es del todo cierto ya que, aparentemente, existe una relativa carga microbiana en pollitos recién nacidos. El empleo de técnicas moleculares como la DGGE (denaturing gradient electrophoresis in polyacrylamide gel) permite identificar hasta 48 amplicones diferentes (genotipos representados por bandas ampliadas de DNA bacteriano, en gel de polyacrilamida, de tamaño y composición variables) en muestras de contenido intestinal de pollos recién eclosionados (Pedroso *et al.*, 2005). El hecho de que el embrión inicie la absorción de fluido

amniótico a los 14 días de incubación probablemente explique la presencia de microorganismos en esta etapa de su vida.

Paralelamente al desarrollo del tracto digestivo, después de la eclosión, se inicia un periodo de colonización, que concluirá con el establecimiento de una abundante carga microbiana (con valores que oscilan entre las 10^9 y 10^{13} unidades formadoras de colonias, UFC/g de digesta). El desarrollo microbiano en las primeras horas de vida del ave es muy acelerado. Ya a las 2 horas de la eclosión pueden ser detectados *E. coli* y bacterias del género *Streptococcus* en la excreta de los pollos; entre las 3 a 6 horas posteriores continua el desarrollo de un gran número de bacterias anaeróbicas en el ciego, capaces de la descomposición de ácido úrico, principal sustrato disponible dada la proximidad del conducto urinario (cloaca) en esta especie (Klasing, 1998; Sklan, 2004). En pollos de 1 día de vida se han contabilizado hasta 10^8 y 10^{10} UFC por gramo de digesta en ileon y ciego, respectivamente. La máxima densidad bacteriana fue establecida aproximadamente a 1 semana de vida, contabilizándose $>10^9$ UFC/g de digesta en el ileon y $>10^{11}$ UFC/g de digesta en el ciego (Apajalahti *et al.*, 2004; Apajalahti y Kettunen, 2006; Franceschi y Ollé, 2007).

Entre 1 y 3 días de vida se observan los mayores incrementos en cuanto a la cantidad de UFC. Este incremento es paulatino hasta que, aproximadamente a los 40 días, la microbiota alcanza niveles estables y es menos susceptible a cambios provocados por el medio. En aves jóvenes, hasta que las poblaciones bacterianas no están bien establecidas, es posible observar una menor proporción de actividad fermentativa (fenómeno que se discutirá más adelante) que en aves adultas. Este hecho permite suponer que las aves jóvenes presentan un ecosistema microbiano sujeto a variación y más fácilmente perturbable.

De esta manera entre los 0 – 4 días hay un predominio de *Enterobacteriaceae* y *Enterococcus*, que descenderá paulatinamente a medida que el pollo crece. Entre los 2 – 4 días inician su desarrollo los *Lactobacillus* y permanecerán relativamente estables durante el periodo de crecimiento del ave. Desde los 7 días los anaerobios estrictos colonizan el ciego. Así, diversos grupos microbianos se establecerán en los diferentes segmentos hasta los 21 días de vida, aproximadamente (se considera que entre 21-40 días la población microbiana intestinal alcanza niveles estables). Sin embargo, dependiendo del estado de salud del animal, la presencia de microorganismos en el medio ambiente u otros factores, este periodo también puede ser aprovechado para el establecimiento de flora patógena como *Clostridium perfringens* o *Salmonella* (Aho *et al.*, 1992; Barnes *et al.*, 1972; Barnes, 1972; Collier *et al.*, 2003; Corrier *et al.*, 1992; Drew *et al.*, 2004; Furuse y Yokota, 1984; Salanitro *et al.*, 1978; van der Wielen *et al.*,

2000), o para la infestación parasitaria, principalmente por parásitos del género *Eimeria* (Collier *et al.*, 2003). Además, se ha establecido una relación entre la infestación de coccidias de *Eimeria* con la prevalencia de enteritis necrótica provocada por *C. perfringens* (Allen *et al.*, 1996; Allen y Fetterer, 2002; Francesch i Ollé, 2007; Lu *et al.*, 2006).

La colonización bacteriana en los diferentes segmentos intestinales puede ser variable, así, la comunidad microbiana del intestino delgado se limita a *Streptococcus faecalis* y coliformes durante las primeras semanas, luego establecen su dominancia los Lactobacilos. En contraste, la comunidad microbiana cecal no se establece hasta las 6 ó 7 semanas, y puede estar compuesta de una amplia variedad de microorganismos facultativos o anaerobios estrictos, entre los que destacan *Streptococcus faecalis*, clostridias, enterobacterias, *Pediococcus* y ocasionalmente *Pseudomonas aeruginosa* (Lan *et al.*, 2005).

La proporción de microorganismos está fuertemente influenciada por factores externos como la ingestión de alimento (Mead, 1989) o factores internos como el peristaltismo (Clench, 1999) o el pH de las diferentes secciones del TGI. Así, mientras que las bacterias se desarrollan entre pH de 6 a 7.5, un rango de tolerancia mínimo es de pH 3 a 4 (Ewing y Cole, 1994a). La tabla 2.1., permite observar que las mayores concentraciones o diversidad encontradas en el TGI de los pollos se sitúan en intervalos próximos al rango óptimo de pH, así como en secciones en las que hay un mayor tiempo medio de retención, lo cual permite una mayor actividad fermentativa microbiana.

Como puede observarse, la mayor diversidad y la población microbiana más estable en el ave adulta se encuentran en el ciego.

La determinación de la población microbiana se ha hecho tradicionalmente a través de medios de cultivo enriquecido y selectivo para diferentes grupos bacterianos. Sin embargo su caracterización completa no es posible, a pesar de las mejoras implementadas en la preparación de estos medios de cultivo tradicionales. En la actualidad pueden cultivarse 10 al 40 % de las bacterias del TGI (Suau *et al.*, 1999; Zoetendal *et al.*, 1998). Algunos autores sostienen que un gran porcentaje (más del 80 %) de las especies bacterianas no son identificables por estos medios (Pedroso *et al.*, 2005). Además, las muestras, ya sean de contenido intestinal o fecal, requieren de un tiempo mínimo de espera para ser procesadas y tienen poca reproducibilidad (Dutta *et al.*, 2001; Fuhrman *et al.*, 1992).

Tabla 2.1. Diversidad bacteriana del Tracto Gastrointestinal de pollos, en función de la variación del pH y el tiempo medio de retención, en minutos (TMR) de la digesta en la fase sólida

Sección Intestinal	Contenido digestivo		Bacterias
	pH	TMR (fase sólida)	
Buche	4,5	31-41	<i>Lactobacillus</i> +, <i>Streptococcus</i> +, <i>E. Coli</i> -, <i>Staphylococcus</i> +
Proventrículo	4,4-4,8	39	<i>Streptococcus</i> +, coliformes -
Molleja	2,6	33	<i>Lactobacillus</i> +
Duodeno	5,7-6	5-10	coliformes -
Yeyuno	5,8	71-84	<i>Clostridium</i> +
Ileon	6,3	90-97	<i>Bacteriodes</i> -, <i>Streptococcus</i> +, <i>Staphylococcus</i> +, <i>Eubacterium</i> +, <i>Lactobacillus</i> +, coliformes -
Ciego	5,7	119	<i>Bacteriodes</i> -, <i>Fusobacterium</i> -, <i>Bofidobacteria</i> -, <i>Peptostreptococcus</i> +, <i>Clostridium</i> +, <i>Propionobacterium</i> -, <i>Eubacterium</i> +
Recto	6,3	26	Mezcla del intestino delgado y ciego

TMR: tiempo medio de retención en minutos; +: Gram positivas; -: Gram negativas (Ewing y Cole, 1994a; Morales, 2007)

Para conocer la cantidad y composición de los microorganismos que constituyen la microbiota del pollo también se han utilizado técnicas de microscopía electrónica, además de métodos cromatográficos. En los últimos años se han desarrollado métodos moleculares que permiten la identificación de fracciones de DNA o RNA microbianos (Amit-Romach *et al.*, 2004; Apajalahti y Kettunen, 2002; Danicke *et al.*, 1999; Gérard *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2002a; Gong *et al.*, 2002b; Guan *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003a; Lu *et al.*, 2003b; Oviedo-Rondon *et al.*, 2006; Robey y Shermer, 1994; Torok *et al.*, 2008; van der Wielen *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002; Zhu y Joerger, 2003). La Figura 2.6., presenta los resultados del análisis de la microbiota del TGI (ileon y ciego) de pollos de carne de dos semanas de edad, con el empleo de técnicas moleculares. En concreto, gracias a la secuenciación de la fracción 16S rDNA, se identificaron 13 géneros diferentes, comunes en todos los segmentos intestinales estudiados. Se observaron diferencias en cuanto a la abundancia relativa de los géneros bacterianos analizados en el ciego donde *Clostridiaceae* representa el 65 %, seguido de *Lactobacillus* 8 % y *Bacteriodes*, 5 % como los mayoritarios (2.6. A), y en el ileon donde *Lactobacillus* supone el 67 %, *Clostridiaceae* 11 %, *Streptococcus* 6,5 % y *Enterococcus* 6,5 % (2.6.B) (Lu *et al.*, 2003a).

Otra alternativa en el estudio de la microbiota intestinal es el empleo de la t-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorfism) basada en el estudio del gen 16S rDNA. Uno de sus pasos consiste en la amplificación de segmentos característicos de bacterias o grupos de bacterias por PCR (Polimerase Chain Reaction), utilizando *primers* universales marcados con fluorescencia. Al respecto, esta técnica ha sido adaptada al estudio de la microbiota de aves y cerdos, por el Grupo de Nutrición de la Universidad Autónoma de Barcelona (Castillo, 2006; Gómez de Segura *et al.*, 2007) y permite obtener un perfil más completo de los microorganismos presentes en las muestras ya sean de contenido cecal o de excreta. Por ello, se constituye en una técnica analítica de elección para el estudio de la diversidad de los microorganismos del TGI, a pesar de que no los identifica en grupos taxonómicos. No obstante, existen herramientas adicionales que permiten este último paso, en un proceso conocido como “restricción enzimática teórica” y que se obtiene a partir de una base de datos TAP-RFLP del software Ribosomal Database II Project (Cole *et al.*, 2003), disponible en la red.

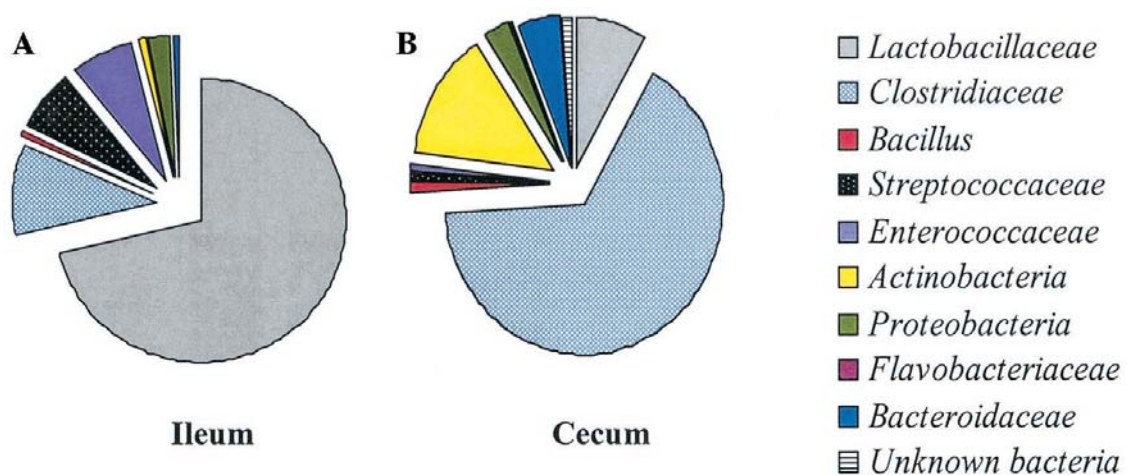


Figura. 2.6. Composición de la flora bacteriana del (A) ileon y (B) ciego de pollos de carne, determinado por secuenciación del 16S rDNA de una librería formada por 1.230 clones (Lu *et al.*, 2003a)

La dinámica poblacional de la microbiota puede determinarse también a través de otras técnicas analíticas entre las que podemos destacar la determinación de ácidos grasos de cadena corta (AGVs y ácido láctico), proporción de adenosina trifosfato (ATP) y contenido de bases púricas. Estas determinaciones proporcionan una estimación de la cantidad de microorganismos presentes en un determinado segmento del TGI, pero no de su naturaleza y composición. Cuantifican, de manera general, ya sean productos del metabolismo microbiano, o bien componentes químicos de su estructura nuclear (o del citosol). Muchos de estos productos pueden ser comunes entre diferentes géneros o especies de microorganismos.

Con relación a la producción de ácidos grasos de cadena corta, la variación entre los AGVs más representativos (acético, propiónico y butírico) y del ácido láctico, podría indicar una mayor o menor proporción de algún grupo o grupos de bacterias. Así por ejemplo, una elevada producción de ácido butírico podría relacionarse con el descenso del número de *Enterobacteriaceae* (van der Wielen *et al.*, 2000). Algunos estudios sugieren que la mayor o menor proporción de acetato, propionato y butirato podrían tener un papel importante en el desarrollo de la microbiota cecal durante el crecimiento de pollos de carne (Clayton, 2005; Corrier *et al.*, 1990; Hume *et al.*, 1992; Jin *et al.*, 1998a; Józefiak *et al.*, 2004). Además, los AGVs son tóxicos para bacterias Gram negativas y su producción puede modular hasta cierto grado la multiplicación de microorganismos patógenos como *S. enteritidis* (Ewing y Cole, 1994b). Por estas razones, la producción de AGVs y ácido láctico, se consideran un buen indicador en el estudio de la microbiota de los animales.

2.2. UTILIZACIÓN DE MATERIAS GRASAS EN ALIMENTACIÓN AVIAR: GRASAS Y ACEITES RECICLADOS

Las grasas han sido utilizadas en la alimentación aviar desde el inicio de la avicultura moderna. Su uso ha aumentado paralelamente a la mejora de la genética y de la productividad de las aves. Las estirpes actuales son más eficientes y necesitan piensos con una alta concentración energética, por lo que la incorporación de materias grasas es una practica habitual en los programas de alimentación de los pollos de carne. Consideraciones relativas al empleo de grasas y co-productos de su refinería en la alimentación de las aves, así como de otras especies, pueden encontrarse en revisiones realizadas por diversos autores (Codony y Guardiola, 1999; Dziezak, 1989; FEDNA, 2003; Hertrampf, 1993; Mateos *et al.*, 1996b; Mateos *et al.*, 1995; Palmquist, 1988; Shepperson, 1993; Ziggers, 2005).

Tabla 2.2. Tipos y fuentes de grasa

ORIGEN	CARACTERÍSTICA	PRODUCTO
Animal	Terrestre	Sebo
		Manteca
		Grasa de aves
	Marino	A. Pescado
Vegetal	Saturadas	Palma
		Coco
	Insaturadas	A. Soja
		A. Girasol
		A. Colza
Otros		
Procesos industriales	Refinado de aceite	Aceites ácidos u Oleínas
	Grasas transformadas	Grasas hidrogenadas Jabones cálcicos
	Grasas fraccionadas	Lecitinas
	Grasas reutilizadas	Residuos de freiduría
Grasas Técnicas	Mezclas	

Adaptado de Mateos *et al.*(1996a)

La Tabla 2.2., presenta las materias grasas de mayor uso en avicultura, Las grasas recicladas son motivo de especial interés debido a que el análisis de sus características químicas y su elevado contenido de AG, indica que constituyen una buena alternativa nutricional, Sin embargo, en ocasiones, pueden presentar compuestos nocivos. No debemos dejar de lado los problemas

ambientales que conllevan el vertido, almacenamiento o destrucción de las grasas recicladas, en el caso de no ser reutilizadas adecuadamente.

Grasas y aceites reciclados.- Este grupo consiste en materiales residuales de la cadena alimentaria humana y proceden fundamentalmente de la recolección en industrias de fritura, procesamiento de alimentos, centros de restauración e industrias cárnicas, como productos que hay que eliminar. Lógicamente, en ciertos casos, la calidad de los mismos no es adecuada para el consumo en forma directa y deben pasar por un proceso de reciclado o purificación. Este proceso permite eliminar la fracción correspondiente a productos de alteración, entre los cuales se encuentran los productos de oxidación y posibles contaminantes, fracción de nula digestibilidad y comprobados efectos nocivos para la salud (Bou *et al.*, 2005; Choe y Min, 2007; Codony y Guardiola, 1999; Mateos *et al.*, 1996b; Wiseman y Cole, 1983).

Hasta 1985, más del 90 % de la grasa de los restaurantes era de origen animal. La industria del reciclado añadía a estos lípidos recogidos cantidades variables de oleínas vegetales de diversa procedencia a fin de elevar su contenido de linoleico (50 %, 35 % y 20 %). Por la combinación entre grasa animal y oleínas vegetales, estas mezclas se conocen comúnmente como *grasoleínas*. Otras veces se le añadían grasas provenientes de las industrias de los subproductos de mataderos y sebos oscuros o con un contenido indeterminado de ácidos grasos libres, rechazados por la industria del jabón (acidez y color excesivo). De aquí que estas otras grasas reciban el nombre de “yellow grease” o grasas amarillas.

Tabla 2.3. Ácidos grasos de algunas grasas recicladas

Perfil Ac. Grasos		GRASOLEINAS			
(% Grasa verdadera)		YELLOW GREASE	>50 %*	>35 %*	<20 %*
	C<14	tr.	tr.	tr.	tr.
Mirístico	C14:0	1	<1,0	<2,0	<3,0
Palmítico	C16:0	18	<11,0	<18,0	<25,0
Palmitoleico	C16:1	2,5	1	2	2,5
Esteárico	C18:0	9	<5,0	<8,0	<10,0
Oleico	C18:1	46	25	33	38
Linoleico	C18:2	21	>50,0	>35,0	>18,0
Linolénico	C18:3	2	2	1,5	1
	C>=20	tr.	tr.	<2,0	<3,0
Características					
	Índice Iodo	>70	>115	>100	>85
	Título (Punto de fusión)	-	<15	<18	<22
	pH - Acidez mineral	-	>5,5	>5	>5
	Grasa no eluible (NEM)	<16	<15	<18	<20
	MIU	<3	<4	<6	<7
	Saturado/Insaturado	0,39	0,2	0,43	0,67

* Contenido de ácido linoleico. MIU: Humedad, impurezas e insaponificables. Adaptado de Tablas FEDNA (2003)

Estas grasas contienen de media un 20 a 25 % de linoleico (índice de iodo entre 80 y 87) y son bien utilizadas por los monogástricos a pesar de su alto contenido en material no eluible y ácidos grasos *trans*.

Cuando se recolectan, seleccionan, filtran y reciclan de forma adecuada, su valor nutricional es alto y similar e incluso superior al de un sebo de calidad media. El problema aparece cuando se reciclan grasas de freiduría excesivamente recalentadas, con niveles de polímeros elevados (en ocasiones superiores al 20 %). Cuando el tratamiento térmico es abusivo se produce autooxidación de los ácidos grasos con aumento del contenido en polímeros, monómeros cíclicos, hidroperóxidos y otros compuestos no eluibles que no son digestibles y que pueden resultar dañinos y tóxicos para el animal. Además, los productos oxidados reducen la palatabilidad de la grasa original.

La calidad de los aceites vegetales recuperados varía ampliamente dependiendo de la procedencia y el procesado realizado y es evidente que es necesario un control analítico exhaustivo.

En relación con otros tipos de grasas recicladas, debe señalarse que pueden contener algunos compuestos de contaminación externa. La presencia de estas grasas contaminadas en el pienso, con alto contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), dioxinas y PCBs o pesticidas, puede afectar de forma negativa a la salud de los animales. No obstante, se han detectado niveles de estos compuestos perjudiciales en las materias grasas de origen, lo que parece indicar que no sólo son característicos de las materias grasas residuales.

Las materias grasas disponibles en la actualidad han sido objeto de estudio en una primera fase del proyecto Feeding Fats Safety (FFS). Se han caracterizado y analizado minuciosamente un total de 123 muestras de grasas y aceites de diverso origen disponibles en el mercado europeo (Italia, España, Alemania, Francia, Suecia, Noruega, Dinamarca, Bélgica, UK, Polonia, Hungría, Rumanía, Malasia y Marruecos).

La caracterización de las muestras de materias grasas se realizó en base a su composición química (humedad; acidez; perfil ácidos grasos; ácidos grasos *trans*; ácidos grasos conjugados; colesterol; esteroides; tocoferoles/tocotrienoles), niveles de degradación (productos de oxidación de esteroides; productos de oxidación de ácidos grasos; polímeros; mono y diacilgliceroides;

peróxidos; MDA; p-anisidina) y presencia de contaminantes (dioxinas y PCBs; hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAPs).

Esta caracterización tuvo como resultado la clasificación de las materias grasas en diez categorías:

- Aceites ácidos neutralización (refinación) química (AOCHE)
- Aceites ácidos neutralización (refinación) física (AOPHY)
- Lecitinas (LECI)
- Subproductos de fritura reciclados (RECY)
- Grasas animales (sebo, manteca, mezclas) (ANFA)
- Subproductos del blanqueado de aceites (EBE)
- Aceites de pescado (FISH)
- Grasas hidrogenadas (HYBY)
- Jabones cálcicos (FACS)
- Otros (MIX)

Una mayor información acerca de las características y composición de las materias grasas analizadas se halla disponible en el portal del proyecto FFS: www.ub.es/feedfat.

Es importante estudiar la posibilidad de incorporar estas grasas recicladas como suplemento energético en el pienso para animales. En este sentido, como ya se había anticipado, hay que tener en cuenta la posible presencia de sustancias perjudiciales, hecho que plantea una problemática relativa a la seguridad de su empleo tanto para los animales como para el consumidor del producto final. En este trabajo se enfocaran por separado dos grupos de compuestos perjudiciales de las materias grasas recicladas: los que se producen por procesos de degradación química, entre los que se encuentran los productos de oxidación e isomerización de las grasas (*trans*) y los que se encuentran asociados a las grasas como contaminantes. Entre estos últimos, se encuentran las dioxinas y PCBs, y los HAPs.

2.2.1. COMPUESTOS DE DEGRADACIÓN QUÍMICA

El procesamiento de las materias grasas con la finalidad de mejorar sus cualidades tecnológicas (hidrogenación), así como someterlas a elevadas temperaturas (grasas de freiduría), pueden generar cambios en su estructura química, alterando su configuración, cambiando la posición de sus dobles enlaces o generando nuevos productos, como isómeros o metabolitos tóxicos. Dos son los productos de degradación que mayor énfasis merecen a la hora de estudiar su efecto en la salud, tanto de los animales como de las personas que los consumen: los ácidos grasos *trans* y los productos de oxidación de las grasas.

2.2.1.1. Ácidos Grasos *Trans*

Generalmente, los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos (AG) monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) de las materias grasas comúnmente utilizadas en alimentación animal tienen una configuración de tipo "*cis*". Sin embargo, también pueden encontrarse AG con dobles enlaces en configuración de tipo "*trans*". Los AG "*trans*" pueden formarse por procesos naturales, como es el caso de la acción de enzimas de origen microbiano en el rumen (biohidrogenación ruminal), o bien a través de procesos industriales (hidrogenación o tratamiento térmico de las materias grasas).

Legislación.- La ingestión de grasas alteradas ha generado la preocupación de las autoridades sanitarias ya que pueden estar relacionadas, como se verá más adelante, con problemas de salud. Ante esta perspectiva, la Comisión de la Unión Europea, delegó a AFSA (French Food Safety Agency) la elaboración de un informe, así como recomendaciones, al respecto del uso, los riesgos sobre la salud y posibles beneficios de las formas *trans* y algunos de sus isómeros. Dicho informe fue publicado en abril del 2005 y puede consultarse en el enlace www.afssa.fr. La ingestión diaria recomendada de formas *trans* incluyendo al CLA (ácido linoleico conjugado) no debe superar el 2 % del total de energía consumida (TEI) ya que un mayor nivel incrementa la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Léger *et al.*, 2007). No obstante, el nivel de AGT totales que pueden incluirse en la dieta de los animales aún no está reglamentado, a pesar de la posibilidad de que estos productos de alteración puedan transferirse a la carne o productos como la leche o los huevos.

Origen y composición

Los isómeros *trans* (ácidos grasos *trans* ó AGT) resultan de la modificación, natural o provocada, de la estructura de los AG que constituyen las materias grasas, alterando sus funciones fisiológicas, biológicas y/o su calidad tecnológica (estabilidad oxidativa, olor, sabor, etc.). La figura 2.7., presenta tal cambio en la estructura de un AG.

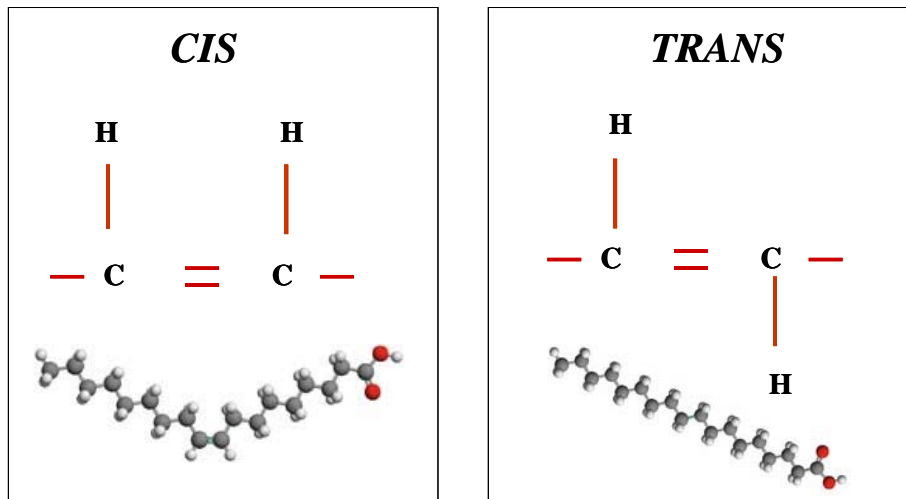


Figura 2.7. Configuración de los dobles enlaces de un ácido graso.

De forma habitual, la **isomerización** de los ácidos grasos consiste en el cambio de posición de los dobles enlaces, que se desplazan de un átomo de carbono a otro (isomerización posicional) y que supone, además, la alteración de su configuración espacial (isomerización geométrica). El producto resultante puede poseer propiedades físico-químicas diferentes del que procede, pero sin cambiar su composición original o la cantidad de átomos de carbono.

En los procesos naturales o tecnológicos a que se someten las grasas, la isomerización se debe a la estabilización de los radicales libres de los ácidos grasos que se originan durante dichos procesos. En otras palabras, uno de los enlaces del doble enlace de configuración "cis", queda libre ya sea por acción enzimática o por la acción de un catalizador, constituyendo un radical libre que se saturará con uno o más átomos de hidrógeno según los enlaces libres que se hayan generado; es posible que el enlace libre no se sature y vuelva a generar un doble enlace, pero en este caso en otro carbono de la cadena, provocando otra configuración.

Isómeros de posición.- El fenómeno consiste en la traslación o cambio de posición del doble enlace ya sea al átomo de carbono precedente o al que lo antecede, es decir, si el doble enlace se sitúa en el carbono 12 de la cadena hidrocarbonada, después del proceso, el doble enlace se situará en el carbono 11, o si está en el carbono 9 pasará al carbono 10 (Figura 2.8.). Durante este proceso pueden formarse proporciones variables de ácidos grasos conjugados (dobles enlaces situados en carbonos contiguos), por desplazamiento de dobles enlaces a lo largo de la cadena. Esta modificación es de gran importancia nutricional, ya que afecta a aquellos ácidos que son considerados como esenciales para el organismo (linoleico y linolénico), que se perderán en cierta proporción. Un claro ejemplo de estos productos son los isómeros del ácido linoleico (ácido *cis*-9, *cis*-12-octadecadienoico): ácido linoleico conjugado *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12 (Lee *et al.*, 2005).

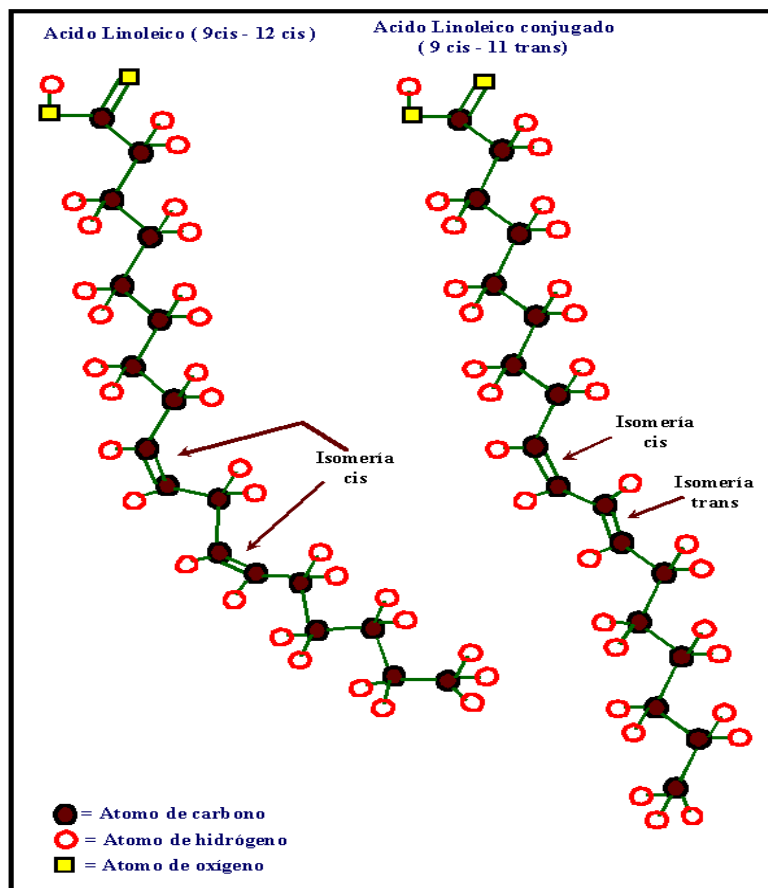


Figura 2.8. Estructura química del ácido linoleico (*cis*-9, *cis*-12) y del isómero ácido linoleico conjugado (*cis*-9, *trans*-11) (Sanhueza *et al.*, 2002)

Isómeros geométricos.- El término “geometría” se refiere a la apariencia (en el espacio) de la cadena hidrocarbonada que puede cambiar con el cambio de posición de un doble enlace. La diferencia en la configuración espacial de los átomos de hidrogeno respecto al carbono define la forma isomérica geométrica. Si los átomos de H se sitúan en el mismo plano espacial el doble enlace está en configuración “*cis*” y si los átomos de H se sitúan en distintos planos respecto al C

sera configuración *trans*. La presencia del doble enlace “*cis*” introduce un cambio de dirección en la cadena, provocando su “acodamiento” (Figura 2.7.). En cambio, el doble enlace “*trans*” no provoca tal cambio de dirección y mantiene la configuración lineal del ácido graso.

La configuración espacial normal de los ácidos grasos saturados, dada la ausencia de dobles enlaces, es lineal. Consecuentemente, las características físico-químicas de los AGT, serán similares a las de los AG saturados. Las moléculas de un AG *trans* pueden empaquetarse entre sí de un modo más ordenado al que lo hace un AG de configuración “*cis*”; esto también es característico de las grasas saturadas y se refleja en las diferencias de sus puntos de fusión (Barrera-Arellano y Block, 1993; Koletzko y Decsi, 1997; Nelson y Cox, 2001).

Los isómeros *trans* tienen siempre puntos de fusión mayores que los *cis* (Tabla 2.4.). Además de aumentar los puntos de fusión de las grasas el contenido de isómeros *trans* altera la estabilidad térmica de las estructuras cristalinas y consecuentemente la textura de los productos finales.

Tabla 2.4. Puntos de fusión de ácidos grasos y sus isómeros

Símbolo	Nombre sistemático	Nombre común	Pto. de fusión (°C)
C 12:0	Dodecanoico	Láurico	44,2
C 16:0	Hexadecanoico	Palmítico	63,1
C 18:0	Octadecanoico	Estearico	69,6
C 18:1(6c)	6c-octadecenoico	Petroselínico	29
C 18:1(6t)	6t-octadecenoico	Petroselaídico	54
C 18:1(9c)	9c-octadecenoico	Oleico	16
C 18:1(9t)	9t-octadecenoico	Elaídico	45
C 18:1(11c)	11c-octadecenoico	cis-vacénico	15
C 18:1(11t)	11t-octadecenoico	trans-vacénico	44
C 18:2(9c;12c)	9c,12c-octadecadienoico	Linoleico	-5
C 18:2(9c;12t)	9c,12t-octadecadienoico	Linoelaídico	28
C 18:2(9t; 11t)	9t,11t-octadecadienoico		54
C 18:3(9c; 12c; 15c)	9c,12c,15c-octadecatrienoico	Linolénico	-11
C 18:3(9t; 12t; 15t)	9t,12t,15t-octadecatrienoico		30
C 18:3(9c; 11t; 13t)	9c,11t,13t-octadecatrienoico	α -eleosteárico	49
C 18:3(9t; 11t; 13t)	9t,11t,13t-octadecatrienoico	β -eleosteárico	71,5

Adaptado de Barrera-Arellano y Blok (1993)

Como se había mencionado, los AGT pueden encontrarse de forma natural o generarse por procesos industriales. El primero de estos procesos se conoce como **biohidrogenación** de los AG insaturados de la dieta y es típico de la digestión microbiana en los estómagos de los animales rumiantes o el ciego de otros herbívoros. Durante este proceso los dobles enlaces “*cis*” se isomerizan, lo que afecta tanto a su posición en la cadena hidrocarbonada (isómeros de posición) como a su geometría (cambio de su configuración espacial). Como consecuencia de

ello, los tejidos de animales rumiantes serán más ricos en AG “*trans*”. De hecho, el contenido de AG “*trans*” en los tejidos y la leche de animales rumiantes es del orden del 2 al 8 % sobre el total de AG (Manteca, 1992).

Las formas *trans* son productos intermediarios en el proceso de biohidrogenación ruminal, que concluye con la saturación de los ácidos grasos (Figura 2.9.). No obstante, ciertas proporciones de AGT que se forman en este proceso escapan a la hidrogenación total y pueden encontrarse junto a sus productos finales.

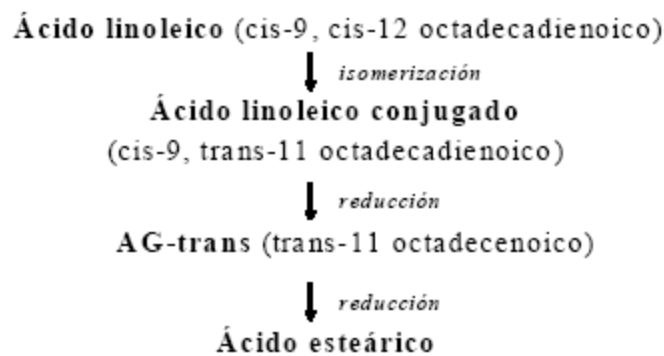


Figura 2.9. Vías de hidrogenación del ácido linoleico en el rumen (de Blas, 2004)

La isomerización también se puede generar por procesos industriales, siendo de importancia en procesos exotérmicos, como la fritura aunque es más intensa y de mayor importancia en aquellos tratamientos cuya finalidad es proteger a las grasas de la oxidación (hidrogenación, refinación, etc.). El proceso de **hidrogenación** industrial de aceites vegetales y aceite de pescado tiene como finalidad conseguir margarinas u otros productos similares que permitan mayor facilidad de almacenamiento y conservación.

El proceso consiste en hidrogenar parcialmente los dobles enlaces de diversas fuentes lipídicas a fin de elevar su punto de fusión, reduciendo de esta forma su actividad en rumen por ser más insolubles. A diferencia de la biohidrogenación (acción de enzimas microbianos), la hidrogenación se caracteriza por la acción de catalizadores (níquel, platino, paladio...) que liberan uno de los dobles enlaces, y la presencia de hidrógeno gaseoso que a presión y temperatura (110 °C) elevados satura los enlaces libres formados por la acción del catalizador. Durante la hidrogenación, es posible observar la formación de isómeros *trans*, ya que la reacción química implica la liberación de radicales libres los cuales pueden cambiar la posición y consecuentemente la configuración del doble enlace en caso de no ser saturados por el hidrógeno.

El problema a considerar con este tipo de grasas es que la hidrogenación de los ácidos grasos, especialmente de los de cadena larga, reduce su digestibilidad en el intestino delgado. Algunas de las ventajas comparativas frente a otras grasas son su mayor estabilidad por ser más saturadas y una aparente mejor palatabilidad.

En los últimos años, la prohibición del empleo de harinas de carne y otros productos de origen animal con posibles contaminaciones cruzadas en la alimentación de animales de granja, ha producido la búsqueda de materias grasas saturadas de origen vegetal. Las principales fuentes lipídicas utilizadas en la confección de estas grasas son las oleínas de palma y de pescado. La composición en ácidos grasos de estas grasas se presenta en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Composición y características químicas de las grasas hidrogenadas

Perfil Ac. Grasos (% Grasa verdadera)	GRASAS HIDROGENADAS	
	>90% (C16+C18)	<55% (C16+C18)
C<14	tr.	tr.
Mirístico C14:0	2	7
Palmítico C16:0	45	30,1
Palmitoleico C16:1	tr.	tr.
Esteárico C18:0	40	22,5
Oleico C18:1	5,2	1,1
Linoleico C18:2	<2,0	1,1
Linolénico C18:3	tr.	tr.
C≥20	-	>30,0
Título	48-55	-
MIU	<2	<1,5
Saturado/Insaturado	9	1,85

MIU: Humedad, impurezas e insaponificables. Adaptado de Tablas FEDNA (2003)

La dieta como fuente de exposición

Los ácidos grasos actúan a diferentes niveles, como fuente de energía en el alimento, como componentes de las biomembranas y como precursores de las prostaglandinas. Sin embargo, estas funciones fisiológicas pueden verse alteradas al presentarse cambios en su estructura.

La grasa de la ración contiene proporciones variables de AGT y constituye la principal vía de exposición para los animales domésticos. No se ha descrito que la ingestión de AGT provoque signos patológicos evidentes. Sin embargo, presentan un comportamiento similar a los ácidos

grasos saturados, dando lugar a menores rendimientos productivos en comparación a los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).

Se ha dado énfasis a la transferencia de AG *trans* ingeridos por los animales, tanto en tejido muscular como en la deposición de grasa corporal. Estudios realizados en diferentes especies (Allison *et al.*, 1995; Atal *et al.*, 1994; Elson *et al.*, 1981; Manteca y Noble, 1993) documentan la incorporación de AG *trans* en tejido adiposo, hepático y muscular en proporciones variables de acuerdo a la especie animal estudiada. Así por ejemplo, se encontraron niveles de AG *trans* del 4 % en muestras comerciales de músculo de ternera, 0,2 % en carne de cerdo y 1,3 % en carne de pollo. Los niveles encontrados en el tejido adiposo del epidídimo de ratones fueron entre 8,5 y 9,7 %.

Cinética y metabolismo

La ingestión de ácidos grasos *trans* (así como otros productos de alteración o contaminantes que veremos más adelante) ha generado el interés de la comunidad científica, en lo referente a sus aspectos metabólicos incluyendo su *digestión* y *absorción*, la acumulación en los tejidos, el catabolismo o la incorporación en las membranas celulares.

Tanto si son productos de la biohidrogenación como de la hidrogenación industrial, los ácidos grasos *trans* presentes en la dieta se encuentran en forma esterificada de modo que constituyen parte de triglicéridos y fosfolípidos. Así, la digestión enzimática es prácticamente la misma que para los triglicéridos o fosfolípidos constituidos por ácidos grasos de configuración *cis*. Consecuentemente, los ácidos grasos *trans* son digeridos con la misma eficacia que sus correspondientes isómeros *cis*, debido a que ninguno de los enzimas es capaz de discriminar la geometría del doble enlace de los ácidos grasos (Manteca, 1992).

Aunque existe controversia, parece que la absorción, transporte e incorporación en los tejidos de los ácidos grasos *trans* es similar a los ácidos grasos saturados y aparentemente menor a sus homólogos *cis* (Allison *et al.*, 1995; Hernandez y Boatella, 1986).

Los ácidos grasos *trans* se incorporan en el organismo de forma proporcional a su contenido en la dieta, sobre todo en las personas y en animales monogástricos. Así por ejemplo, cerdos alimentados con dietas que contenían entre 5 y 15 % de AG *trans* en la grasa total del pienso,

alcanzaron niveles de hasta 16 % de formas *trans* en lípidos hepáticos (Elson *et al.*, 1981). En el caso de los rumiantes será de acuerdo a la proporción de productos resultantes de la biohidrogenación ruminal. La mayor proporción de AG *trans* en tejidos humanos se ha encontrado en el hígado y tejido adiposo, donde pueden llegar a suponer hasta el 14 % del total de ácidos grasos. Sin embargo los porcentajes suelen ser menores y están sujetos a una marcada variabilidad entre individuos.

La incorporación de isómeros *trans* en los tejidos puede estar sujeta a control metabólico. Así por ejemplo, ratas alimentadas con dietas que contenían grasas con un 8 % de AGT y aportaban hasta el 24 % de la energía mantuvieron una concentración de AGT específica y constante en el total de la grasas corporal (18 % de *trans* totales) (Allison *et al.*, 1995). El porcentaje de los isómeros *trans* C18:1t y C18:2t en los lípidos de depósito es proporcional a la presencia de los AG de los que proceden, oleico y linoleico, respectivamente.

Los estudios realizados en animales demuestran que las tasas de reemplazo (turnover) de AG *trans* en el organismo son elevadas. La concentración de formas *trans* en los tejidos disminuye en la misma proporción en que lo hace la incorporación de estos AG en la dieta. En concreto en el estudio de Allison *et al.* (1995) se observó que al sustituir en la dieta la grasa rica en AGT (52,9%) por una grasa sin *trans*, la presencia de estos AGT en el hígado se reducía en 56 días (pasando de 17,3% a niveles prácticamente indetectables).

En estudios de oxidación lipídica, tanto *in vivo* como *in vitro*, se observó que en general las tasas de oxidación de los isómeros *trans* eran menores a la de sus correspondientes isómeros *cis*. No obstante, los resultados obtenidos en animales vivos son contradictorios ya que se han observado tasas de oxidación similares entre ambos tipos de isómeros.

Se ha supuesto que diferencias en la composición de los ácidos grasos que componen las membranas celulares podrían tener un efecto negativo sobre su integridad (Atal *et al.*, 1994). Sin embargo, no hay evidencias concretas de que la presencia de ácidos grasos *trans* modifique las propiedades de la membrana. Así, cambios en los niveles relativos de colesterol y fosfolípidos presentes en su estructura podrían compensar los posibles efectos de los isómeros *trans* (Manteca, 1992).

Toxicidad y patología asociada

No se han descrito problemas de toxicidad provocados por el empleo de AGT en la dieta de los animales o las personas, aunque no se puede afirmar que sean inocuos. Los AGT pueden generar problemas de salud ya que interfieren en la síntesis de ácidos grasos esenciales (AGE), alteran los niveles de colesterol plasmático y se relacionan con la generación de enfermedades cardiovasculares y con la actividad carcinogénica de otras sustancias químicas.

Los AGT pueden estar relacionados con la pérdida del carácter esencial de los AGE o incrementar la deficiencia de los mismos en el organismo. Al pasar de la configuración *cis* a la *trans* decrece el valor biológico incidiendo negativamente sobre el contenido de AGE. La presencia de AG *trans* en la dieta tiene una relación directa con la disponibilidad de los AGE más importantes, linoleico, precursor de la familia ω -6, y α -linolénico, precursor de la familia ω -3. Desde el punto de vista bioquímico, los AG *trans*-octadecenoico pueden inhibir la acción de las Δ 9, Δ 6 y Δ 5- desaturasas (delta-n desaturasas), interfiriendo en la formación de AGE al inicio o al final del proceso de formación del ácido araquidónico (C20:4 ω -6c), o interfiriendo en la elongación de la cadena, en la formación del ácido docosahexaenoico (C22:6 ω -3c). Por otra parte pueden actuar como sustratos alternativos que participarían en la formación de prostaglandinas de efecto desconocido o impredecible.

Con respecto a la generación de enfermedades cardiovasculares, diversos autores (Allison *et al.*, 1995; Castillo *et al.*, 2000; Hermier, 1997; Koletzko y Decsi, 1997; Léger *et al.*, 2007; Mann, 1994; Manteca, 1992; Moreno y Mitjavila, 2003; Nestel, 1995) coinciden en afirmar la relación existente entre la ingestión de AG en la dieta y la aparición o riesgo de aparición de estas patologías, sobre todo con dietas ricas en AG saturados o en isómeros *trans* que modifican sus propiedades nutricionales, alteran parámetros fisiológicos tales como los niveles plasmáticos de colesterol, la trombogénesis o los receptores de actividad hormonal, en concreto receptores de insulina. Así por ejemplo, la ingestión de 2,6 g/día del isómero C18:2(10t; 12c) incrementó la resistencia a la insulina en personas obesas aunque no se observaron manifestaciones clínicas ni daño hepático. En el caso de animales que consumieron 0,5 g del mismo isómero/día/kg peso vivo se presentaron problemas de esteatosis hepática (Léger *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que la presencia de AGT, interfiere con los receptores celulares del colesterol-LDL, aumentando su concentración sérica. A su vez, el aumento en la concentración sérica del colesterol-LDL está relacionado con el descenso en la concentración de las HDL transportadoras de colesterol (Koletzko y Decsi, 1997) cuya función es transportar el colesterol excedente hasta

el hígado donde es eliminado o transformado en hormonas, vitaminas y ácidos biliares. Altas concentraciones de colesterol en sangre dan lugar a la formación de la placa ateromatosa.

Una de las formas *trans*, el ácido linoleico conjugado (CLA, Figura 2.8.), es motivo de controversia, debido a que estudios realizados le confieren propiedades anticancerígenas. Se ha reportado su relación con la prevención de cáncer de piel, de estómago, mamario y de colon, además de poseer otras propiedades fisiológicas (antiateroesclerosis, antidiabetes, modulación del sistema inmune, reducción de la deposición de grasa corporal) (Lee *et al.*, 2005). Sin embargo, los mecanismos relacionados con esta actividad todavía no han sido identificados. Además, hay mucha variabilidad en cuanto a la dosis y el tiempo de administración; de hecho, los mejores resultados en cuanto al control en la proliferación de células cancerígenas se han observado con el suministro prolongado de altos niveles de CLA (Léger *et al.*, 2007).

2.2.1.2. Productos de oxidación

La presencia de AG es la principal responsable del valor nutricional y energético de las grasas. Debemos recordar que conforme aumenta el grado de insaturación, se incrementa su susceptibilidad a la oxidación. Numerosos estudios han demostrado que el perfil en ácidos grasos de los depósitos del animal refleja el perfil lipídico de la dieta. Así, la incorporación de altos niveles de AGPI en la ración y, consecuentemente, en los tejidos, provocan una menor estabilidad frente a la oxidación (Cortinas *et al.*, 2005; Golapakrishna y Prabhakar, 1986; Villaverde *et al.*, 2004).

Los lípidos pueden oxidarse por vía enzimática dando lugar a diversos compuestos con diferente actividad en el organismo. No obstante, los procesos oxidativos que se producen en los alimentos y que afectan a sus características nutricionales y organolépticas son, principalmente, los derivados de una vía no enzimática y están relacionados con el procesado térmico (grasas de freiduría) o el almacenamiento.

En términos generales, la **oxidación lipídica** es el proceso por el cual las materias grasas sufren la acción directa de un catalizador, por ejemplo el oxígeno, el cual sustrae uno o más átomos de hidrógeno generando radicales libres. Aparte de dar sabores y olores anormales (rancidez oxidativa), determina el descenso del valor energético, así como la destrucción de los ácidos grasos esenciales y otros compuestos biológicamente importantes (Bondi y Budowski, 1989; McDonald *et al.*, 1988).

Legislación.- A pesar de que no se dispone de una norma regulatoria establecida para el nivel de oxidación de las diferentes grasas que se utilizan en la alimentación, algunos países europeos han fijado un límite para el contenido de material polar de entre 20 y 27 %. Sin embargo, otros países prefieren la determinación de oligómeros para estimar la cantidad de sustancias alteradas, en este caso el 10 % es el límite legal permitidos para oligómeros (Gonzales-Muñoz *et al.*, 2003). En el caso de las materias grasas de empleo en nutrición animal, lamentablemente, los límites aun no están claramente definidos.

Origen y composición

Durante la oxidación, los ácidos grasos insaturados son destruidos y transformados, en un proceso dinámico, en diversos productos, en la mayoría de los casos, tóxicos para el organismo. Aunque el proceso es muy complejo, la Figura 2.10. presenta de forma esquemática las diferentes fases que suceden durante la oxidación de las grasas: una oxidación primaria, que deriva en la formación de hidroperóxidos, una oxidación secundaria que dará lugar a la formación de compuestos reactivos como es el caso del malondialdehído (MDA) e inclusive una terciaria que dará lugar a la formación de productos terciarios o finales, tales como hidrocarburos, aldehídos y cetonas; estos compuestos son volátiles pero relativamente no reactivos (Codony, 1990; Edmunds, 1990; Hamilton y Kirstein, 2003). La oxidación es una reacción en cadena que concluye en el momento en que los radicales libres han sido oxidados, fenómeno conocido por *autooxidación*.

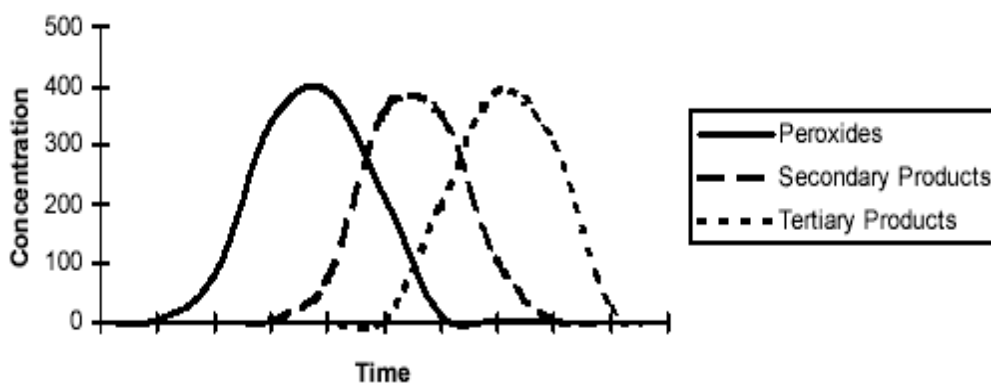


Figura. 2.10. Progresión de la oxidación de las grasas (Hamilton y Kirstein, 2003)

En condiciones normales de temperatura y humedad, la configuración en *tripleto* del oxígeno molecular (3O_2) es antienlazante (Venereo, 2002), lo que evita que pueda reaccionar

directamente con las moléculas lipídicas (reacción termodinámicamente improbable), por ello es necesaria la intervención de un agente iniciador. Entre los catalizadores más importantes capaces de iniciar la reacción de oxidación se encuentran los radicales de oxígeno, radicales lipídicos, metales de transición como el hierro (Fe) y el cobre (Cu) presentes en las metaloproteínas, la temperatura y las radiaciones de alta energía (Halliwell y Chirico, 1993). La Tabla 2.6., presenta algunos de estos catalizadores de mayor importancia en el proceso de oxidación lipídica.

Tabla 2.6. Principales radicales libres implicados en las reacciones de oxidación lipídica

Radical	Nombre	Características
HO-	Radical hidroxilo	Radical mas reactivo
HO ₂ -	Radical perhidroxilo	Muy reactivo
O ₂ -	Radical superóxido	Poca reactividad
H ₂ O ₂	Peróxido de H	Poco poder reactivo con los lípidos
LOO-	Radical peroxil	Propaga la reacción en cadena
LOOH	Hidroperóxido	Reacciona con metales de transición para formar nuevos radicales

En tales circunstancias, un radical libre R• (agente iniciador) desprende un átomo de hidrógeno de un AG, provocando la reorganización electrónica de la molécula y la consecuente formación de un radical lipídico alquilo L• (fase de iniciación). Este radical reacciona con el oxígeno O₂ y se forma un radical peroxilo LOO•, que a su vez reaccionan con proteínas de la membrana o con otros AG, provocando la propagación de la reacción de oxidación (fase de propagación).

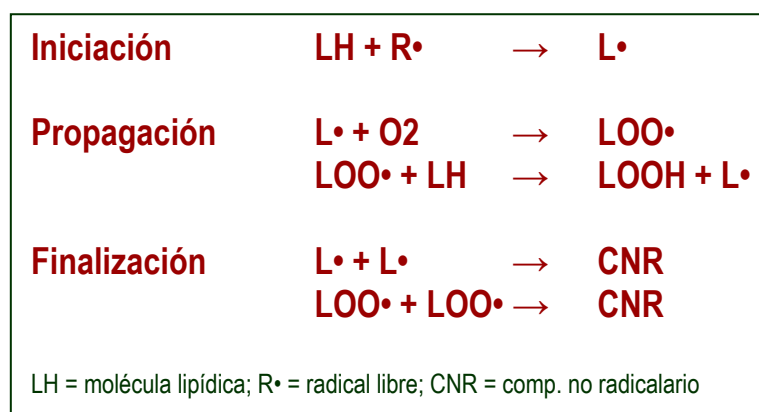


Figura 2.11. Fases en que se produce la autooxidación. Adaptado de Kanner (1994)

La extensión de la reacción dependerá de la relación lípido-proteína de la membrana, la composición en AG, la concentración de O_2 y la presencia de antioxidantes que pueden detener la propagación de la reacción. La reacción llegará a término en el momento en que los diferentes radicales reaccionen entre sí para dar lugar a compuestos no radicalarios, CNR (finalización). La velocidad de la reacción en la iniciación, es lenta mientras que en la propagación se da con mucha rapidez (Figura 2.11.).

La *fotooxidación* es la reacción de oxidación inducida por el oxígeno *singuleto* (1O_2) que no es un radical libre propiamente dicho, sino un estado excitado del oxígeno molecular y que es extremadamente reactivo. La reacción de alteración del 1O_2 se produce por la acción de la luz sobre compuestos fotosensibilizadores en presencia de oxígeno. Estos compuestos absorben la luz, entran en un proceso de sobreexcitación y transfieren el exceso de energía al oxígeno, convirtiéndolo en 1O_2 . (Galobart, 2000; Kanner, 1994). Muchos compuestos que tienen un sistema de dobles enlaces pueden adquirir esta propiedad, debido a que la presencia de los dobles enlaces les permite absorber energía de la luz visible. Entre estos compuestos están la clorofila responsable de la fotosíntesis, fármacos como las tetraciclinas, tintes (eosina), la riboflavina, la bilirrubina y algunos pigmentos que se encuentran presentes en los alimentos. Algunas sales metálicas como sulfito de Cadmio, óxido de Zinc y sulfito de Zinc pueden actuar también como agentes fotosensibilizadores.

En la **oxidación secundaria**, los hidroperóxidos formados durante la oxidación primaria y que se caracterizan por ser muy inestables, se descomponen en otros productos tanto volátiles como no volátiles: alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos e hidrocarburos volátiles. El hecho de que los hidroperóxidos se puedan degradar de diversas maneras genera una amplia variedad de productos de oxidación, que son responsables del deterioramiento organoléptico de los alimentos. Estudios relativos a la conservación de carne de pollo cocinada demuestran que entre estos productos de oxidación se incluyen hexanal, nonanal y 2,4-decadienal (De Winne y Dirink, 1996). El hexanal es considerado el responsable de olores y sabores desagradables en la carne.

La Figura 2.12., presenta la estructura química de uno de los productos de oxidación secundaria de los AG más importante, el malondialdehído (MDA). Este dialdehído se utiliza como indicador en un gran número de técnicas analíticas, ya que su concentración permite estimar el nivel de oxidación de los alimentos y tejidos.

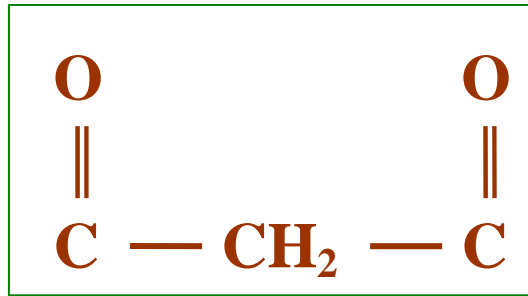


Figura 2.12. Estructura del Malondialdehído (MDA)

Los procesados térmicos de los alimentos son procesos complejos que involucran varias reacciones que afectan tanto a los triglicéridos (componente principal) como a la fracción insaponificable (esteroles, tocoferoles, caroteno y otros pigmentos) de las grasas. Estas reacciones generan un gran número de compuestos que se agrupan según la reacción que los originan, como se presenta en la Tabla 2.7. La formación de dímeros y polímeros depende del tipo de aceite, la temperatura de freído, o el número de freídos y aumentara proporcionalmente al aumento de estos dos últimos factores. Un aceite rico en ácido linoleico es mas fácilmente polimerizado que uno rico en ácido oleico (Choe y Min, 2007; Gonzales-Muñoz *et al.*, 1998; Gonzales-Muñoz *et al.*, 2003)

Tabla 2.7. Productos de la oxidación térmica de las grasas de freiduría

Reacción de oxidación:	Hidrólisis de triglicéridos:
Componentes fijos de oxidación (Triglicéridos oxidados, epóxidos, etc.)	Ácidos grasos libres
Componentes volátiles (hexanal, nonanal y 2,4-decadienal entre otros).	Diglicéridos
Oligómeros oxidados	Monoglicéridos
Óxidos de esteroides	Polimerización de triglicéridos:
	Dímeros no polares
	Otros oligómeros no polares

Adaptado de Boatella y Codony (2000)

Determinación del Nivel de Oxidación.- Determinaciones *post-mortem* documentan ampliamente el efecto de la adición de grasas poliinsaturadas susceptibles a la oxidación, y la suplementación de antioxidantes, sobre los niveles de oxidación en la carne de pollo y huevos (Bou *et al.*, 2006; Cortinas *et al.*, 2004; Galobart, 2000; Galobart *et al.*, 2001; Grau *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 1989b; Maraschiello *et al.*, 1999; Robey y Shermer, 1994; Ruiz *et al.*, 1999; Villaverde *et al.*, 2004; Villaverde, 2005; Wang *et al.*, 1997).

Además y desde esta perspectiva, es importante conocer el estado oxidativo *in vivo* para determinar cuál es la evolución que puede seguir este fenómeno en el animal y cómo puede afectar a su salud además de sus implicaciones a nivel productivo.

Una alternativa interesante es la determinación de indicadores o productos de oxidación en sangre o plasma, ya que permite evaluar el estado oxidativo del animal sin necesidad de sacrificio previo. Algunas de estas determinaciones se basan en la actividad de enzimas de defensa oxidativa del organismo como la glutatión peroxidasa (Smith *et al.*, 1988). Otras determinaciones como la tasa de hemólisis o la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) tienen a los eritrocitos como objeto de análisis.

La tasa de hemólisis permite determinar la resistencia de la membrana de los eritrocitos ante cambios osmóticos del medio. Es un buen indicador de oxidación, ya que proporciona información acerca del grado de oxidación de los lípidos que componen la membrana celular (Bureau *et al.*, 2005; Chin Sou Fei, 1995; Choque-López *et al.*, 2006; Falcione *et al.*, 1987; Fuhrmann *et al.*, 1994; Gradinski-Vrbanac *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2004; Moriguchi *et al.*, 2001; Schiavone *et al.*, 2005; Spiteller, 2003). Los agentes oxidantes o radicales libres inician un proceso de oxidación que afecta a los lípidos de la membrana y como consecuencia, la membrana celular pierde elasticidad y se hace más frágil a cambios del medio, entre ellos el choque osmótico por diferencia del gradiente de concentración, lo que da lugar a una pérdida de resistencia frente al medio extracelular (Fernandes *et al.*, 1991; Moriguchi *et al.*, 2001; Novak *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1988).

La formación de productos de oxidación secundaria reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARs), como el malondialdehído (MDA), es otro indicador, probablemente más fiable que el anterior. Esta determinación se realiza sobre todo en tejido muscular aunque también es empleada en sangre, tanto en plasma como en los eritrocitos (Beuge y Aust, 1987; Choque-López *et al.*, 2005; Engberg *et al.*, 1996; Grau *et al.*, 2000). Su empleo es muy extendido en ensayos de oxidación en seres humanos y animales de compañía, también en ratas (Draper *et al.*, 1993; Engberg *et al.*, 1996; Erba *et al.*, 2003; Ho *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2000; Kaçmaz *et al.*, 1997).

La determinación de TBARs se diferencia de la tasa de hemólisis en que refleja de manera cuantitativa la concentración de productos de oxidación secundaria. En cambio la tasa de hemólisis es una medida cualitativa que nos indica la ruptura de la membrana y la consiguiente liberación de hemoglobina.

La dieta como fuente de exposición

Al igual que para los AGT, la ingestión de alimentos constituye el mayor riesgo de exposición a los productos de oxidación generados durante el procesamiento industrial, térmico o de almacenamiento de las grasas. El interés de la comunidad científica se centra en la posibilidad de que estos productos alterados estén relacionados con la generación de patologías y en el caso de los animales domésticos, que tengan una influencia negativa en sus rendimientos productivos o su transferencia en los productos finales.

Se han obtenido resultados contradictorios relativos al efecto de la utilización de grasa oxidada sobre los parámetros productivos y estado de salud de diferentes especies productivas, y en concreto en pollos de carne. En el trabajo de Oertel y Hartfiel (1982) no se observaron diferencias entre el consumo de alimento, la ganancia de peso y la eficiencia en conversión alimenticia entre pollos alimentados con una dieta que contenía 7 % de aceite de soja oxidado y los que consumían el aceite de soja sin oxidar. Resultados similares fueron obtenidos por Galobart *et al.* (2001) en gallinas ponedoras y por Liu y Huang (1996) en ratas. Otros autores han demostrado que los piensos suplementados con grasas oxidadas tienen un mayor riesgo de enranciamiento lipídico, y por lo tanto, una pérdida del valor nutritivo. Como consecuencia se produce el efecto negativo observado sobre el consumo y la digestibilidad de los nutrientes (Dibner *et al.*, 1996; Eder *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 1989b; Sheehy *et al.*, 1994; Sheehy *et al.*, 1993).

A pesar de que no se tienen muchas referencias del efecto de lípidos oxidados en la dieta sobre la morfología intestinal, algunos autores han observado una disminución de la vida media de los enterocitos y cambios en la tasa de captación de nutrientes por células epiteliales, debido posiblemente a los componentes tóxicos de la grasa oxidada, entre ellos productos secundarios de oxidación como aldehídos y cetonas (Chin Sou Fei, 1995; Dibner *et al.*, 1996) .

El empleo de lípidos oxidados en la alimentación de las aves también podría estar relacionado con la proliferación de microorganismos patógenos (*Clostridium perfringens*, *Salmonella spp*, *Campylobacter spp* ó *E. coli*) o la infestación de parásitos, sobre todo del género *Eimeria* (Collier *et al.*, 2003). Así mismo se ha descrito la interacción de antioxidantes como la vitamina E, que se traduce en un aumento en los conteos de oocistos de *Eimeria* por gramo de excreta. En este caso, el mecanismo no está claramente definido, sin embargo, el efecto antioxidante de la vitamina, que actúa como un inhibidor de estrés oxidativo en el animal, aparentemente también podría darse en el parásito (Allen *et al.*, 1996; Allen y Fetterer, 2002; Choque-López *et al.*, 2006).

Cinética y metabolismo

La información sobre la *digestibilidad* y *absorción* de las grasas de freiduría es muy controvertida. Existe la concepción general de que la digestibilidad decrece cuando se consumen dietas que contienen grasas oxidadas (residuo de freiduría). Algunos trabajos en los que se emplearon grasas termooxidadas no reportaron importantes cambios, aparentemente los lípidos oxidados son hidrolizados por los enzimas pancreáticos (lipasa pancreática) en igual magnitud que los lípidos sin oxidación previa. Otros estudios reportan una disminución de monoglicéridos y ácidos grasos libres en el lumen intestinal como consecuencia de la baja actividad de la lipasa pancreática cuando los aceites utilizados contenían mayor concentración de oligómeros (dímeros y polímeros de triglicéridos) en la fracción polar. A pesar de todo, los datos correspondientes a la digestibilidad de dichos oligómeros son aun confusos (Gonzales-Muñoz *et al.*, 1998; Sánchez-Muniz *et al.*, 1999).

Hidroperóxidos lipídicos y productos de oxidación secundaria pueden ser absorbidos en el intestino delgado; más aún, los triglicéridos parcialmente oxidados que contienen al menos una función oxigenada son absorbidos rápidamente y pueden catalizar reacciones de peroxidación *in vivo*, que podrían ocasionar cambios en los carbohidratos hepáticos o estar acompañados de una reducción en la concentración de antioxidantes plasmáticos o tisulares (como el α -tocoferol en el tejido muscular), reduciendo la estabilidad oxidativa de la canal (Dibner *et al.*, 1996; Sheehy *et al.*, 1993). Además, la ingestión de grasas oxidadas puede favorecer el estrés oxidativo, ya que una vez absorbidas, se incorporan a los fosfolípidos de la membrana de las células, alterando la fluidez de la misma (Turek *et al.*, 2003).

Una vez absorbidos, pueden ser incorporados dentro de los quilomicrones (portomicrones en el caso de las aves) y llegar al hígado a través de la circulación portal, esterificándose en complejos lipídicos que se incorporarán a las lipoproteínas. De esta manera, generan LDL (low density lipoprotein) oxidativamente modificadas e ingresan en el metabolismo lipídico. Se ha comprobado la relación entre estas moléculas LDL oxidadas y la generación de problemas de salud cardiovasculares (Eder *et al.*, 2003; Penumetcha *et al.*, 2000; Staprans *et al.*, 1996).

Toxicidad y patología asociada

La oxidación de las grasas provoca una reducción de su valor nutritivo, debido a la destrucción de AGPI, vitaminas liposolubles y aminoácidos. Su toxicidad está asociada a la capacidad de generar compuestos de oxidación, los cuales una vez ingeridos pueden depositarse en los tejidos y ser responsables de la aparición de diversas patologías descritas principalmente en humanos.

Hay evidencias de que el consumo de lípidos oxidados en distintas especies animales tiene implicaciones en la respuesta inmune. Una severa oxidación de los lípidos dietéticos puede causar deficiencia de antioxidantes y en concreto de vitamina E (Liu y Huang, 1996; Sheehy *et al.*, 1993), generando severos cuadros de encefalomalacia (Lin *et al.*, 1989a; Wang *et al.*, 1997) e inmunoincompetencia (Turek *et al.*, 2003). Esto incluye una reducida proliferación de linfocitos y una reducida actividad de la superóxido dismutasa en los macrófagos. Se ha visto además un aumento de leucocitos de respuesta inflamatoria, asociado a este proceso (Dibner *et al.*, 1988; Robey y Shermer, 1994).

La superóxido dismutasa participa en el mecanismo de respuesta celular en la prevención de estrés oxidativo y se ve disminuida en los macrófagos, en estados de deficiencia de vitamina E. Staprans *et al.* (1993) sugieren una mayor captación de peróxidos por los macrófagos (lo que explicaría la disminución de superóxido dismutasa), que se traduce en un aumento en la formación de células espumosas (macrófagos que acumulan lípidos, principalmente colesterol); este fenómeno incrementa la citotoxicidad de células endoteliales, provocando a su vez daño endotelial. Ambos fenómenos, daño endotelial y acumulación de lípidos en los macrófagos son considerados otros de los agentes etiológicos en la aterogénesis cardiovascular. Adicionalmente, los peróxidos interfieren en el transporte de las lipoproteínas (como se había mencionado, con la formación de LDL oxidadas), en concreto, en el papel preventivo de las HDL (high density lipoprotein) con respecto a la formación de las placas ateromatosas.

Algunos trabajos (Mayne, 2003; Turek *et al.*, 2003; Udilova *et al.*, 2003; Venereo, 2002) enfatizan la actividad carcinogénica de los radicales prooxidantes, interfiriendo en la replicación celular, a través de la alteración en la síntesis de proteínas por daño a un gen específico o por modificaciones oxidativas de las bases constituyentes del material genético (DNA oxidativamente modificado). Sin embargo, el mecanismo concreto por el cual se produce esta alteración no está firmemente establecido.

La reducción del apetito, disminución de la tasa de crecimiento, diarreas, cambios histológicos, artritis, inflamación intestinal, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades oculares y deficiencia en la formación de los huesos en animales en desarrollo pueden ser otros de los efectos de la ingestión de lípidos oxidados

2.2.2. CONTAMINACIÓN ORGÁNICA DE LAS GRASAS

Las dioxinas, los policlorobifenilos (PCBs) así como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) han generado una gran preocupación, debido a su elevada toxicidad y sus propiedades carcinogénicas. Estos productos son originados principalmente en procesos de combustión o como residuos de la industria de las pinturas, entre otros. El problema radica, fundamentalmente, en el hecho de que poseen propiedades lipofílicas, motivo por el cual tienden a asociarse a sustratos grasos.

2.2.2.1. Dioxinas y Policlorobifenilos

Las dioxinas y los policlorobifenilos (PCBs) han sido objeto de numerosos estudios por su relación con la contaminación ambiental, su efecto negativo sobre la salud y su implicación en diversas alertas alimentarias. Entre ellas destacar las ocurridas en Yusho (Japón) en 1968 donde se detectaron niveles de contaminación en leche materna, en la guerra de Vietnam en los años 70 como consecuencia del uso del herbicida denominado “agente naranja”, en Seveso (Italia) en 1976, el conocido incidente de los pollos belgas del año 1999 o el reciente envenenamiento del presidente de Ucrania Viktor Yushchenko ocurrido en el año 2004 (Schechter *et al.*, 2006). La importancia de estos contaminantes queda patente en diversas revisiones y pruebas experimentales (Anton y Lizaso, 2001; Bernard *et al.*, 1999; Bernard *et al.*, 2002; De Vries *et al.*, 2006; Gallego *et al.*, 2005; Gorrachategui, 2001; Guitart, 2002; Moser y McLachlan, 1999; Sapkota *et al.*, 2007; SCAN, 2000; Schechter *et al.*, 1998; Schmid *et al.*, 2002; Tard *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre dioxinas y PCBs están enfocados a la salud humana y/o al efecto sobre la salud de animales silvestres o acuáticos. La información relacionada con el efecto sobre animales de granja todavía es escasa.

El término *dioxina* engloba una gran variedad de compuestos químicos, de diferente potencial tóxico, 135 congéneres de los policlorodibenzofuranos (PCDFs) y 75 congéneres de las dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD). Entre estos compuestos 17 son considerados tóxicos para el

hombre; la 2, 3, 7, 8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina, conocida también como “dioxina de Seveso”, es la más peligrosa y se considera como la sustancia más tóxica producida por el hombre.

De los 209 congéneres de los *policlorobifenilos* (PCBs), 12 presentan propiedades tóxicas similares a las dioxinas y reciben el nombre de compuestos coplanares o análogos a las dioxinas (dioxin-like compounds).

Las *dioxinas* (PCDDs/Fs) y *PCBs* son compuestos químicos de toxicidad variable y se caracterizan por estar constituidos de una base orgánica asociada a átomos de cloro. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y permanecen estables a la degradación por mucho tiempo, razón por la cual se las clasifica dentro de los contaminantes orgánicos persistentes (persistent organic pollutants, POPs). Además deben incluirse otros compuestos análogos a los mencionados pero que, en lugar de cloro, llevan bromo (polibromados), aunque su actividad tóxica puede ser menor.

Legislación.- A pesar de la relativamente extensa lista de procesos que pueden originar dioxinas y PCBs, el riesgo de contaminación por estos agentes para el hombre está sujeto principalmente a la ingestión de alimentos de origen animal. La prevención de la contaminación de los alimentos es el objetivo principal al momento de definir políticas regulatorias de la emisión de estas sustancias tóxicas y de su contenido en los alimentos destinados a la alimentación tanto humana como animal.

Las alertas alimentarias provocadas por este grupo de contaminantes han hecho que las autoridades sanitarias establezcan normas regulatorias destinadas a evitar problemas de salud no sólo en las personas, sino también en los animales que se vean expuestos a su actividad tóxica. Al respecto de la ingestión de dioxinas, el Diario Oficial de la Unión Europea ha publicado, en febrero del año 2006, un reglamento (Reglamento (CE) N° 199/2006, 2006) en el que se fijan los contenidos máximos de contaminantes (dioxinas y PCBs) en productos alimentarios de consumo humano. La Tabla 2.8., recoge los puntos más importantes de esta publicación.

En el caso de productos destinados a la alimentación de los animales, también el año 2006 ha sido publicada la Directiva 2006/13/CE (2006), que establece los límites permitidos, en cuanto al nivel de contaminación de dioxinas y PCBs de las diferentes materias utilizadas en la preparación de los piensos animales. Los aspectos más importantes de esta directiva se presentan en la Tabla 1., del apartado de anexos (Anexo 1).

Tabla 2.8. «Sección 5. Dioxinas.- Suma de policlorodibenzo-*para*-dioxinas (PCDD), policlorodibenzofuranos (PCDF) y policlorobifenilos (PCB) expresada en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (EQT-WHO), utilizando los factores de equivalencia de toxicidad de la misma organización (Reglamento (CE) N° 199/2006, 2006)

Productos alimenticios	Contenido máximo Suma de dioxinas y furanos (EQT PCDD/F-WHO) (*)	Contenido máximo Suma de diox., furanos y PCBs (EQT PCDD/F+PCBs-WHO) (*)
Carne y productos cárnicos (**) o De rumiantes (bovinos y ovinos) o De aves de corral y caza de cría o De porcino Hígado y productos derivados procedentes de animales terrestres	3,0 pg/g grasa (***) 2,0 pg/g grasa (***) 1,0 pg/g grasa (***) 6,0 pg/g grasa (***)	4,5 pg/g grasa (***) 4,0 pg/g grasa (***) 1,5 pg/g grasa (***) 12,0 pg/g grasa (***)
Carne de pescado y productos de la pesca y sus productos derivados, excepto la anguila(****), (*****) o Carne de anguila (<i>Anguilla anguilla</i>) y sus productos	4,0 pg/g peso en fresco 4,0 pg/g peso en fresco	8,0 pg/g peso en fresco 12,0 pg/g peso en fresco
Leche (*****) y productos lácteos, incluida la grasa de mantequilla	3,0 pg/g grasa (***)	6,0 pg/g grasa (***)
Huevos de gallina y ovoproductos (*****)	3,0 pg/g grasa (***)	6,0 pg/g grasa (***)
Materias grasas de origen animal o De rumiantes o De aves de corral y caza de cría o De porcino o Mezcla de grasas de origen animal Materias grasas de origen vegetal Aceite marino (aceite de pescado, aceite de hígado de pescado y aceites procedentes de otros organismos marinos destinados al consumo humano)	3,0 pg/g grasa 2,0 pg/g grasa 1,0 pg/g grasa 2,0 pg/g grasa 0,75 pg/g grasa 2,0 pg/g grasa	4,5 pg/g grasa 4,0 pg/g grasa 1,5 pg/g grasa 3,0 pg/g grasa 1,5 pg/g grasa 10,0 pg/g grasa

(*) Concentraciones máximas: las concentraciones del límite superior se calculan dando por sentado que todos los valores de los diferentes congéneres por debajo del límite de detección son iguales a este límite

(**) Carne de bovino, ovino, porcino, aves de corral y caza de cría conforme a la definición del anexo I del Reglamento (CE) n° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo (DO L 139 de 30.4.2004, p. 22), excluidos los despojos no comestibles definidos en el mencionado anexo.

(***) Los contenidos máximos no se aplican a los productos alimenticios con un contenido < 1 % de grasa.

(****) Carne de pescado y productos de la pesca tal como se definen en las categorías a), b), c), e) y f) de la lista del artículo 1 del Reglamento (CE) n° 104/2000 del Consejo (DO L 17 de 21.1.2000, p. 22. Reglamento modificado por el acta de adhesión de 2003). Los contenidos máximos se aplican a los crustáceos, excluida la carne oscura de cangrejo, así como la carne de la cabeza y el tórax de la langosta y de crustáceos similares de gran tamaño (*Nephropidae* y *Palinuridae*) y los cefalópodos sin vísceras.

(*****) Si el pez está destinado a ser consumido entero, el contenido máximo se aplicará al pez entero.

(*****) Leche (leche cruda, leche para la fabricación de productos lácteos y leche tratada térmicamente) tal como se define en el anexo I del Reglamento (CE) n° 853/2004.

(*****) Huevos de gallina y ovoproductos tal como se definen en el anexo I del Reglamento (CE) n° 853/2004.».

Estructura química y composición

Su estructura básica la constituyen dos anillos aromáticos, unidos por átomos de oxígeno. A su vez, la presencia del oxígeno determinará a que tipo de contaminante corresponde cada estructura. En otras palabras, la presencia de dos átomos de oxígeno es característica de las PCDD (Figura 2.13.A), un átomo de oxígeno distingue a los PCDF (Figura 2.13.B.) y la ausencia de oxígeno a los PCBs (Figura 2.13.C)

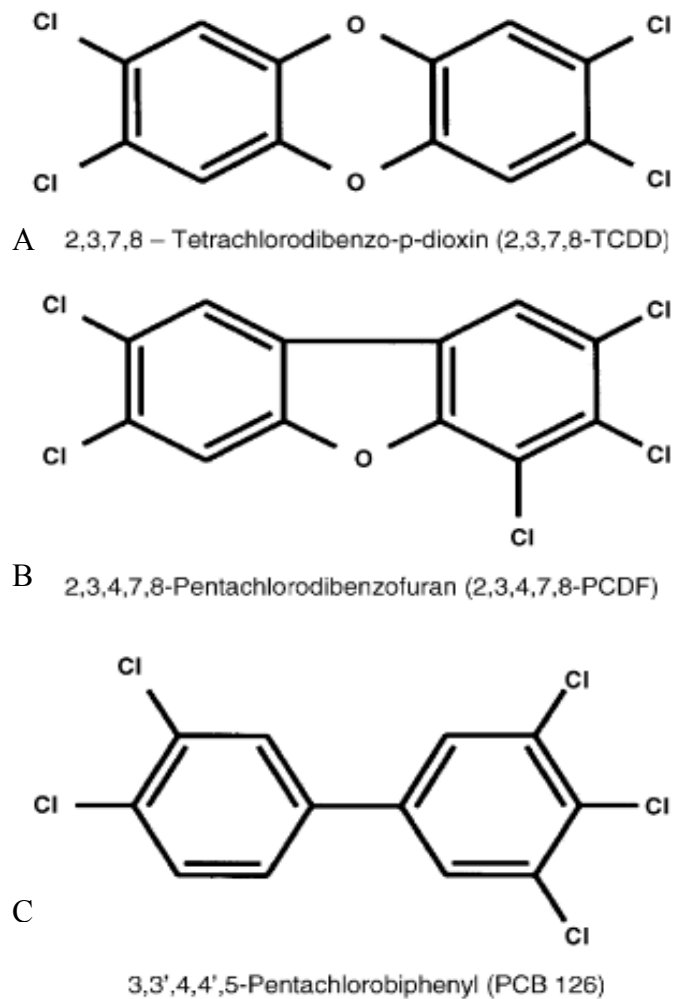


Figura 2.13. Estructura química de las principales dioxinas, dibenzofuranos y PCBs

Como puede apreciarse en la Figura 2.13., los hidrógenos que saturan las diferentes posiciones de los anillos aromáticos pueden ser reemplazados por átomos de cloro. De esta manera, en el caso de las dioxinas (PCDDs y PCDFs), el número máximo de átomos de cloro de su estructura es de 8 y en el caso de los PCBs es de 10. Las estructuras químicas en las que el hidrógeno es reemplazado por 4 a 6 átomos de cloro son las que tienen mayor actividad tóxica.

Las PCDDs son simétricas tanto en el plano horizontal como en el vertical, por lo que su configuración se verá afectada tanto por el número de cloros como por su posición. Por este motivo, los productos de las diferentes cloraciones posibles no pueden denominarse “isómeros” propiamente dichos (en un isómero puede cambiar la posición pero no la cantidad). Los diferentes PCDDs existentes se denominan “congéneres”. La tabla 2.9., presenta las posibles combinaciones en las que los átomos de cloro reemplazan a los de hidrogeno.

Tabla 2.9. Posibles congéneres de dioxinas y PCBs, según el nº de átomos de Cl

Nº de Cloros	Isómeros PCDD	Isómeros PCDF	Isómeros PCBs
1	2	4	3
2	10	16	12
3	14	28	24
4	22	38	42
5	14	28	46
6	10	16	42
7	2	4	24
8	1	1	12
9	-	-	3
10	-	-	1
Total congéneres	75	135	209

Adaptado de Guitart (2002)

Origen y persistencia en el medio ambiente

Las dioxinas no tienen utilidad para el hombre, a diferencia de los PCBs que se han utilizado en la industria de las pinturas y plásticos. No obstante, se generan grandes cantidades (directa o indirectamente) de estos compuestos en diversos procesos industriales que implican cloro, carbono y calor. De igual manera, los procesos naturales como las erupciones volcánicas, pueden generar también dioxinas así como otros compuestos policíclicos. La tabla 2.10., presenta las fuentes de generación de dioxinas.

Tabla 2.10. Fuentes de generación de dioxinas

Procesos industriales y químicos	Procesos de combustión
Industria química	Incineración de residuos industriales
Industria del papel y de la pulpa del papel	Incineración de residuos hospitalarios
Fabricación de PVC	Incineración de residuos sólidos urbanos
Industria del asfalto y del cemento	Fuentes de combustión doméstica
Industrias metalúrgica y siderúrgica	Tráfico vehicular
Combustión de combustibles fósiles	Nafta con plomo
Estufas y hornos de leña, y calefacciones	Fuel-oil de baja calidad
Incendios de automotores, edificios y rellenos	Reciclaje y fundición de aluminio y acero
Cenizas de hornos, calderas, etc.	Pesticidas (insecticidas, herbicidas,...)
Procesos naturales	Plantas de desguace de vehículos
Erupciones volcánicas	Combustiones de cigarrillos
Incendios forestales o de otra biomasa	Antisépticos
Reacciones enzimáticas y fotolíticas	Conservadores de madera y Compost

Adaptado de Gallego *et al.* (2005)

Su marcado carácter lipofílico y persistencia en el medio ambiente, así como una elevada vida media en los tejidos animales, hace que las dioxinas y PCBs manifiesten tendencia a la acumulación, conforme pasan de un individuo a otro de la cadena trófica. La figura 2.14., presenta como se lleva a cabo este proceso en el que la concentración aumenta desproporcionadamente sin que ello dependa necesariamente del grado de contaminación ambiental. Este fenómeno se conoce como bioacumulación o biomagnificación.

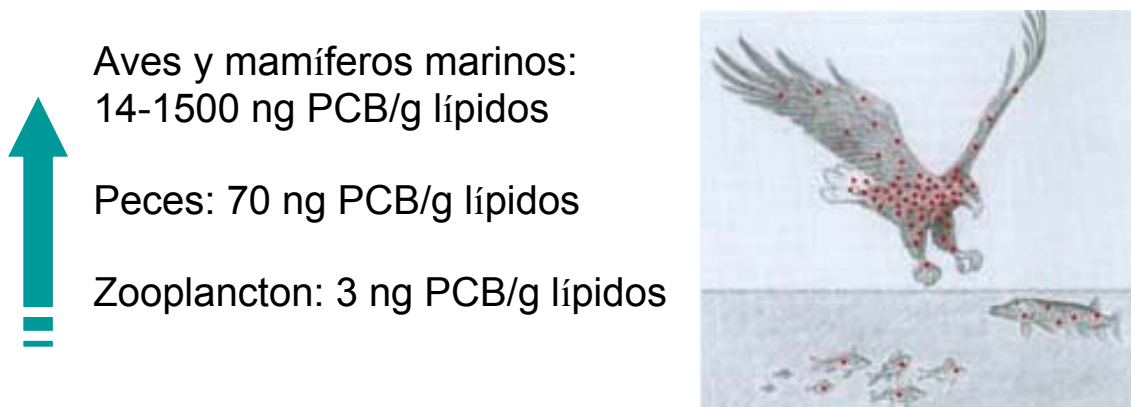


Figura 2.14. Biomagnificación de la concentración de dioxinas en la cadena trófica (Díaz, 2007)

La **vida media** de las dioxinas en el organismo vivo es variable de acuerdo a la especie. Así por ejemplo, la vida media de la 2, 3, 7, 8-TCDD se estima entre 5,1 y 11,3 años en el hombre, en tanto que en roedores es usualmente de 2 a 4 semanas o de 6 a 8 semanas en primates no humanos (Gorrachategui, 2001; Schechter *et al.*, 2006).

Fuentes de exposición

Una vez originadas por cualquiera de los procesos mencionados líneas arriba, las dioxinas y PCBs presentan una amplia distribución en el medio ambiente y pueden contaminar un sin fin de eslabones de la cadena trófica. Las Figuras 2.15., y 2.16., muestran las posibles *vías de entrada* de las dioxinas en la cadena alimentaria. A partir de la fuente de contaminación, son emitidas en forma de gas y se transportan en el aire y el agua, depositándose en el suelo y los sedimentos. De esta manera, pueden llegar a los vegetales comestibles o la hierba destinada al ganado (en zonas contaminadas el heno puede llegar a poseer hasta 50 pg de dioxinas/g de materia seca), ingresando en la cadena agro-alimentaria o incorporándose al lecho marino.

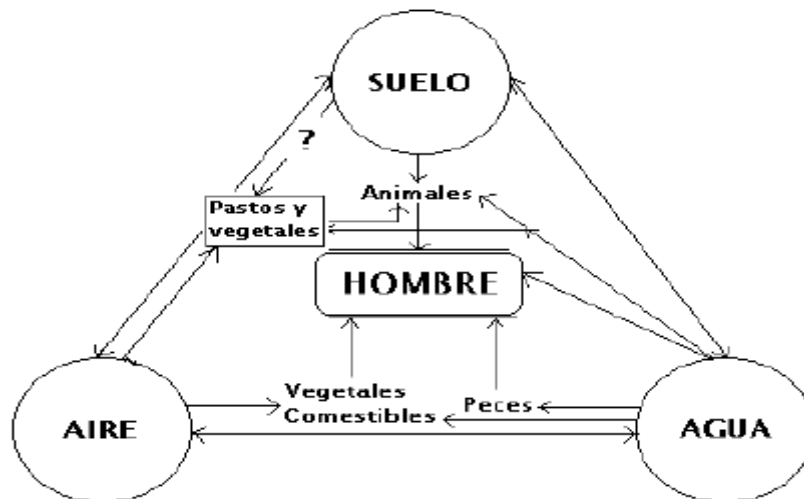


Figura 2.15. Posibilidades de entrada de las dioxinas en la cadena alimentaria

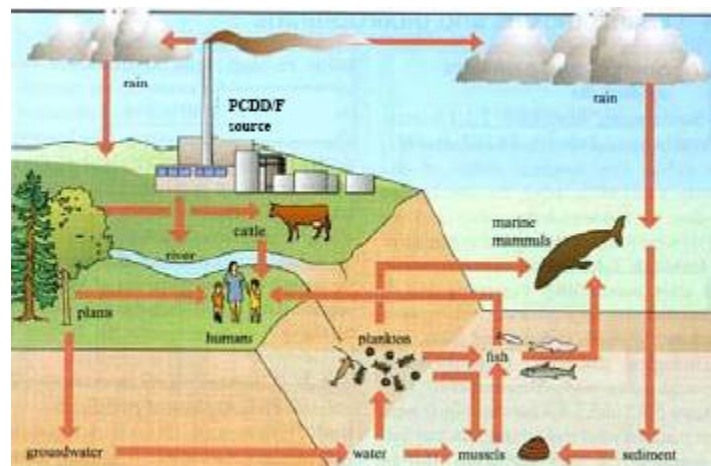


Figura 2.16. Vías de contaminación en las cadenas tróficas humana y animal.

Otra vía de entrada es la eliminación fraudulenta de sustancias contaminadas a través de vertidos incontrolados o su incorrecta adición en piensos para animales, como se ha visto en el incidente de los pollos belgas. Una mayor información acerca de este suceso se encuentra en el trabajo elaborado por Bernard *et al.* (2002).

Los animales ingieren proporciones variable de dioxinas provenientes principalmente de los pastos contaminados o de piensos que hayan sido expuestos a los contaminantes, que se acumulan en el tejido graso o bien son vehiculados a través de la leche o los huevos. Así por ejemplo, en un estudio realizado en Francia, bovinos de leche que pastan en sitios alejados de actividad industrial manifestaron niveles “habituales” de 1 ng de dioxinas/kg de grasa, en tanto que bovinos que pastan cerca de áreas industriales generadoras de dioxinas alcanzaron niveles alarmantes de hasta 15-30 mg de dioxinas/g de grasa (Gallego *et al.*, 2005). Por otro lado, el contenido de dioxinas en huevos alcanzó niveles experimentales de hasta 305 ng/kg de grasa,

concentrándose en la yema de huevo (Pirard y De Pauw, 2005), en tanto que a nivel comercial se encontraron huevos con hasta 150 ng/kg de grasa (Gorrachategui, 2001).

En determinaciones realizadas por Ábalos *et al.* (2007. Comunicación personal) en el marco del proyecto Feeding Fats Safety, el tejido muscular de pollos y conejos alimentados con piensos contaminados con dioxinas y PCBs alcanzó niveles totales de 16,71 pg WHO-TEQ PCDD/Fs + DL-PCBs/g de grasa y de 3,54 pg WHO-TEQ PCDD/Fs + DL-PCBs/g de grasa, respectivamente para cada especie. De este total, 0,407 pg/g de grasa correspondían al 2,3,7,8-TCDD en el caso de los pollos y 0,115 pg/g de grasa en el caso de los conejos. Los piensos fueron elaborados añadiendo aceite de pescado comercial contaminado. Estos datos aún no han sido publicados, sin embargo, los autores concluyen que las muestras de tejido muscular de los pollos podrían exceder el nivel máximo de 4 pg WHO-TEQ PCDD/Fs + DL-PCBs/g de grasa, establecido por la Comisión de la Unión Europea (Directiva 2006/13/CE, 2006).

Los lechos marinos contaminados influyen negativamente sobre los seres vivos que componen su cadena trófica. De esta manera (tal como se muestra en la figura 2.16.), tanto el fitoplancton como el zooplancton contaminan a los peces u organismos marinos que los consumen (Bell *et al.*, 2006), muchos de los cuales son especies incluidas en la cadena alimentaria humana. Existe un gran riesgo de exposición a partir de peces u otras especies marinas, principalmente en países en los que el consumo de productos marinos constituye gran parte de su dieta.

Cinética y metabolismo

Las dioxinas y PCBs pueden ingresar en el organismo a través de la piel (absorción cutánea), por vía respiratoria (inhalación en forma de gases) o por vía digestiva, asociadas a moléculas grasas, siendo esta la principal vía de entrada. La *ingestión* de dioxinas a través del alimento constituye entre el 80 y el 95 % de la incorporación total en el ser humano, en tanto que la exposición como consecuencia de inhalaciones o el contacto con la piel es menor a 10 % (Gorrachategui, 2001; Tard *et al.*, 2007) y no se ha demostrado que representen un riesgo potencial. Hay evidencias que sugieren una mayor exposición a las dioxinas en personas que viven en países más industrializados (Schechter *et al.*, 2006).

Tras la ingestión, las dioxinas y PCBs presentan poca o nula *digestión* en el tracto gastrointestinal esto se basa en el hecho de que poseen una elevada estabilidad química, que las constituye en un mal sustrato para los enzimas digestivos.

PCDDs y PCDFs cuyos átomos de hidrogeno fueron sustituidos por átomos de cloro en las posiciones 2, 3, 7, y 8 son los compuestos que se absorben con mayor facilidad, por eso son potencialmente tóxicos. Como se había mencionado, generalmente ingresan en el tracto digestivo asociados a moléculas de lípidos. Sin embargo es posible encontrar moléculas de estas sustancias libres en la suspensión digestiva y que son absorbidos por difusión pasiva.

La *absorción* decrece conforme aumenta el número de átomos de cloro de la molécula contaminante. Se asume que el paso de componentes hidrofóbicos a través de las paredes intestinales podría estar limitado predominantemente por el tamaño molecular y la solubilidad en agua. Esto confirmaría el hecho de que la absorción de PCDDs y PCDFs disminuya según el tamaño de la molécula, ya que la solubilidad de las mismas también decrece conforme el tamaño molecular aumenta (Gorrachategui, 2001; Pirard y De Pauw, 2005).

Las dioxinas y PCBs que han sido absorbidos ingresan en el metabolismo lipídico incorporándose a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Atraviesan fácilmente las barreras biológicas y pueden *depositarse* en los tejidos grasos en una proporción de entre 7 y el 54 %, en el hígado aproximadamente 1 %. Una vez acumulados en el animal, cualquier actividad fisiológica como la lactación o gestación movilizará estas reservas de dioxinas, lo que explica las elevadas tasas de contaminación en leche y derivados lácteos. Sin embargo, una vez controlada la exposición la concentración de dioxinas en la leche desciende en unos meses

Pueden también atravesar la placenta, en cuyo caso se acumularán en los embriones, no obstante eso dependerá del grado de engrasamiento de los mismos. Por otro lado, también pueden acumularse en la yema del huevo en una proporción superior al 25 % cuando las gallinas ponedoras son expuestas al contaminante (De Vries *et al.*, 2006). En este sentido, se ha observado una elevada mortalidad (del orden del 80 %) en embriones en huevos fértiles expuestos a elevados niveles de estos contaminantes (De Vries *et al.*, 2006; Gallego *et al.*, 2005).

Por otro lado, hay evidencias que sugieren la relación de las dioxinas con proteínas celulares llamadas receptores celulares de hidrocarburos aromáticos (aryl hydrocarbon receptor, AhR). Las dioxinas y PCBs pueden intervenir en la activación de estos receptores. Las AhR son ligandos (elementos de unión) intracelulares que se asocian al DNA como factores de transmisión, y están involucrados en la regulación de la expresión de un gran número de genes.

La activación del receptor puede afectar a genes que codifican la síntesis de enzimas como citocromo oxigenasas o glutatión transferasas. A su vez, las formas activas de las AhR también interactúan con otras proteínas reguladoras tales como quinasas celulares y proteínas involucradas en la apoptosis celular. Adicionalmente, su acción podría estar relacionada con la regulación de proteínas durante el desarrollo somático y la homeostasis (Gorrachategui, 2001; Schecter *et al.*, 2006).

Una parte de las dioxinas que ingresan en el organismo son *excretadas* a través de las heces u orina. Se ha comprobado que las dioxinas presentes en las heces se caracterizan por presentar un elevado número de átomos de cloro, más de 7 átomos de cloro, lo que reforzaría la hipótesis de la mala absorción de dioxinas con altos pesos moleculares. La concentración de dioxinas en las excretas de aves sugiere la existencia de una elevada tasa de eliminación que aumenta entre las 2 y las 5 semanas de exposición, periodo en el cual parece estabilizarse con tasas de eliminación de dioxinas (300-350 pg TEQ PCDD-PCDFs/g) relativamente homogéneas hasta las 10 semanas (Pirard y De Pauw, 2005). Aparentemente hay una estabilización en la excreción de dioxinas conforme avanza el tiempo de exposición.

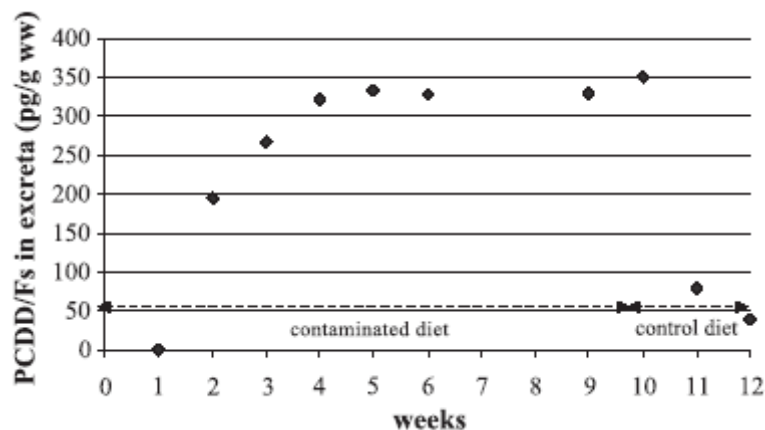


Figura 2.17. Concentración de la suma de 2, 3, 7, 8-PCDD/F congéneres, en base a la materia fresca (wet weight basis), encontrada en la excreta de aves durante el periodo de exposición de 12 semanas (Pirard y De Pauw, 2005).

Toxicidad

Como se había mencionado, la 2, 3, 7, 8-TCDD es la dioxina más tóxica, razón por la cual sirve de referencia al momento de evaluar el potencial tóxico de estas sustancias. Para ello se ha establecido una unidad de medida, el TEF (Toxic Equivalency Factor), que asigna arbitrariamente a esta dioxina el valor de 1, como valor de máxima toxicidad. A partir de esta medida se considera la equivalencia tóxica de dioxinas y PCBs, en comparación con ella. La

Tabla 2.11., presenta los factores de toxicidad relativa establecida para dioxinas, dibenzofuranos y PCBs por la Organización Mundial de la Salud (WHO), que se utiliza corrientemente para medir la magnitud de la intoxicación o presencia de dioxinas y PCBs.

Tabla 2.11. Factores de equivalencia tóxica (TEFs), establecidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO)

		WHO TEF
Dioxins	2,3,7,8-Tetra-CDD	1
	1,2,3,7,8-Penta-CDD	1
	1,2,3,4,7,8-Hexa-CDD	0.1
	1,2,3,6,7,8-Hexa-CDD	0.1
	1,2,3,7,8,9-Hexa-CDD	0.1
	1,2,3,4,6,7,8-Hepta-CDD	0.01
	OCDD	0.0001
Dibenzofurans	2,3,7,8-Tetra-CDF	0.1
	1,2,3,7,8-Penta-CDF	0.05
	2,3,4,7,8-Penta-CDF	0.5
	1,2,3,4,7,8-Hexa-CDF	0.1
	1,2,3,6,7,8-Hexa-CDF	0.1
	1,2,3,7,8,9-Hexa-CDF	0.1
	2,3,4,6,7,8-Hexa-CDF	0.1
	1,2,3,4,6,7,8-Hepta-CDF	0.01
	1,2,3,4,7,8,9-Hepta-CDF	0.01
OCDF	0.0001	
Coplanar PCBs	3,3',4,4'-TCB (77)	0.0001
	3,4,4',5-TCB (81)	0.0001
	3,3',4,4',5-PeCB (126)	0.1
	3,3',4,4',5,5'-HxCB (169)	0.01
Mono-ortho-PCBs	2,3,3',4,4'-PeCB (105)	0.0001
	2,3,4,4',5-PeCB (114)	0.0005
	2,3',4,4',5-PeCB (118)	0.0001
	2',3,4,4',5-PeCB (123)	0.0001
	2,3,3',4,4',5-HxCB (156)	0.0005
	2,3,3',4,4',5'-HxCB (157)	0.0005
	2,3',4,4',5,5'-HxCB (167)	0.00001
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (189)	0.0001

(Schechter *et al.*, 2006)

El sumatorio de las concentraciones de los diferentes congéneres presentes en una muestra multiplicadas por sus respectivos TEFs constituye el equivalente tóxico (TEQ) de la mezcla analizada. Este valor final refleja el verdadero potencial tóxico de la mezcla de dioxinas y PCBs.

Las aves y los peces son mas sensibles a la exposición de dioxinas que los animales mamíferos.

La *dosis letal media* (DL₅₀, la dosis suficiente para matar a la mitad de la población, en un período de tiempo determinado) para la 2, 3, 7, 8-TCDD de aves domésticas está alrededor de 25 a 50 µg/kg de peso vivo (PV), en tanto que los peces tienen una DL₅₀ de 2 a 23 µg/kg. PV; la muerte sobreviene, en ambos casos, en días (Gorrachategui, 2001; Guitart, 2002).

Patología asociada y cáncer

La ingestión de dioxinas está asociada a un gran número de manifestaciones patológicas agudas y crónicas que pueden afectar no sólo a la salud y productividad de los animales sino, lo que es más importante a la salud de las personas. La Tabla 2.12., resume las principales manifestaciones clínicas provocadas por la ingestión de estos compuestos tóxicos. La intoxicación aguda se traduce en manifestaciones clínicas severas y la muerte de los animales expuestos en periodos de tiempo relativamente cortos. La intoxicación crónica cursa con enfermedad, manifestaciones clínicas o subclínicas y teratogénesis, constituyéndose en la forma más preocupante por el impacto a largo plazo (Figuras 2.18 y 2.19).

Tabla 2.12. Principales manifestaciones clínicas causadas por las dioxinas en los seres vivos

<p>Teratogénesis</p> <p>Hidronefrosis</p> <p>Paladar hendido</p>	<p>Alteraciones hepáticas</p> <p>Inducción enzimática</p> <p>Porfiria y otros cambios funcionales</p> <p>Necrosis de células parenquimales</p> <p>Hipertrofia e hiperplasia parenquimal</p>
<p>Alteraciones genitourinarias</p> <p>Cambios degenerativos en los túbulos renales</p> <p>Hiperplasia del tracto urinario</p> <p>Endometriosis</p> <p>Disfunciones eréctiles y de eyaculación</p>	<p>Alteraciones hemáticas</p> <p>Incremento del colesterol y triglicéridos</p> <p>Hipoglicemia</p> <p>Cambio en niveles séricos de testosterona</p>
<p>Inmunotoxicidad</p> <p>Inmunosupresión</p> <p>Atrofia tímica y de tejidos linfáticos</p>	<p>Otras</p> <p>Perdida de peso y anorexia (wasting syndrome)</p> <p>Edema dérmico y general</p> <p>Hiperplasia e hipertrofia del epitelio gastrointestinal</p> <p>Alteraciones cardiopulmonares y bronquitis</p> <p>Polineuropatía y debilidad muscular</p> <p>Deficit sensorial y Carcinogénesis</p>
<p>Alteraciones dérmicas</p> <p>Cloracné</p> <p>Hirsutismo o alopecia</p> <p>Hiperpigmentación</p> <p>Alteraciones en las faneras</p>	

Adaptado de Gallego *et al.* (2005), Schechter *et al.* (2006) y Gorrachategui (2001)

Estudios epidemiológicos (Anton y Lizaso, 2001; Bruggeman *et al.*, 2007; Gallego *et al.*, 2005; Schechter *et al.*, 2006) sugieren que la exposición accidental a cantidades continuas de dioxinas puede estar asociada a un incremento en *procesos tumorales y cancerígenos*. Las patologías más comúnmente observadas fueron sarcomas de tejido blando, hemopatías malignas y cáncer de hígado y vías biliares, además de la proliferación tumoral de células de Sertoli asociadas a procesos reproductivos.



Figura 2.18. Efectos de la toxicidad aguda de las dioxinas (cloroacné e hiperpigmentación)



Figura 2.19. Efectos de la toxicidad crónica de las dioxinas (alteraciones teratogénicas)

2.2.2.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Este conjunto de sustancias químicas es considerado como otro de los POPs (persistent organic pollutants) de mayor importancia y puede estar asociado a las dioxinas. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se generan principalmente en procesos de combustión, pudiendo extenderse ampliamente en el medio ambiente y generar problemas de salud en animales, tanto silvestres como domésticos, y en las personas expuestas a su potencial contaminante. Diversos trabajos confirman que los HAPs están relacionados con la aparición de patologías crónicas de tipo cancerígeno y mutagénico (Barranco *et al.*, 2003; Brunström *et al.*, 1990; Ciganek *et al.*, 2002; Ciganek y Neca, 2006; Engwall *et al.*, 1999; SCF, 2002b).

Al igual que las dioxinas, los HAPs han sido objeto de un gran número de investigaciones y revisiones, orientadas a evaluar su contribución en la contaminación ambiental o la generación de patologías en las personas expuestas (Barron *et al.*, 2004; Gfrerer y Lankmayr, 2003; Möller, 1994; SCF, 2002a; SCF, 2002b; Van Stijn *et al.*, 1996; Villar, 2004). No obstante, hay poca información disponible a cerca del efecto de la contaminación con HAPs, en concreto sobre su presencia en materias grasas que se incorporan en el pienso de animales domésticos (dado su carácter lipofílico) y su posterior transferencia al producto final.

Los **HAPs** son un grupo de hidrocarburos cuyas moléculas contienen dos o más anillos aromáticos de 6 átomos de carbono (anillos de benceno en su mayoría) fusionados, lo que da lugar a un alto grado de insaturación. Como característica común presentan baja solubilidad en agua y una elevada solubilidad en solventes orgánicos, principalmente de naturaleza lipídica, por lo que se almacenan en la fracción lipídica de los organismos vivos y en los sedimentos.

Legislación.- En cuanto a la regulación de los niveles máximos de HAPs en los alimentos, esta se restringe a un reducido número de productos destinados al consumo humano (Reglamento (CE) N° 1881/2006, 2006) y no existe una legislación concreta sobre los niveles de concentración de PAHs permitidos en ingredientes destinados a la alimentación animal.

Estructura química y composición

Este grupo de sustancias se clasifican como alternantes y no alternantes. Los HAPs alternantes tienen únicamente anillos de 6 átomos de carbono, en tanto que los no alternantes poseen anillos con un número diferente de átomos de carbono (5 ó 7). Si los anillos están unidos de manera lineal, el hidrocarburo es un aceno (por ejemplo antraceno, naftaceno, etc.). Cuando los anillos están unidos de manera angular, se emplea la denominación de feno (por ejemplo pentafeno).

A pesar de que se han catalogado más de 100 tipos de HAPs diferentes, 16 son considerados contaminantes prioritarios. El término hace referencia a compuestos de elevada toxicidad, su potencial contaminante, la información generada al respecto de su actividad y la frecuencia con la que las personas han sido expuestas a lo largo de la historia. Estos son: naftaleno (Nap), acenaftileno (Acy), acenafteno (Ace), fluoreno (Flu), fenantreno (Phe), antraceno (Ant), flouranteno (Fla), pireno (Py), benzo-a-antraceno (BaA), criseno (Chry), benzo-b-flouranteno (BbF), benzo-k-flouranteno (BkF), benzo-a-pireno (BaP), dibenzo-a,h-antraceno (DBahA), benzo-g,h,i-perileno (BPE) e indeno1,2,3-cd-pireno (IPY) (Ciganek y Neca, 2006; Villar, 2004).

De este conjunto, el BaP se ha identificado como el mayor agente carcinogénico, genotóxico y/o mutagénico, además de su aparición frecuente en la mayoría de las fuentes en las que se producen estos compuestos y de poseer un elevado tiempo de permanencia en el medio ambiente (vida media en el suelo de 162 días). Por todo ello, se emplea como elemento de referencia en diferentes estudios ambientales (Mastandrea *et al.*, 2005). A continuación se presenta la estructura química de los HAPs más representativos.

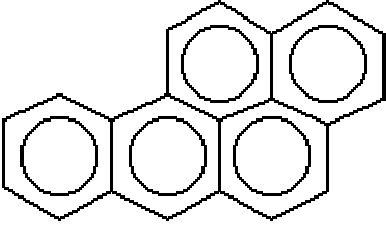
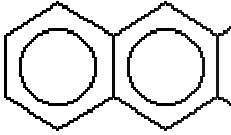
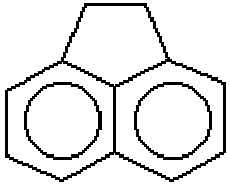
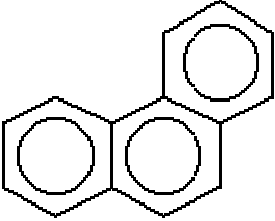
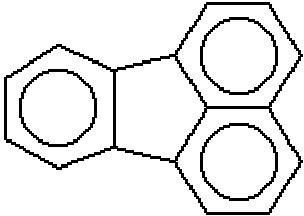
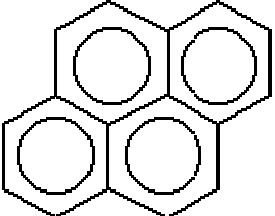
Benzo-a-pireno (BaP)	Naftaleno (Nap)
	
Acenafteno (Ace)	Fenantreno (Phe)
	
Fluoranteno (Fla)	Pireno (Py)
	

Figura 2.20. Estructura química de algunos HAPs, más representativos.

Origen y persistencia en el medio ambiente

Algunos HAPs tienen utilidad industrial, ya que sirven de materia prima para la fabricación de colorantes (antraceno), síntesis de fármacos (fenantreno), resinas sintéticas (benzofurano) y material de revestimiento (fluoranteno). Sin embargo, la gran mayoría de ellos no tiene una clara utilidad para el hombre, ya que se originan involuntariamente en procesos de combustión, como se había dicho, principalmente en la combustión parcial de materias que contienen carbono e hidrogeno en su estructura. Así, pueden tener un origen pirolítico, petrogénico, diagenético, o provenir de la biosíntesis de microorganismos y plantas.

Los de origen *pirolítico* incluyen HAPs presentes en el medio ambiente que se forman por la combustión incompleta de materias orgánicas, recientes o fósiles, a elevadas temperaturas. La combustión puede ser de origen natural (incendios de bosques, erupciones volcánicas, etc.) o antropogénico (uso de combustibles fósiles, incineración de residuos, sistemas de calefacción, emisiones de vehículos, humo del tabaco, procesos industriales de gasificación y licuefacción del carbón, cracking del petróleo, etc.).

El origen *petrogénico* incluye los vertidos (accidentales o intencionados) de petróleo. En este caso, se trata de mezclas complejas de miles de sustancias orgánicas de las cuales los hidrocarburos son los más abundantes (representan hasta el 75 % del peso del petróleo). Los océanos reciben anualmente un 0,25 % de la producción mundial de petróleo, lo que representa una fuente importante de entrada de HAPs en el medio ambiente.

El proceso geoquímico natural por el cual la materia orgánica se sedimenta se conoce como *diagénesis* y consiste en la descarboxilación, aromatización y desfuncionalización, que da lugar a la formación de ciertos derivados del criseno y el piceno así como reteno y perileno.

Hay evidencia circunstancial que sugiere que bacterias, hongos y plantas superiores pueden ser responsables de la biosíntesis de sustancias muy parecidas a los HAPs y que contienen en su estructura átomos de oxígeno, nitrógeno o azufre. Estas sustancias son conocidas como quinonas policíclicas (pigmentos quinónicos). Los procesos de reducción de quinonas policíclicas a hidroquinonas dan lugar a la formación de HAPs y son característicos de sedimentos de agua altamente anaerobios y suelos inundados con elevadas concentraciones de perileno.

Los HAPs pueden hallarse casi en todas partes, sea cual fuere su origen; no obstante, la contribución a la contaminación de las fuentes naturales, como incendios forestales o volcanes, es mínima comparada con las emisiones causadas por el ser humano (Mastandrea *et al.*, 2005).

Los HAPs son liberados en forma de gas o son absorbidos por partículas en suspensión presentes en la atmósfera. En este caso, pueden sufrir cambios en su composición y manifestar reacciones químicas con contaminantes atmosféricos como el óxido de nitrógeno, óxidos de azufre, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ozono y radicales hidroxilo (formando productos de degradación mutagénicos como la quinona, fenoles y dihidrodioles). El tiempo necesario para que se lleven a cabo estas reacciones químicas es relativamente corto (no más de 30 días), y concluye con la deposición o precipitación de las partículas contaminantes en suelos, plantas o

materia orgánica en diversos grados de descomposición. Una vez en el medio, permanecen en estado sólido a temperatura ambiente, comúnmente tienen puntos de fusión y ebullición elevados y una muy baja solubilidad en el agua, la cual decrece al aumentar el peso molecular y tamaño de la partícula (Mastandrea *et al.*, 2005). Además, son solubles en solventes orgánicos (marcada lipoficidad). Por estas razones, la persistencia del compuesto aumenta al aumentar el tamaño de la molécula, así por ejemplo, la persistencia del naftaleno, de bajo peso molecular, es menor que la del benzo-a-pireno que es más persistente y presenta una mayor bioacumulación. La vida media del BaP en sistemas acuáticos es superior a 300 semanas en tanto que la del Nap se reduce a 5.

Fuentes de exposición

La principal vía de exposición a los HAPs es el aire, especialmente en personas expuestas a atmósferas de trabajo de alquitrán de hulla, trabajo en hornos de combustión, producción de aluminio, la utilización del asfalto para pavimentar calles y carreteras (asfalto caliente mezclado con alquitrán de hulla) y en menor grado la exposición a la combustión y los gases de escapes de los vehículos. Así por ejemplo, el aire situado en la parte superior de los canales de humos (en hornos de precipitado del alquitrán) alcanza concentraciones muy altas de hasta 500 mg/m³ de BaP (Mastandrea *et al.*, 2005). El grado de exposición basado en los niveles de concentración de BaP puede tener tres escalas:

- Exposición muy alta (>10 mg/m³).
- Exposición moderada (0,1 a 10 mg/m³).
- Exposición baja (< 0,1 mg/m³)

De similar importancia es la exposición por vía cutánea, por contacto directo con material contaminado, la exposición a humos y el contacto de componentes de algunas cremas o preparados dérmicos.

En el caso de la vía digestiva, sólo puede ser considerada de importancia ante la ingestión accidental del contaminante. Sin embargo, su carácter lipofílico que le permite asociarse a los depósitos de grasa de los seres vivos, le confiere un potencial contaminante añadido, principalmente en materias grasas (animales o vegetales), utilizadas en la alimentación tanto humana como animal.

Las diferentes fuentes de exposición se presentan en la Tabla 2.13. Los mayores contaminantes y las muestras en las que se encontraron muestran la amplia gama de posibilidades a través de las cuales los HAPs pueden ingresar en los seres vivos.

Tabla 2.13. Hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en diferentes muestras analizadas

HAPs	Muestras analizadas
Naftaleno	<ul style="list-style-type: none"> - Refinerías de petróleo, destilerías de carbón y alquitrán - Agua y aire - Alimentos - Humo de tabaco - Leche materna
Acenaftileno	<ul style="list-style-type: none"> - Agua - Derivados del petróleo
Acenafteno	<ul style="list-style-type: none"> - Asfalto - Humo de tabaco - Agua y lodo
Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Flouranteno, Pireno, Benzo-a-antraceno	<ul style="list-style-type: none"> - Combustibles, gases de escape de motores - Humo de tabaco - Vegetales, carne ahumada y asada, pescado y otros alimentos - Aguas, aire, suelo y lodos
Criseno	<ul style="list-style-type: none"> - Aguas - Gases de escape de automóviles - Humo de tabaco - Alimentos - Combustión de carbón y de gases procedentes de la calefacción a base de aceites
Benzo-b-fluoranteno	<ul style="list-style-type: none"> - Combustibles, gases de escape de motores
Benzo-k-fluoranteno	<ul style="list-style-type: none"> - Humo de tabaco - Aguas, aire, suelo, lodos - Vegetales, carne ahumada y asada, pescado - Gases de sistemas de calefacción a base de carbón
Benzo-a-pireno	<ul style="list-style-type: none"> - Combustibles, gases de escape de motores - Humo de tabaco - Vegetales, pescados - Aguas, aire, suelo y lodos
Benzo-a,h-antraceno	<ul style="list-style-type: none"> - Gases de escape de automóviles - Humo de tabaco - Aguas, aire, suelo y lodos - Alimentos y vegetales
Benzo-g,h,i-perileno, Indeno1,2,3-c,d-pireno	<ul style="list-style-type: none"> - Combustible, gases de escape de motores - Humo de tabaco - Aguas, aire, suelo y lodos - Vegetales, carne ahumada y asada, pescado y otros alimentos

Adaptado de Villar (2004)

Con respecto a la concentración de HAPs en los piensos de animales, hay poca información disponible. Raszyk *et al.* (1999), en un estudio realizado en fabricas de pienso de la República Checa, encontraron concentraciones de hasta 752 µg/kg (suma total de 16 HAPs estudiados) de los cuales el BaP tenía una concentración media de 11 µg/kg, demostrando la presencia de HAPs potencialmente cancerígenos en piensos para animales. Muy probablemente, éste sea el primer trabajo en el que se documenta la concentración de HAPs en piensos comerciales. Por

otro lado, la exposición a los HAPs en el agua, forrajes, piensos concentrados y el aire de granjas ubicadas en áreas contaminadas también ha demostrado la presencia de estos contaminantes en explotaciones productivas (Ciganek *et al.*, 2002).

Cerdos procedentes de granjas con distintos niveles de exposición a los contaminantes (área contaminada del este de Chequia) presentaron diferentes niveles de HAPs en tejido adiposo, u órganos como riñón, hígado, pulmones, humor vítreo y cristalino oculares, y tejido muscular (Ciganek y Neca, 2006), según se muestra en la figura 2.21. Dichos niveles también se determinaron en igual número de órganos en bovinos de leche, en este caso las concentraciones fueron similares en todos ellos.

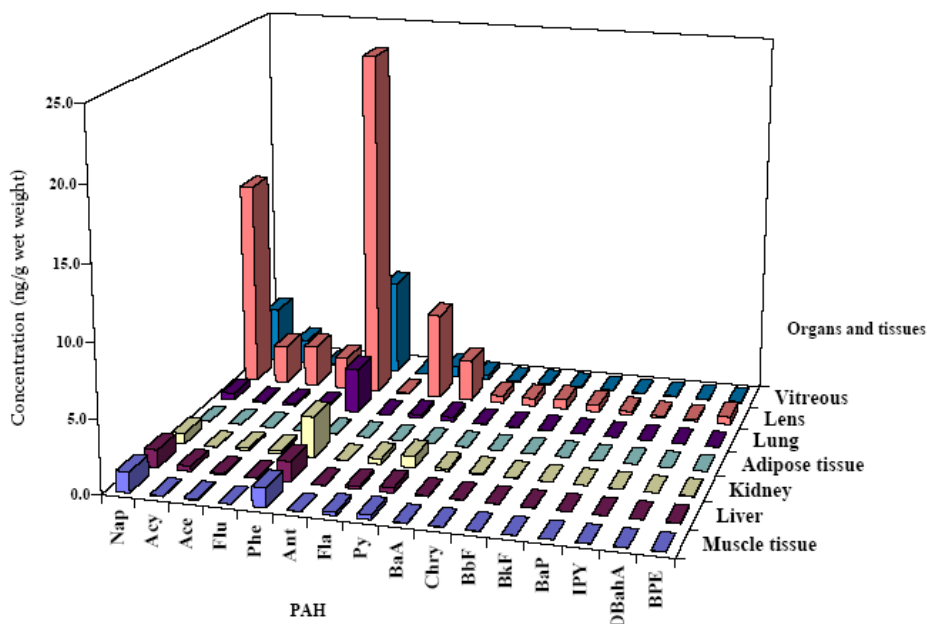


Figura 2.21. Distribución de PAHs en órganos y tejidos de cerdo: Naftaleno (Nap), acenaftileno (Acy), acenafteno (Ace), fluoreno (Flu), fenantreno (Phe), antraceno (Ant), flouranteno (Fla), pireno (Py), benzo-a-antraceno (BaA), criseno (Chry), benzo-b-fluoranteno (BbF), benzo-k-fluoranteno (BkF), benzo-a-pireno (BaP), dibenzo-a,h-antraceno (DBahA), benzo-g,h,i-perileno (BPE) e indeno1,2,3-cd-pireno (IPY) (Ciganek y Neca, 2006).

En trabajos aún no publicados procedentes del Proyecto Feeding Fats Safety, Devier y Budzinski (2007. Comunicación personal) determinaron niveles de concentración total de HAPs en tejido muscular y hepático, procedentes de pollos y conejos, de < 8 ng/g (de los cuales < 0,1 ng/g corresponden al BaP y < 0,1 ng/g al DBahA). Asimismo, la concentración de HAPs en plasma no superó los 16 ng/g y 4 ng/g de HAPs totales en ambas especies, respectivamente. El alimento proporcionado a estos animales contenía un nivel máximo de 271 ng/g de HAPs totales en el pienso de los pollos y de 153 ng/g de HAPs totales en el pienso de los conejos. El nivel de contaminación con HAPs no modificó el depósito, no detectándose transferencia de estos contaminantes de la grasa dietaria a los tejidos.

Cinética y metabolismo

Los HAPs se pueden incorporar por las vías respiratorias, el aparato digestivo y la piel (tal como se ha señalado en el apartado fuentes de exposición). La tasa de absorción pulmonar depende del tipo de HAPs y del tamaño y composición de la partícula con la que se asocia. De esta manera, los HAPs ligados/incorporados a otras partículas inhalados se eliminan de los pulmones con mayor lentitud que los hidrocarburos libres. En el aparato digestivo se produce una absorción rápida, pero los metabolitos vuelven al intestino mediante la excreción biliar (circulación entero-hepática). En todo caso, sea cual fuere la vía de entrada los HAPs se distribuyen en casi todos los órganos internos, particularmente en los que son ricos en lípidos.

Cuando una sustancia penetra en el organismo, éste trata de eliminarla solubilizándola. Los HAPs son poco solubles, por lo que el organismo los transforma en derivados hidrosolubles. Los compuestos lipofílicos originales se convierten mediante epóxidos intermedios, en fenoles, dioles y tetroles, que son compuestos hidrosolubles (a través de reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis en la que intervienen enzimas como la citocromo P450-CYP). Este proceso provoca en gran medida una desintoxicación. No obstante, algunos HAPs sufren una segunda epoxidación (activación metabólica de los HAPs) a través de la acción de enzimas como la CYP1A1, CYP1B1 y en menor grado con la CYP1A2. Algunos fenoles son oxidados a quinonas y otros producen epóxidos secundarios (di-hidrodiolépidos), que son los verdaderos agentes cancerígenos que se unen al DNA (fundamentalmente con guanidina). El grupo $-NH_2$ de la base nitrogenada del DNA produce un ataque nucleofílico sobre el epóxido. La unión de este gran hidrocarburo a la base nitrogenada impide que ésta se acople adecuadamente a la doble hélice del DNA, impidiendo el establecimiento de puentes de hidrógeno con la base nitrogenada de la hebra opuesta, lo cual dará lugar a mutaciones. Reacciones semejantes se observan con otras macromoléculas como la albúmina y la hemoglobina (Mastandrea *et al.*, 2005; SCF, 2002b; Villar, 2004).

Los metabolitos de los HAPs pueden ser *excretados* del organismo a través de la orina (como tioéteres), las heces y la secreción biliar. En esta última, puede darse un proceso de reabsorción ya que los metabolitos ingresan en el ciclo entero-hepático (SCF, 2002a).

Toxicidad

El potencial tóxico de los HAPs está relacionado con su capacidad carcinogénica en los organismos expuestos. A su vez, esta capacidad cancerígena depende de su estructura. Así, los HAPs de 4 a 6 anillos bencénicos son los compuestos más carcinogénicos.

Se tienen referencias de su potencial patógeno, a partir de un estudio realizado en el año 1775 sobre la alta incidencia de cáncer escrotal en deshollinadores. No obstante, no fue hasta 1930 cuando estas patologías fueron atribuidas al BaP y al DBahA, dando inicio al estudio de estas sustancias y su efecto negativo sobre los seres vivos (Mastandrea *et al.*, 2005).

A pesar de que el BaP es considerado como término de referencia para medir la toxicidad de los HAPs, se ha establecido que otros compuestos con el DBahA pueden manifestar una mayor actividad patógena. Se cree que hay una fuerte actividad carcinógena del BaP en humanos y del DBahA en animales, aunque esta afirmación no está suficientemente documentada. La Tabla 2.14., presenta los valores considerados como factor de toxicidad equivalente para los HAPs más estudiados.

Tabla 2.14. Factor de Toxicidad equivalente (TEF) para los HAPs más conocidos

HAP	Factor de toxicidad equivalente
Benzo-a-pireno (BaP)	1,000
Benzo-a-antraceno (BaA)	0,100
Benzo-b-fluoranteno (BbF)	0,100
Benzo-k-fluoranteno (BkF)	0,100
Indeno1,2,3-cd-pireno (IPY)	0,100
Antraceno (Ant)	0,010
Benzo-g,h,i-perileno (BPE)	0,010
Criseno (Chry)	0,010
Acenafteno (Ace)	0,001
Acenaftileno (Acy)	0,001
Fluoranteno (Fla)	0,001
Fluoreno (Flu)	0,001
Fenantreno (Phe)	0,001
Pireno (Py)	0,001
Dibenzo-a,h-antraceno (DBahA)	5,000

Adaptado de Villar (2004)

No todos los HAPs han demostrado tener efectos carcinogénicos, genotóxicos o mutágenos. Estos efectos se atribuyen a la presencia conjunta de más de un compuesto de la familia y de algunos de sus derivados, principalmente los nitroderivados. Los Nitro- HAPs pueden constituir

cerca de 200 sustancias diferentes, muchas de ellas mutágenicas. El Nitrofluoreno es uno de los compuestos más representativos de este grupo (Mastandrea *et al.*, 2005; Möller, 1994).

Patología asociada y cáncer

Los efectos tóxicos sobre la piel están asociados con dermatitis aguda y crónica con síntomas de quemazón, picor y edema, que son más pronunciados en la región de piel más expuesta. La exposición prolongada cursa con hiperpigmentación, con cornificación de las capas superficiales y telangioectasis (dilatación de vasos sanguíneos superficiales de la piel). La vía respiratoria presenta irritación (vías aéreas superiores), bronquitis y tos crónica. La exposición ocular incluye lagrimeo, fotofobia, edema de párpados e hiperemia conjuntival (Mastandrea *et al.*, 2005).

Como ya se ha establecido, la principal patología provocada por los HAPs está relacionada con distintos tipos de cáncer como el cáncer cutáneo (escroto y cara), cáncer broncogénico, cáncer de vejiga y en el sistema hematopoyético puede originar leucemia y proliferación de linfomas (Mastandrea *et al.*, 2005; Villar, 2004).

Tabla 2.15. Capacidad carcinogénica, genotóxica y mutagénica de algunos HAPs

HAPs	Carcinogenicidad	Genotoxicidad	Mutagenicidad
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Pireno	N	L	+
Benzofluorenos	I	I	?
Benzo-a-antraceno	S	S	+
Benzo-e-pireno	I	L	+
Benzo-a-pireno	S	S	+
Debenzo-a-antraceno	S	S	+
Benzo-g,h,i-perileno	I	I	+
Dibenzopirenos	S	I	+
2-Nitronaftaleno	N	L	-
1-Nitropireno	I	S	+

S: suficiente; I: insuficiente; N: no carcinogénico; L: limitado efecto
 Mutagenicidad (Test de Ames): + (positivo); - (negativo); ? (inconcluso)
 Adaptado de Mastandrea *et al.* (2005)

2-A. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

A

- Ábalos, M., Abad, E., y Rivera, J. (2007) (Personal communication) Levels of contamination in meat and other animal tissues, and rate of transfer from feed: Analysis of PCDD/Fs and DL-PCBs. Feeding Fats Safety (FOOD-CT-2004-007020). Unpublished data: 7 pp.
- Aho, M., Nuotio, L., Nurmi, E., y Kiiskinen, T. (1992) Competitive exclusion of campylobacters from poultry with K-bacteria and Broilact(R). *Int.J.Food Microbiol.* 15:265-275.
- Allen, P.C., Danforth, H.D., Morris, V.C., y Levander, O.A. (1996) Association of lowered plasma carotenoids with protection against cecal coccidiosis by diets high in n-3 fatty acids. *Poult.Sci.* 75:966-972.
- Allen, P.C. y Fetterer, R. (2002) Interaction of dietary vitamin E with *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poult.Sci.* 81:41-48.
- Allison, D.B., Denke, M.A., Dietschy, J.M., Emken, E.A., Kris-Etherton, P.M., y Nicolosi, R.J. (1995) Trans fatty acids and coronary heart disease risk. Report of the experts panel on *trans* fatty acids and coronary heart disease. *Amer. J. Clin. Nutr.* 62:655S-708S.
- Amit-Romach, E., Sklan, D., y Uni, Z. (2004) Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poult.Sci.* 83:1093-1098.
- Anton, A. y Lizaso, J. (2001) PCBs y Dioxinas. Fundación ibérica para la seguridad alimentaria 30: 1-25.
- Apajalahti, J. y Kettunen, A. (2006) Microbes of the chicken gastrointestinal tract. In: *Avian Gut Function in Health and Disease*, (Perry, G. C., Ed.). CAB International. Bristol-UK. pp. 124-137.
- Apajalahti, J. y Kettunen, A. (2002) Efecto de la Dieta sobre la Flora Microbiana en el Tracto Gastrointestinal de Aves. XVIII Curso de Especialización FEDNA: 41-51.
- Apajalahti, J., Kettunen, A., y Graham, H. (2004) Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with especial reference to the chicken. *Worlds Poult.Sci.J.* 60:223-232.
- Atal, S., Zarnowski, M.J., Cushman, S.W., y Sampugna, J. (1994) Comparison of body weight and adipose tissue in male C57Bl/6J mice fed diets with and without trans fatty acids. *Lipids* 29:319-325.

B

- Bar-Shira, E., Sklan, D., y Friedman, A. (2003) Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. *Dev.Comp.Immunol.* 27:147-157.

2-A. Referencias bibliográficas

- Barnes, E.M., Barnum, D.A., Harry, E.G., y Mead, G.C. (1972) The Intestinal Flora Of Chicken In Period 2 To 6 Weeks Of Age, With Particular Reference To Anaerobic Bacteria. Br.Poult.Sci. 13:311-326.
- Barnes, EM. (1972) The Avian Intestinal Flora With Particular Reference To Possible Ecological Significance Of Cecal Anaerobic Bacteria. Am.J.Clin.Nutr. 25:1475-1479.
- Barranco, A., Alonso-Salces, R.M., Bakkali, A., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F., y Sarobe, M. (2003) Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. J. Chromatography A 988:33-40.
- Barrera-Arellano, D. y Block, J.M. (1993) Ácidos grasos *trans* en aceites hidrogenados: implicaciones técnicas y nutricionales. Grasas y Aceites 44:286-293.
- Barron, M.G., Heintz, R., y Rice, S.D. (2004) Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonist in fish. Marine Environ. Res. 58:95-100.
- Bell, J.G., McGhee, F., Dick, J.R., y Tocher, D.R. (2006) Dioxin and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Scottish farmed salmon (*Salmo salar*): effects of replacement of dietary marine fish oil with vegetable oils. Aquaculture 243:305-314.
- Bernard, A., Broeckaert, F., De Poorter, G., De Cock, A., Hermans, C., Saegerman, C., y Houins, G. (2002) The Belgian PCB/Dioxin Incident: Analysis of the Food Chain Contamination and Health Risk Evaluation. Environ. Res. Section A 88:1-18.
- Bernard, A., Hermans, C., Broeckaert, F., De Poorter, G., De Cock, A., y Houins, G. (1999) Food contamination by PCBs and dioxins. Brief communication. Nature 401:231-232.
- Beuge, J.A. y Aust, S.D. (1987) Microsomal Lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52:302-310.
- Blanch, A., Barroeta, A.C., Baucells, M.D., y Puchal, F. (1995) The Nutritive-Value Of Dietary Fats In Relation To Their Chemical Composition - Apparent Fat Availability And Metabolizable Energy In 2-Week-Old Chicks. Poult.Sci. 74:1335-1340.
- Boatella, J. y Codony, R. (2000) Recycled cooking oils: Assessment of risks for public health. Final Study. Directorate General for Research.European Parliament. STOA programme:79 pp.
- Bondi, A. y Budowski, P. (1989) Los lípidos y su importancia en la nutrición de los animales monogástricos y rumiantes. En: Nutrición Animal (Drori, D. Colab., Ed.). Acribia S.A. Zaragoza-España. pp. 79-108.
- Bou R, S.Grimpa, Baucells, M.D., Codony, R., y Guardiola, F. (2006) Dose and Duration Effect of α -Tocopheryl Acetate Supplementation on Chicken Meat Fatty Acid Composition, Tocopherol Content, and Oxidative Status. J.Agric.Food Chem. 54:5020-5026.
- Bou, R., Codony, R., Baucells, M.D., y Guardiola, F. (2005) Effect of Heated Sunflower oil and Different Dietary Supplements on the Composition, Oxidative Stability and Sensory Quality of Dark Chicken meat. J.Agric.Food Chem. 53:7792-7801.
- Bruggeman, V., Van Den Bergh, G., Clerens, O., Onagbesan, O., Arckens, L., y Decuypere, E. (2007) Differential Protein Expression in Liver and Ovary of the One-Day-Old chick as a

Result of a Single in ovo Injection of 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin. Feedinfo New Service: 1-4. www.feedinfo.com

Brunström, B., Broman, D., y Näf, C. (1990) Embryotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Three Domestic Avian Species, and of PAHs and Coplanar Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in the Common Eider. *Environ. Pollution* 67:133-143.

Bureau, A., Lahet, J.J., Lenfant, F., Bouyer, F., Petitjean, M., Chaillot, B., y Freysz, M. (2005) Optimization of a model of red blood cells for the study of anti-oxidant drugs, in terms of concentration of oxidant and phosphate buffer. *Biomed. & Pharmacotherapy* 59:341-344.

C

Castillo, M. (2006) Development of gut microbiota in the pig: Modulation of bacterial communities by different feeding strategies. Universidad Autónoma de Barcelona. PhD Thesis: 232 pp.

Castillo, M., Amalik, F., Linares, A., y Garcia-Peregrin, E. (2000) Fish oil reduces cholesterol and arachidonic acid levels in plasma and lipoproteins from hypercholesterolemic chicks. *Mol. Cell. Biochem.* 210:121-130.

Chamblee, T.N., Brake, J.D., Schultz, C.D., y Thaxton, J.P. (1992) Yolk Sac Absorption and Initiation of Growth in Broilers. *Poult. Sci.* 71:1811-1816.

Chin Sou Fei (1995) Technical bulletin: The detrimental effects of feeding oxidized fats to animals. American Soybean Association: 1-6. www.asasea.com/technical/po21-1995.html

Choe, E. y Min, B.D. (2007) Chemistry of Deep-Fat Frying Oils. *J. Food Sci.* 72:R77-R86.

Choque-López, J.A., Manzanilla, E.G., Baucells, M.C., y Barroeta, A.C. (2005) El tipo de grasa y su estado oxidativo provocan cambios en la resistencia de la membrana de los eritrocitos en pollos broiler. *XLII Symposium Científico de Avicultura*: 201-207.

Choque-López, J.A., Manzanilla, E.G., Gomez de Segura, A., Baucells, M.D., y Barroeta, A.C. (2006) Effects of Oxidated Fat and Vitamin E Inclusion on Resistance to Haemolysis, Intestinal Microbiota, Faecal Coccidia Counts and Epithelium Structure of Broiler Chicken. In: *Avian Gut Function, Health & Disease*, (Perry, G. C., Ed.). CAB International. Bristol-UK. pp. 384-384.

CiganeK, M. y Neca, J. (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbons in porcine and bovine organs and tissues. *Vet. Med. (Praha)* 51:239-247.

CiganeK, M., Ulrich, R., Neca, J., y Raszyk, J. (2002) Exposure of pig fatteners and dairy cows to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Vet. Med. (Praha)* 47:137-142.

Clayton E.H. (2005) Possible errors in the analysis of lactic acid and volatile fatty acids in the gastrointestinal tracts of pigs and chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2206-2207.

Clench, M.H. (1999) The Avian Cecum: Update and Motility Review. *J. Exp. Zool.* 283:441-447.

Codony, R. (1990) Control Analítico de Grasas para la Alimentación Animal. I Forum Internacional del Aceite SIO 90' 1-25.

2-A. Referencias bibliográficas

- Codony, R. (1991) Control Analítico de Grasas. Alimentación Equipos y Tecnología: 53-65.
- Codony, R. y Guardiola, F. (1999) Las Grasas en Alimentación Animal. Serie materias primas. Cuadernos de Nutrición: 55-63.
- Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, S., McGarrell, D.M., Schmidt, T.M., Garrity, G.M. y Tiedje, J.M. (2003) The ribosomal database project (RDB-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic. Acids. Res.* 31:442-443.
- Collier, C.T., van der Klis, D., Deplancke, B., Anderson, B., y Gaskins, H.R. (2003) Effects of Tylosin on Bacterial Mucolysis, *Clostridium perfringens* Colonizations, and Intestinal Barrier Function in a chick Model of Necrotic Enteritis. *Antimicrob. Agents Chemotherapy* 47:3311-3317.
- Corrier, D.E., Hinton, A., Hargis, B., y DeLoach, J.R. (1992) Effect Of Used Litter From Floor Pens Of Adult Broilers On Salmonella Colonization Of Broiler Chicks. *Avian Dis.* 36:897-902.
- Corrier, DE., Hinton Jr., A., Ziprin R.L., Beier, R.C., y DeLoach, J.R. (1990) Effect of Dietary Lactose on cecal pH, Bacteriostatic Volatile Fatty Acids, and Salmonella typhimurium Colonization of Broiler Chicks. *Avian Dis.* 34:617-625.
- Cortinas, L., Barroeta, A., Villaverde, C., Galobart, J., Guardiola, F., y Baucells, M.D. (2005) Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: Lipid oxidation. *Poult.Sci.* 84:48-55.
- Cortinas, L., Villaverde, C., Galobart, J., Baucells, M.D., Codony, R., y Barroeta, A.C. (2004) Fatty acid content in chicken thigh and breast as affected by dietary polyunsaturation level. *Poult.Sci.* 83:1155-1164.

D

- Danicke, S., Simon, O., Jeroch, H., Keller, K., Glaser, K., Kluge, H., y Bedford, M.R. (1999) Effects of dietary fat type, pentosan level and xylanase supplementation on digestibility of nutrients and metabolizability of energy in male broilers. *Arch. Anim. Nutr.-Archiv fur Tierernahrung* 52:245-261.
- de Blas, C. (2004) Cambios en el perfil de ácidos grasos en productos animales en relación con la alimentación animal y humana. Importancia del Ácido Linoleico Conjugado. 1. Rumiantes. XX Curso de especialización FEDNA: 79-100.
- De Vries, M., Kwakkel, R.P., y Kijlstra, A. (2006) Dioxins in organic eggs: a review. *NJAS* 54:207-221.
- De Winne, A. y Dirink, P. (1996) Studies on vitamin E and meat quality. 2. Effect of feeding high vitamin E levels on chicken meat quality. *J.Agric.Food Chem.* 44:1691-1696.
- Devier, M. y Budzinski, H. (2007) (Personal communication) Levels of PAHs and PBDEs in animal tissues and rate of transfer from feed. Feeding Fats Safety (FOOD-CT-2004-007020). Unpublished data: 8 pp.

2-A. Referencias bibliográficas

- Díaz, J. (2007) Dioxines en productes per a l'alimentació humana i animal. Institut Químic de Sarrià. Col·legi oficial de veterinaris de Barcelona: 6 pp.
- Dibner, J.J., Atwell, C.A., Kitchell, M.L., Shermer, W.D., y Ivey, F.J. (1996) Feeding of oxidized fats to broilers and swine: Effects on enterocyte turnover, hepatocyte proliferation and the gut associated lymphoid tissue. *Anim. Feed Sci. Technol.* 62:1-13.
- Dibner, J.J., Robey, W.W., Shermer, W.D., y Ivey, F.J. (1995) Effect of oxidant stress on gastrointestinal structure and function. In: *Proceedings of the Maryland Nutrition Conference on feed manufacture.* Maryland University. Maryland-USA: 130-137.
- Directiva 2006/13/CE (2006) Directiva del 3 de febrero de 2006 Sobre Dioxinas y PCBs similares a dioxinas. *Com.UE* 32:44-53.
- Draper, H., Squires, E.J., Mahmoodi, H., Wu, J., Agarwal, S., y Hadley, M. (1993) A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic.Biol.Med.* 15:353-363.
- Drew, M.D., Syed, N.A., Golbade, B.G., Laarveld, B., y Van Kessel, A.G. (2004) Effects of Dietary Proterin Source and Level on Intestinal Populations of *Clostridium perfringens* in Broiler Chickens. *Poult.Sci.* 83:414-420.
- Dutta, S., Chatterjee, A., Dutta, P., Rajendran, K., Roy, S., Pramanik, K.C., y Bhattacharya, S.K. (2001) Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhoea in Calcuta, India. *J.Med.Microbiol.* 50:667-674.
- Dziezak, J.D. (1989) Fats, Oils, and Fat Substitutes. *Food Technol.*: 66-74.
- ## E
- Eder, K., Keller, U., Hirche, F., y Brandsch, C. (2003) Thermally oxidized dietary fats increase the susceptibility of rat LDL to lipid peroxidation but not their uptake by macrophages. *J.Nutr.* 133:2830-2837.
- Edmunds, B.K. (1990) Chemical Analysis of Lipid Fraction. *Feedstuff evaluation* 11: 197-213.
- Elson, C.E., Benevenga, N.J., Canty, D.J., Grummer, R.H., Lulich, J.J., Porter, J.W., y Johnston, A.E. (1981) The Influence Of Dietary Unsaturated Cis And Trans And Saturated Fatty-Acids On Tissue-Lipids Of Swine. *Atherosclerosis* 40:115-137.
- 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.* 75:1003-1011.
- Engwall, M., Brunström, B., Näf, C., y Hjelm, K. (1999) Levels of dioxin-like compounds in sewage sludge determined with a bioassay based on erod induction in chicken embryo liver cultures. *Chemosph.* 38:2327-2343.
- Erba, D., Riso, P., Criscuoli, F., y Testolin, G. (2003) Malondialdehyde production in Jurkat T cells subjected to oxidative stress. *Nutrition* 19:545-548.

2-A. Referencias bibliográficas

Ewing, W.N. y Cole, D.J.A. (1994b) Micro-flora of the gastro-intestinal tract. In: The Living Gut: An introduction to Micro-organisms in Nutrition. Contex ED. Trowbridge-Wildshire UK: 45-65.

Ewing, W.N. y Cole, D.J.A. (1994a) The Gastro-intestinal Tract. In: The Living Gut: An Introduction to Micro-organisms in Nutrition. Contex ED. Trowbridge-Wildshire UK: 9-28.

F

Falcione, G., Cincolà, G., y Brunori, M. (1987) Glutathione peroxidase and oxidative hemolysis in trout red blood cells. Federation of European Biochemical Societies 221:355-358.

FEDNA (2003) Grasas y Aceites. In: Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos, (de Blas, C., Mateos, G.G., y Rebollar, P.G., Ed.), pp. 373-385.

Fernandes, AC., Felipe, PM., Coelho, H., y Manso, CF. (1991) The inhibition of lipid peroxidation by cinnarizine. Possible implications to its therapeutic and side-effects. Biochem.Pharmacol. 41:709-714.

Francesch i Ollé, M. (2007) Disbiosis intestinal. XLIV Symposium científico de avicultura AECA-WPSA 24-26 Octubre:51-64.

Fuhrman, J.A., McCallum, K., y Davis, A.A. (1992) Novel major archaeobacterial group from marine planktom. Nature 356:148-149.

Fuhrmann, H., Balthazary, S.T., y Sallmann, H.P. (1994) Bioefficiency Of Different Tocopherols In Chicken As Assessed By Hemolysis Test And Microsomal Pentane Production. Br.J.Nutr. 71:605-614.

Furuse, M. y Yokota, H. (1984) Effect Of The Gut Microflora On The Size And Weight Of Organs Of Chicks Fed Diets Of Different Protein-Content. Br.Poult.Sci. 25:429-439.

G

Gallego, M.E., Roy, T.J., Hermoso de Mendoza, M., Hernandez, D., Soler, F., y Pérez, M. (2005) Las Dioxinas en la Producción Animal: Situación Actual. Prod. Anim. 212: 19-31.

Galobart, J. (2000) Mejora de la estabilidad oxidativa de huevos y ovo productos Enriquecidos con Ácidos Grasos Poli Insaturados: α -Tocoferol, Cantaxantina y Extracto de Romaní. Universidad Autónoma de Barcelona. PhD Thesis: 220 pp.

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

Gérard, F., Brézillon, C., Quére, F., Salmon, A., y Rabot, S. (2008) Characterization of cecal microbiota and response to an orally administered *Lactobacillus* probiotic strain in the broiler chickens. J. Molecular Microb. Biotechnol. 14:115-122.

2-A. Referencias bibliográficas

- Geyra, A., Uni Z., y Sklan, D. (2001) Enterocyte Dynamics and Mucosal Development in the Posthatch Chicks. *Poult.Sci.* 80:776-782.
- Gfrerer, M. y Lankmayr, E. (2003) Microwave-assisted saponification for the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from pumpkin seed oils. *J. Sep. Sci.* 26:1230-1236.
- Golapakrishna, A.G. y Prabhakar, J.V. (1986) Effect of water activity on autoxidation of methyl linoleate. *J.Food Sci.Technol.* 23:152-157.
- Gómez de Segura, A., Castillo, M., Takahashi, S.E., Choque-López, J.A., Barroeta, A.C., Baucells, M.D., y Martín-Orúe, S.M. (2007) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-TFLP): Una herramienta útil para valorar la dinámica y la diversidad de la población microbiana en aves y cerdos. *Avances Metodológicos en el Estudio de la Microbiología Digestiva. Universidad de Zaragoza:*24-25.
- Gong, J.H., Forster, R.J., Yu, H., Chambers, J.R., Sabour, P.M., Wheatcroft, R., y Chen, S. (2002a) Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiol.Lett.* 208:1-7.
- Gong, J.H., Forster, R.J., Yu, H., Chambers, J.R., Wheatcroft, R., Sabour, P.M., y Chen, S. (2002b) Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41:171-179.
- Gonzales-Muñoz, M.J., Bastida, S., y Sánchez Muniz, F.J. (1998) Short-Term *in vivo* Digestibility of Triglyceride Polymers, Dimers, and Monomers of Thermoxidized Palm Olein in Deep-Frying. *J.Agric.Food Chem.* 46:5188-5193.
- Gonzales-Muñoz, M.J., Bastida, S., y Sánchez-Muniz, F.J. (2003) Short-term *in vivo* digestibility assessment of a highly oxidized and polymerized sunflower oil. *J. Sci. Food Agric.* 83:413-418.
- Gorrachategui, M. (2001) Seguridad Alimentaria: Dioxinas. XVII Curso de especialización FEDNA: 24 pp.
- Gradinski-Vrbanac, B., Stojevic, Z., Milinkovic-Tur, S., Balenovic, T., Pirslijin, J., y Zdelar-Tuh, M. (2002) In vitro susceptibility of duck, chicken, and pig erythrocyte lipids to peroxidation. *Vet.Med.(Praha)* 47:303-308.
- Grau, A., Guardiola, F., Boatella, J., Barroeta, A.C., y Codony, R. (2000) Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: Influence of various parameters. *J.Agric.Food Chem.* 48:1155-1159.
- Grau, A., Guardiola, F., Grimpa, S., Barroeta, A.C., y Codony, R. (2001) Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: Influence of dietary fat and alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Poult.Sci.* 80:1630-1642.
- Guan, L.L., Hagen, K.E., Tannock, G.W., Korver, D.R., Fassenko, G.M., y Allison, G.E. (2003) Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Appl.Environ.Microbiol.* 69:6750-6757.

Guitart, R. (2002) Dioxinas y alimentos. Consuma Seguridad. Diario de la seguridad alimentaria. www.consumaseguridad.com:

H

Halliwell, B. y Chirico, S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am.J.Clin.Nutr.* 57:715S-725S.

Hamilton, C.R. y Kirstein, D. (2003) Does rancidity, as measured by peroxide value, affect animal performance? *Darling Int.*: 8pp.

Hermier, D. (1997) Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *J.Nutr.* 127:S805-S808.

Hernández, N. y Boatella, J. (1986) Formas "cis" y "trans" de los ácidos grasos insaturados. Repercusiones nutricionales. *Cir.Far.* 290:53-64.

Hertrampf J. (1992) Making fat more digestible. *Feed Int.* 14 (5): 12-17.

Ho, S.C., Liu, J.H., y Wu, R.Y.Y. (2003) Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. *Biogerontology* 4:15-18.

Hong, Y.L., Yeh, S.L., Chang, C.Y., y Hu, M.L. (2000) Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin.Biochem.* 33:619-625.

Hume, M.E., Kubena, L.F., Beier, R.C., Hinton Jr., A., Corrier, D.E., y DeLoach, J.R. (1992) Fermentation of (14C)Lactose in broiler chicks by cecal Anaerobes. *Poult.Sci.* 71:1464-1470.

J

Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N., Ali, M.A., y Jalaludin, S. (1998a) Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 70:197-209.

Jin, S.H., Corless, A., y Sell, J.L. (1998b) Digestive system development in post-hatch poultry. *Worlds Poult.Sci.J.* 54:335-345.

Józefiak, D., Rutkouski, A., y Martin, S.A. (2004) Carbohydrate fermentation en the avian ceca: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 113:1-15.

K

Kaçmaz, M., Ozturk, H.S., Cete, S., Kavutcu, M., y Durak, I. (1997) The effects of smoking on antioxidant defence system and membrane free fatty acid content of erythrocytes and plasma lipid parameters: Protective role of antioxidant vitamins. *Nutr. Res.* 17:931-940.

Kanner, J. (1994) Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. *Meat Sci.* 36:169-189.

- Keller, U., Brandsh, C., y Eder, K. (2004) The effect of dietary oxidized fats on the antioxidant status of erythrocytes and their susceptibility to haemolysis in rats and guinea pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 88:59-72.
- Kim, M.K., Kim, S.Y., Yun, S.J., Lee, M.H., Cho, B.H., Park, J.M., Son, S.W., y Kim, O.K. (2004) Comparison of seven indicator PCBs and three coplanar PCBs in beef, pork, and chicken fat. *Chemosph.* 54:1533-1538.
- Klasing, K.C. (1998) *Digestion of Food. Comparative Avian Nutrition.* CAB International. Cambridge-UK 3: 36-70.
- Koletzko, B. y Decsi, T. (1997) Metabolic aspects of *trans* fatty acids. *Clin.Nutr.* 16:229-237.

L

- Lan, Y., Verstegen, M.W.A., Tamminga, S., y Williams, B.A. (2005) The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *Worlds Poult.Sci.J.* 61:95-104.
- Lee, K.W., Lee, H.J., Cho, H.Y., y Kim, J. (2005) Role of the Conjugated Linoleic Acid in the Prevention of Cancer. *Food Sci. Nutr.* 45:135-144.
- Léger, C.L., Razanamahefa, L., y Margaritis, I. (2007) Health risks and benefits of *trans* fatty acids including conjugated fatty acids in food - Synopsis of the AFSSA report and recommendations. *Eur.J.Lipid Sci.Technol.* 109:887-890.
- Lin, C.F., Asghar, A., Gray, J.I., Buckley, D.J., Booren, A.M., Crackel, R.L., y Flegal, C.J. (1989a) Effects Of Oxidized Dietary Oil And Antioxidant Supplementation On Broiler Growth And Meat Stability. *Br.Poult.Sci.* 30:855-864.
- Lin, C.F., Gray, J.I., Asghar, A., Buckley, D.J., Booren, A.M., y Flegal, C.J. (1989b) Effects Of Dietary Oils And Alpha-Tocopherol Supplementation On Lipid-Composition And Stability Of Broiler Meat. *J. Food Sci.* 54:1457- 1468.
- Liu, J.F. y Huang, C.J. (1996) Dietary oxidized frying oil enhances tissue alpha-tocopherol depletion and radioisotope tracer excretion in vitamin E-deficient rats. *J.Nutr.* 126:2227-2235.
- Lu, J.R., Hofacre, C., y Lee, M.D. (2006) Emerging Technologies in Microbial Ecology Aid in Understanding the Effect of Monensin in the Diets of broilers in Regard to the Complex Disease Necrotic Enteritis. *J.Appl.Poult.Res.* 15:145-153.
- Lu, J.R., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J.J., y Lee, M.D. (2003a) Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl.Environ.Microbiol.* 69:6816-6824.
- Lu, J.R., Sanchez, S., Hofacre, C., Maurer, J.J., Harmon, B.G., y Lee, M.D. (2003b) Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assessed by using 16S rRNA and functional gene markers. *Appl.Environ.Microbiol.* 69:901-908.

M

- MacFarlane, G.T. y McBain, A.J. (1999) The Human Colonic Microbiota. In: Colonic Microbiota, Nutrition and Health, (Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B., Ed.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht - The Netherlands. pp. 1-26.
- Mackie, R.I. (1997) Gut Environment and Evolution of Mutualistic Fermentative Digestion. In: Gastrointestinal Microbiology, (Mackie, R. I. and White, B. A., Ed.). ITP Chapman & Hall Microbiology series. New York-USA pp. 13-35.
- Mackie, R.I., Sghir, A., y Gaskins, H.R. (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am.J.Clin.Nutr.* 69(suppl):1035S-1045S.
- Mann, G.V. (1994) Consecuencias metabólicas de los ácidos grasos trans en la dieta. *The Lancet (ED.ESP)* 25:250-254.
- Manteca, X. (1992) Absorción intestinal de los isómeros geométricos del ácido 9-octadecenoico. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis Doctoral: 205 pp.
- Manteca, X. y Noble, R. (1993) C18 *trans* monoinsaturated fatty acid in the diet of the hen and its accumulation in yolk and embryo tissue. *J.Sci.Fd Agric.* 63:251-255.
- Maraschiello, C., Sagara, C., y Garcia Rugeiro, J.A. (1999) Glutathione peroxidase activity, TBARs, and alpha-tocopherol in meat from chickens fed different diets. *J.Agric.Food Chem.* 47:867-872.
- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., y Gutiérrez, A. (2005) Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquím. Clín. Latinoamer.* 39:27-36.
- Mateos, G., Piquer, J., García, M., y Medel, P. (1996a) Utilización de grasas y subproductos lipídicos en dietas para avicultura. *American Soybean Association*: 3-11.
- Mateos, G., Piquer, J., García, M., y Medel, P. (1995) Utilización de grasas y subproductos lipídicos en dietas para avicultura. *Selecciones Avícolas* 37 (10): 623-631.
- Mateos, G., Rebollar, P.G., y Medel, P. (1996b) Utilización de grasas y productos lipídicos en alimentación animal: Grasas puras y Mezclas. XII Curso de especialización FEDNA 1-18.
- Mayne, S.T. (2003) Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J.Nutr.* 133:933S-940S.
- McDonald, P., Edwards, R.A., y Greenhalgh, J.F.D. (1988) Lípidos. En: *Nutrición Animal*, (Guada, J. A. y Castrillo, C. Trads., Ed.), pp. 28-44.
- Mead, GC. (1989) Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized. *J. Exp. Zool. Suppl.* 3:48-54.
- Möller, L. (1994) *In Vivo* Metabolism and Genotoxic Effects of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ.Health Perspect.* 102:139-146.

2-A. Referencias bibliográficas

- Morales, R. (2007) Las paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*: un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis doctoral:262 pp.
- Moran Jr, E.T. (2007) Nutrition of the Developing Embryo and Hatchling. *Poult.Sci.* 86:1043-1049.
- Moreno, J.J. y Mitjavila, M.T. (2003) The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (Review). *J. Nutr. Biochem.* 14:182-195.
- Moriguchi, T., Takasugi, N., y Itakura, Y. (2001) The effects of aged garlic extract on lipid peroxidation and the deformability of erythrocytes. *J.Nutr.* 131:1016S-1019S.
- Moser, A.G. y McLachlan, M.S. (1999) A non-absorbable dietary fat substitute enhances elimination of persistent lipophilic contaminants in humans. *Chemosph.* 39:1513-1521.

N

- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2001) Lípidos. In: *Lehninger Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega. 3ª ED. Barcelona-España. pp. 363-388.
- Nestel, P. (1995) Comment on *trans* fatty acids and coronary heart disease risk. *Am.J.Clin.Nutr.* 62:522-523.
- Novak, Z., Varga, S.I., Pataki, L., y Matkovics, B. (1990) Simple method for the measurement of antioxidants. *Clin.Chim.Acta* 194:115-119.

O

- Oertel, M.L. y Hartfiel, W. (1982) Wirkung von frischen und oxidierten fetten/ölen sowie von Pro- und Antioxidantien auf das Wachstum von Masthühnerküken. *Archiv für Geflügelkunde* 46:13-19.
- Oviedo-Rondon E.O., M.E.Hume, C.Hernandez, y S.Clemente-Hernandez (2006) Intestinal microbial ecology of broiler vaccinated and challenged with mixed *Eimeria* species, and supplemented with essential oil blends. *Poult.Sci.* 85:854-860.

P

- Palmquist, D.L. (1988) The feeding value of fats. In: *World Animal Science. Disciplinary approach B*, (Orskov, E. R., Ed.). Elsevier Science Publishers. Amsterdam-Holand. pp. 293-311.
- Pedroso, A.A., Menten, J.F.M., y Lambais, M.R. (2005) The Structure of Bacterial Community in the Intestines of Newly Hatched Chicks. *J.Appl.Poult.Res.* 14:232-237.
- Penumetcha, M., Khan, N., y Parthasarathy, S. (2000) Dietary oxidized fatty acids: an atherogenic risk? *J.Lipid Res.* 41:1473-1480.
- Pirard, C. y De Pauw, E. (2005) Uptake of polychlorodibenzo-p-dioxins, polychlorodibenzofurans and coplanar polychlorobiphenyls in chickens. *Environ. Int.* 31:585-591.

R

- Raszyk, J., Ulrich, R., Salava, J., y Palác, J. (1999) Evaluation and occurrence of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in animal feed factories. *Vet.Med.- Czech* 44:295-300.
- Reglamento (CE) N° 1881/2006 (2006) Reglamento del 19 de diciembre de 2006 sobre el Contenido Máximo de Determinados Contaminantes en los Productos Alimenticios. *Com.UE* 364:5-24.
- Reglamento (CE) N° 199/2006 (2006) Reglamento del 3 de febrero de 2006 Sobre el contenido maximo de dioxinas y PCBs en productos alimenticios. *Com.UE* 32:34-38.
- Robey, W. y Shermer, W. (1994) The damaging effects of oxidation. *Feed mix* 2:22-26.
- Ruiz, J.A., Perez-Vendrell, A.M., y Esteve-Garcia, E. (1999) Effect of beta-carotene and vitamin E on peroxidative stability in leng meat of broiler fed different suplemental fats. *J.Agric.Food Chem.* 47:454-463.

S

- Salanitro, J.P., Blake, I.G., Muirhead, P.A., Maglio, M., y Goodman, J.R. (1978) Bacteria Isolated From Duodenum, Ileum, And Cecum Of Young Chicks. *Appl.Environ.Microbiol.* 35:782-790.
- Sánchez-Muniz, F.J., Bastida, S., y Gonzales-Muñoz, M.J. (1999) Column and High-Performance Size Exclusion Chromatography Applications to the *in vivo* Digestibility Study of a Thermoxidized and Polymerized Olive Oil. *Lipids* 34:1187-1192.
- Sanhueza, J., Nieto, S., y Valenzuela, A. (2002) Conjugated linoleic acid: A Trans isomer fatty acid potentially beneficial. *Rev.Chil.Nutr.* 29:98-105.
- Sapkota, A.R., Lefferts, L.Y., McKenzie, S., y Walker, P. (2007) What do we feed to food-production animals? A review of animal feed ingredients and their potential impacts on human health. *Environ.Health Perspect.* 115:663-670.
- SCAN (2000) Dioxin contamination of feedingstuffs and their contribution to the contamination of food of animal origin: Scientific opinion. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General 1-105.
- SCF (2002a) Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General Scientific Committee on Food:1-84.
- SCF (2002b) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Occurrence in Foods, dietary exposure and health effect: Scientific opinion. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. Scientific Committee on Food:1-195.
- Schechter, A., Birnbaum, L., Ryan, J.J., y Constable, J.D. (2006) Dioxins: An overview. *Environ. Res.* 101:419-428.

2-A. Referencias bibliográficas

- Schechter, A., Dellarco, M., Pöpke, O., y Olson, J. (1998) A comparison of dioxins, dibenzofurans and coplanar PCBs in uncooked and broiler ground beef, catfish and bacon. *Chemosph.* 37:1723-1730.
- Schiavone, A., M.D.Baucells, y A.C.Barroeta (2005) Oxidative status of dietary fat influences lipid stability of erythrocytes in chickens. 9th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition 97-97.
- Schmid, P., Gujer, E., Degen, S., Zennegg, M., Kuchen, A., y Wuthrich, C. (2002) Levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in food of animal origin. The Swiss dioxin monitoring program. *J.Agric.Food Chem.* 50:7482-7487.
- Sell, J.L., Angel, C.R., Piquer, F.J., Mallarino, E.G., y Al-Batshan, H.A. (1991) Developmental Patterns of Selected Characteristics of the Gastrointestinal Tract of Young Turkeys. *Poult.Sci.* 70:1200-1205.
- Sheehy, P.J.A., Morrissey, P.A., y Flynn, A. (1993) Influence Of Heated Vegetable-Oils And Alpha-Tocopheryl Acetate Supplementation On Alpha-Tocopherol, Fatty-Acids And Lipid-Peroxidation In Chicken Muscle. *Br.Poult.Sci.* 34:367-381.
- 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.* 71:53-65.
- Shepperson, N. (1993) Procesos industriales y calidad de las grasas. IX Curso de especialización FEDNA 1-13.
- Sklan, D. (2001) Development of the digestive tract of poultry. *Worlds Poult.Sci.J.* 57:415-428.
- Sklan, D. (2004) Early gut development: the interaction between feed, gut health and immunity. In: *Interfacing Immunity, gut health and performance*, (Tucker, L. A. and Taylor-Pickard, J. A., Ed.). Nottingham University Press. Nottingham-UK. pp. 9-32.
- Sklan, D. y Noy, Y. (2003) Functional development and intestinal absorption in the young poult. *Br.Poult.Sci.* 44:651-658.
- Smith, R.C., Gore, J.Z., y Roland, D. (1988) Hemolysis Of Chicken Erythrocytes By Tert-Butyl Hydroperoxide And Protection By Plasma. *Poult.Sci.* 67:1632-1635.
- Spiteller, G. (2003) Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? *Med. Hypoth.* 60:69-83.
- Staprans, I., Pan, X.M., Miller, M., y Rapp, J.H. (1993) Effect Of Dietary-Lipid Peroxides On Metabolism Of Serum Chylomicrons In Rats. *Am.J.Physiol.* 264:G561-G568.
- Staprans, I., Rapp, J.H., Pan, X.M., y Feingold, K.R. (1996) Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats. *J.Lipid Res.* 37:420-430.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., y Dore, J. (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl.Environ.Microbiol.* 65:4799-4807.

T

- Tard, A., Gallotti, S., Leblanc, J.C., y Volatier, J.L. (2007) Dioxins, furans and dioxins-like PCBs: Occurrence in food and dietary intake in France. *Food Addit. Contam.* 24:1007-1017.
- Torok, V.A., Ophel-Keller, K., Loo, M., y Hughes, R.J. (2008) Application of methods for identifying broiler chickens gut bacterial species linked energy metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:783-791.
- Turek, J.J., Watkins, B.A., Schoenlein, I.A., Allen, K.G.D., Hayek, M.G., y Aldrich, C.G. (2003) Oxidized lipid depresses canine growth, immune function, and bone formation. *J. Nutr. Biochem.* 14:24-31.

U

- Udilova, N., Jurek, D., Marian, B., Gille, L., Schulte-HErmann, R., y Nohl, H. (2003) Induction of lipid peroxidation in biomembranes by dietary oil components. *Food Chem. Toxicol.* 41:1481-1489.
- Uni, Z. y Ferket, P.R. (2007) In ovo feeding: impact on intestinal development, energetic status and growth. XLIV Symposium científico de avicultura AECA-WPSA 24-26 Octubre:65-72.
- Uni, Z., Geyra, A., Ben-Hur, H., y Sklan, D. (2000) Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. *Br. Poult. Sci.* 41:544-551.
- Uni, Z., Noy, Y., y Sklan, D. (1999) Posthatch Development of Small Intestinal Function in the Poult. *Poult. Sci.* 78:215-222.
- Uni, Z., Platin, R., y Sklan, D. (1998a) Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. *J Comp Physiol B* 168:241-247.
- Uni, Z., Ganot, S., y Sklan, D. (1998b) Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poult. Sci.* 77:75-82.

V

- Van Der Klis, J.D. y Jansman, A.J.M. (2002) Optimising nutrient digestion, absorption and gut barrier function in monogastrics: Reality or illusion? In: *Nutrition and health of the gastrointestinal tract*, (Block, M. C., Vahl, H. A., de Lange, L, van de Braak, A. E., Hemke, G., and Hensing, M., Ed.). Wageningen Academic Publishers. Wageningen-The Netherlands. pp. 15-36.
- van der Wielen, P.W.J.J., Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings, B.A.P., y van Knapen, F. (2000) Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2536-2540.
- van der Wielen, P.W.J.J., Keuzenkamp, D.A., Lipman, L.J.A., van Knapen, F., y Biesterveld, S. (2002) Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microb. Ecol.* 44:286-293.

2-A. Referencias bibliográficas

- Van Leeuwen, P., Mouwen, J.M.V.M., Van Der Klis, J.D., y Verstegen, M.W.A. (2004) Morphology of the small intestinal mucosal surface of broiler in relation to age, diet formulation, small intestinal microflora and performance. *Br.Poult.Sci.* 45:41-48.
- Van Stijn, F., Kerkhoff, M.A.T., y Vandeginste, B.G.M. (1996) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and fats on-line donor-acceptor complex chromatography and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromat. A* 750:263-273.
- Venereo, J.R. (2002) Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev.Cubana Med.Milit.* 31:126-133.
- Villar, M. (2004) Determinación y distribución de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el tratamiento de lodos de edars. Universidad de Sevilla. Tesis Doctoral: 384 pp.
- Villaverde, C. (2005) Interaction between dietary poliunsaturated fatty acids and vitamin E in body lipid composition and α -tocoferol content of broiler chickens. Universidad Autónoma de Barcelona . Doctoral Thesis:141 pp.
- Villaverde, C., Cortinas, L., Barroeta, A.C., Martin-Orué, S., y Baucells, M.D. (2004) Relationship between dietary unsaturation and vitamin E in poultry. *J. Anim. Physiol. Anim.Nutr.* 88:143-149.
- Vispo, C. y Karasov, W.H. (1997) The Interaction of Avian Gut Microbes and Their Host: An Elusive Symbiosis. In: *Gastrointestinal Microbiology*, (Mackie, R. I. and White, B. A., Ed.). ITP Chapman & Hall Microbiology series. New York-USA. pp. 116-155.

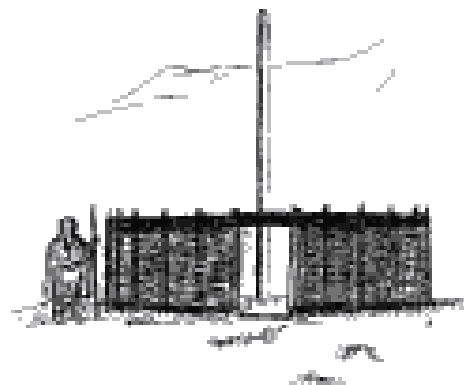
W

- Wang, S.Y., Bottje, W., Maynard, P., Dibner, J., y Shermer, W. (1997) Effect of santoquin(R) and oxidized fat on liver and intestinal glutathione in broilers. *Poult.Sci.* 76:961-967.
- Wiseman, J. y Cole, D.J.A. (1983) The Utilization of Waste in Animal Feeds. In: *Upgrading waste for feeds and food*. Robert Hartnoll Ltd. Bodmin Cornwall-UK. pp. 233-245.

Z

- Zhu, X.Y. y Joerger, R.D. (2003) Composition of microbiota in content and mucus from caeca of broiler chickens as measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Poult.Sci.* 82:1242-1249.
- Zhu, X.Y., Zhong, T.Y., Pandya, Y., y Joerger, R.D. (2002) 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl.Environ.Microbiol.* 68:124-137.
- Ziggers, D. (2005) Oils and fats indispensable in feed. *Feed Tech.* 1:16-19.
- Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D.L., y de Vos, W.M. (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA from human faecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl.Environ.Microbiol.* 64:3854-3859.

3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL



La revisión bibliográfica presentada se ha centrado en el estudio del tracto gastrointestinal del ave y su desarrollo desde la eclosión hasta alcanzar la madurez fisiológica. Por otra parte se ha evidenciado la gran variabilidad de materias grasas recicladas disponibles para su uso en la alimentación de las aves. El potencial energético de estas materias grasas hace interesante su utilización. Además, la posibilidad de introducir estas grasas residuales en la alimentación animal supone una vía positiva que implica la reducción del reciclaje de estos residuos y un menor impacto medioambiental. Pero hay que asegurar su inocuidad, ya que se ha puesto de manifiesto que estas grasas recicladas tienen la capacidad de incorporar contaminantes orgánicos o presentar productos de alteración, sustancias que pueden ser nocivas en elevadas concentraciones. Por ello, es fácil comprender la prioridad de estudiar si la utilización de grasas recicladas en la alimentación animal tiene una repercusión negativa en la calidad del alimento producido, con especial atención a la posible presencia de residuos o sustancias perjudiciales que puedan transferirse a la carne y tener un impacto negativo sobre el consumidor, pero no desdeñar su efecto en la productividad y salud del animal en producción. En este marco se inscribe el proyecto de investigación "Quality and safety of feeding fats obtained from waste or byproducts from the food chain" (Food-ct-2004-007020), del cual forma parte los trabajos presentados en esta memoria.

En base a la documentación disponible sobre los contaminantes y productos de alteración más frecuentes en las grasas recicladas, así como en la importancia de sus efectos tras su consumo, se decidió estudiar las implicaciones de la presencia de altos niveles de isómeros *trans*, dioxinas y PCBs, hidrocarburos aromáticos policíclicos y productos de oxidación lipídica.

Si bien, encontramos en la bibliografía algunos ensayos en esta dirección, la mayoría se centran en el impacto sobre la alimentación humana. Sin embargo, no está suficientemente documentado el impacto de su utilización en alimentación animal y en concreto en el pollo de carne.

En base a lo expuesto se ha planteado como objetivo general de la presente tesis doctoral:

Evaluar el efecto de la utilización de grasas alteradas o contaminadas sobre el rendimiento productivo y la salud del animal que las consume, a través de los siguientes indicadores:

- Parámetros productivos, mortalidad e incidencias patológicas de los animales

Objetivos y Planteamiento Experimental

- Nivel de oxidación *in vivo* en base a :
 - Resistencia de la membrana de los eritrocitos (tasa de hemólisis)
 - Estrés oxidativo a nivel sanguíneo (TBARs)
- Población microbiana presente en el tracto intestinal, :
 - Cambios en la diversidad microbiana por t-RFLP
 - Actividad microbiana a través de productos de fermentación
 - Presencia de microorganismos patógenos como coccidias en excreta
- Histomorfología del tracto digestivo del ave en muestras de yeyuno.

En paralelo, evaluar el efecto de la edad del ave sobre la evolución de los parámetros anteriormente descritos.

Para el logro de los objetivos propuestos, se diseñaron cuatro experimentos. En el primer Experimento (T), se evaluó la presencia en la grasas de ácidos grasos *trans*; en el segundo Experimento (D), se evaluó la presencia de dioxinas y PCBs; en el tercer Experimento (P), se evaluó la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAPs; y en el cuarto Experimento (O), la presencia en la grasa de productos de oxidación lipídica.

En todos los experimentos, según se detalla en el apartado de material y métodos, se utilizaron 2 niveles diferentes de alteración o contaminación de las grasas. Un nivel alto (H) y un nivel bajo (L) incluidos en raciones base constituidas esencialmente de maíz y soja con un nivel de inclusión de la grasa del 6 %. Las dietas experimentales así constituidas se proporcionaron a los pollos desde los 5 hasta los 37 días de vida y las variables tratamiento y edad fueron evaluadas a 9, 13, 21 y 37 días de vida. La evaluación de la presencia de microorganismos patógenos, en este caso, coccidias de *Eimeridae*, se realizó a 18 y 37 días de vida de las aves.

4. MATERIAL Y MÉTODOS



A continuación se describe la metodología empleada en las 4 pruebas experimentales realizadas en el presente trabajo. En el primer experimento, se evaluó la presencia de ácidos grasos *trans* (T); en el segundo experimento, la presencia de dioxinas y PCBs (D); en el tercero, la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAPs (P) y finalmente en el experimento cuarto, la presencia de productos de oxidación (O), en las fuentes de grasa del pienso.

Los experimentos T y D fueron realizados en invierno (diciembre 2005 - febrero 2006), en tanto que los experimentos P y O se llevaron a cabo entre el final de la primavera y principios del verano (mayo-junio 2006). El inicio de los experimentos tenía una diferencia de 14 días, así por ejemplo, el experimento P empezó la primera quincena de mayo (4 de mayo) y el experimento O empezó dos semanas después (18 de mayo).

Todos los experimentos siguieron un mismo protocolo experimental, aprobado por el Comité de Ética de la UAB, y de acuerdo a las normativas de la Unión Europea.

4.1. ANIMALES E INSTALACIONES

Las pruebas experimentales se llevaron a cabo en las Granjas Experimentales del *Servei de Granjes* de la Facultad de Veterinaria de la UAB.

En cada uno de los experimentos se utilizaron un total de 160 pollos de carne hembra de la estirpe Ross 308 (Terra-Avant, S.A., Inglés, Girona), de las cuales 80 fueron seleccionadas al azar en los sucesivos muestreos realizados. El peso promedio, al inicio de la fase experimental (5 días de vida) era de $89 \pm 0,34$ g en el experimento T, de $84 \pm 0,44$ g en el experimento D, de $77 \pm 0,54$ g en el experimento P y de $84 \pm 0,32$ g en el experimento O.

Durante los 4 primeros días, las aves fueron alojadas en el suelo en corralinas circulares equipadas de comederos (5 kg) y bebederos tipo tolva de plástico (5 L), lámparas infrarrojas y cama de serrín.

Desde los 5 días de vida hasta el final de las pruebas (a los 37 días), las aves fueron distribuidas al azar en 8 corrales de 2 m² con una densidad de 10 aves/m² (20 aves por corral), equipados de

comederos tipo tolva de plástico (10 kg), bebederos automáticos tipo tetina con tanques de agua independientes de plástico (5 L), lámparas infrarrojas y cama de serrín. La nave en la que se llevaron a cabo los 4 experimentos permite el control permanente de temperatura, humedad y ventilación, adecuados a la edad y nivel de desarrollo de los animales. Estas condiciones de crianza fueron similares en todos los experimentos y se llevaron a cabo de manera que se pudieran reproducir en lo posible, las condiciones de manejo y crianza comercial de pollos de carne.

4.2. DIETAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

A. Dietas experimentales.- Las raciones alimenticias se prepararon a partir de un pienso base, común para todos los experimentos (Tabla 4.1.). Este pienso estaba compuesto principalmente de maíz y soja, con un nivel de inclusión de la grasa del 6%. Las diferentes materias grasas utilizadas en los diferentes ensayos se presentan en la Tabla 4.3.

Las dietas fueron formuladas siguiendo las recomendaciones del NRC (1994), y se elaboraron en la planta de fabricación de piensos de la Universidad Politécnica de Valencia.

Tabla 4.1. Ingredientes y composición nutricional estimada del pienso base empleado en los cuatro ensayos experimentales

Ingrediente	(%)	Composición nutricional estimada (en fresco)	
Maíz	52.7	Energía bruta (kcal/kg)	4968
Harina de soja (47% de PB)	30.0	Materia seca, %	90.8
Soja extrusionada	6.0	Cenizas, %	6.5
Grasa añadida	6.0	Proteína bruta, %	21.1
CIH L-Lisina	0.3	Extracto etéreo, %	9.5
DL-Metionina (99%)	0.2	Fibra bruta, %	3.8
Fosfato dicálcico	2.5		
Carbonato de calcio	1.3		
Cloruro de sodio	0.5		
Corrector*	0.5		

*Corrector vitamínico-mineral por kg de pienso: Vitamina A: 6000 UI; Vitamina D3: 1200 UI; Vitamina E: 10 mg; Vitamina K₃: 1.5 mg; Vitamina B₁: 1.1 mg; Vitamina B₂: 4 mg; Vitamina B₆: 1.5 mg; Vitamina B₁₂: 9 µg; Ácido fólico: 4 mg; Biotina: 50 µg; Ácido pantoténico: 6 mg; Ácido nicotínico: 21 mg; Colina: 360 mg; Mn: 75 mg; Zn: 50 mg; I: 0,18 mg; Fe: 30 mg; Cu: 6 mg; Se: 0.2 mg; Co: 0.2; Etoxiquin: 16 mg. Adicionalmente 15 mg de Cloruro de colina

B. Diseño experimental.- Los 4 ensayos experimentales fueron diseñados siguiendo un mismo esquema, donde el único factor de variación fue el nivel de alteración o contaminación de la grasa añadida, en concreto:

Experimento T.- Evaluación de la presencia de ácidos grasos *trans* (T)

- Tratamiento HT, nivel alto de ácidos grasos *trans*. Suplementación de 6 % de destilado de palma hidrogenado.
- Tratamiento LT, nivel bajo de ácidos grasos *trans*. Suplementación de 6 % de destilado de palma sin hidrogenar.

Experimento D.- Evaluación de la presencia de dioxinas y PCBs (D)

- Tratamiento HD, nivel alto de dioxinas y PCBs. Suplementación de 6 % de aceite de pescado A.
- Tratamiento LD, nivel bajo de dioxinas y PCBs. Suplementación de 6 % de aceite de pescado B.

Experimento P.- Evaluación de la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAPs (P)

- Tratamiento HP, nivel alto de HAPs. Suplementación de 6% de aceite ácido de orujo de oliva.
- Tratamiento LP, nivel bajo de HAPs. Suplementación de 6% de aceite ácido de oliva.

Experimento O.- Evaluación de la presencia de productos de oxidación (O)

- Tratamiento HO, nivel alto de productos de oxidación. Suplementación de 6 % de aceite de girasol/oliva (70/30) residuo de freiduría. Calentado a 165-170 °C durante 8 horas.
- Tratamiento LO, nivel bajo de productos de oxidación. Suplementación de 6 % de aceite de girasol/oliva (70/30) en condiciones naturales.

Hasta los 4 días de vida, las aves consumieron el pienso con el nivel de alteración/contaminación bajo (L) (Tabla 4.2.). Entre los 5 y 37 días de vida (período experimental de 32 días), fueron alimentadas *ad libitum* con uno de los 2 piensos experimentales correspondientes a cada ensayo.

Cada pienso experimental (H y L) fue administrado a 80 aves, distribuidas al azar en 4 corrales a razón de 20 aves/corral (2 tratamientos x 4 réplicas x 20 aves)

Tabla 4.2. Nivel de alteración o contaminación de las grasas utilizadas en los 4 experimentos

Experimento	Trat.*	Materia grasa 6%	Nivel de alteración o contaminación
1. Ácidos Grasos Trans (T)	HT	Destilado de palma hidrogenado	12,40 % ácidos grasos <i>trans</i> ^A
	LT	Destilado de palma	0,65 % ácidos grasos <i>trans</i> ^A
2. Dioxinas y PCBs (D)	HD	Aceite de pescado	28,8 pg TEQ/g PCDD/Fs + DL-PCBs de aceite ^B
	LD	Aceite de pescado	9,64 pg TEQ/g PCDD/Fs + DL-PCBs de aceite ^B
3. HAPs (P)	HP	Aceite ácido de orujo oliva	5290 ng HAPs/g aceite+ PBDEs < 2 ng/g aceite ^C
	LP	Aceite ácido de oliva	<18 ng HAPs/g aceite+ PBDEs < 2 ng/g aceite ^C
4. Productos de Oxidación (O)	HO	Aceite de girasol/oliva residuo de fritura (70/30)	6,61 % Polímeros y 67,43 p-anisidina ^D
	LO	Aceite de girasol/oliva (70/30)	0,35 % Polímeros y 2,74 p-anisidina ^D

*H=nivel alto; L=nivel bajo, de los productos de alteración o contaminación estudiados; ^A AG= Ácidos grasos *Trans*; Análisis realizado en el Departamento de Ciencia de los Alimentos, Universidad de Bolonia (Italia); ^B TEQ=Equivalentes tóxicos; PCDD/Fs= Policloro di benzo dioxinas/furanos; DL-PCBs=Dioxin like-Policloro bifenilos; Análisis realizado en el Laboratorio de Dioxinas, Departamento de Ecotecnologías, IIQAB-CSIC (España); ^C HAP=Hidrocarburos aromáticos policíclicos; PBDEs= Difenilos éteres polibromados; Análisis realizado en el Laboratorio Físico & Tóxico químico, Universidad de Burdeos (Francia); ^D Análisis realizado en el Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Barcelona (España)

4.3. CONTROLES DE PRODUCCIÓN

Diariamente, en todos los experimentos se realizaron controles de temperatura, ventilación, estado sanitario y posibles bajas. Se realizaron 4 controles productivos, a los 9, 13, 21 y 37 días de vida de las aves (que corresponden a los 4, 8, 16 y 32 días del período experimental), para determinar la ganancia media diaria (GMD, g/ave y día), consumo medio diario (CMD, g/ave y día) y el índice de transformación (IT, g/g).

4.4. SACRIFICIO E INSPECCIÓN POST-MORTEM

Una vez realizado el control productivo, se procedió a la selección al azar de 4 aves por corral (16 animales por tratamiento) el día 9 (1^{er} sacrificio) y de 2 aves por corral (8 aves por tratamiento) los otros días de muestreo (13, 21 y 37 días de vida).

Inicialmente, se tomaron muestras de sangre; posteriormente, se procedió al sacrificio de los animales con el empleo de dióxido de carbono 4.5 de alta pureza (Abelló Linde S.A.), en una cámara de aire cerrada. Posteriormente, se realizó el examen post-mortem para la evaluación de posibles alteraciones patológicas provocadas por los tratamientos y se examinaron el tejido muscular, hígado, bazo, timo, bolsa de Fabricio y tracto digestivo. Los parámetros observados en estos órganos fueron la consistencia, el tamaño, el color o la presencia de lesiones macroscópicas.

4.5. RECOGIDA DE MUESTRAS

En todos los ensayos se tomaron muestras representativas de los diferentes piensos, al inicio (día 1) y al final (día 32) del período experimental.

Luego del examen post-mortem, se procedió a la recogida de muestras de contenido cecal y de tejido intestinal. La Tabla 4.3., presenta los tipos y número de muestras recogidas en los diferentes muestreos realizados.

Tabla 4.3. Días de control y número de muestras recogidas para las determinaciones analíticas realizadas en los 4 ensayos experimentales

Tipo de muestra	Determinación	Días de muestreo (días de vida)	Nº Muest/Trat y control
Sangre	Tasa de hemólisis TBARs ¹	9, 13, 21 y 37	8*
Contenido cecal	Análisis del perfil microbiano por t-RFLP Producción de AGVs ²	9, 21 y 37	8*
Excreta	Oocistos de Eimerias (coccidias por la técnica de McMaster)	18 y 37	4 **
Porción yeyuno e ileon	Histomorfología: Longitud de vellosidades Profundidad de criptas Nº de linfocitos intraepiteliales	9 y 21	8

*Día 9: *pool* de muestras de 2 aves para constituir 8 muestras (procedentes de 16 animales). ***pool* de excreta por réplica. ¹ TBARs= Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. ² AGVs=Ácidos grasos volátiles

A los 18 y 37 días de vida de las aves, se recogieron muestras representativas de excreta por corral (4 muestras por tratamiento). En este caso el muestreo tuvo una duración de 2 horas ya que las referidas muestras deben ser conservadas en refrigeración (4°C) en el menor tiempo posible.

En los 4 experimentos, el día 9 se procedió a realizar un *pool* de muestras de 2 aves para constituir una muestra (debido a que los animales eran muy pequeños), así se obtuvieron 8 muestras procedentes de 16 animales por tratamiento; este procedimiento se realizó en las muestras de sangre y de contenido cecal. Para las restantes recogidas, cada ave constituyó una muestra.

4.5.1. SANGRE

Se tomó 1 ml de sangre por ave muestreada en tubos de heparina (Venosafe™ VF-054SHL) por punción IV en la vena homo braquial, y se almacenó a 4 °C para posterior determinación de la tasa de hemólisis y TBARs.

4.5.2. CONTENIDO CECAL

Las muestras de contenido cecal fueron recogidas en tubos eppendorf de 1,5 ml de capacidad, que se congelaron a – 80°C y se conservaron para posterior análisis mediante técnicas moleculares para determinar la diversidad microbiana y para análisis de la actividad microbiana a través de la producción de ácidos grasos volátiles.

4.5.3. EXCRETA

Se tomaron muestras de excreta procedentes de todos los individuos (*pool* de excreta por corral), se almacenaron a 4 °C para el posterior análisis de contenido de coccidios de *Eimerias* (ooquistes/gramo) a través de la técnica de MacMaster (Ministry of Agriculture Fisheries and Food-UK, 1986).

4.5.4. SECCIONES DE INTESTINO PARA HISTOMORFOLOGÍA

Una sección de 10 cm de largo de la porción yeyuno-ileon, en concreto de la zona anterior a la desembocadura de los ciegos, se conservó en formol al 10 % y se almacenó a temperatura ambiente para posterior procesamiento y análisis del posible efecto de los tratamientos sobre la estructura de la mucosa intestinal.

4.6. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Las diferentes muestras recogidas se procesaron por una serie de técnicas analíticas, cuya descripción se presentan a continuación. Las determinaciones relativas a la composición nutricional de los piensos, parámetros sanguíneos, producción de ácidos grasos de cadena corta (AGVs), excreta e histomorfología fueron llevados a cabo por el grupo de nutrición animal de la UAB; las determinaciones de la diversidad microbiana, se realizaron conjuntamente entre la unidad de nutrición animal, el laboratorio de genética de la UAB y el CRESA (Centre de Recerca en Sanitat Animal); finalmente, la determinación de las características y composición de las materias grasas utilizadas en los experimentos se llevó a cabo en los laboratorios de los distintos integrantes del *Proyecto Europeo* en el que se enmarca el presente trabajo.

4.6.1. ANÁLISIS DEL PIENSO

Las determinaciones analíticas de los piensos experimentales (Tabla 4.4.) se llevaron a cabo en los laboratorios de Nutrición y Alimentación Animal del *Departament de Ciència Animal i dels Aliments* de la UAB. El análisis de la composición nutricional de los piensos (AOAC, 1995) y del contenido energético (a través de una bomba calorimétrica de oxígeno adiabático, IKA Calorimeter C4000-JANKE & KUNKEL) se realizó en muestras representativas de cada pienso experimental.

Tabla 4.4. Valoración de la composición nutricional de los piensos experimentales

Exp. Trat.	1. AG Trans (T)		2. Diox. y PCBs (D)		3. HAPs (P)		4. Oxidación (O)	
	HT	LT	HD	LD	HP	LP	HO	LO
EB kcal/kg	4,383	4,324	4,707	4,606	4,867	4,834	4,707	4,444
MS %	89.3	89.3	90.4	90.0	91.1	91.3	91.0	91.1
GB %	9.38	9.65	9.50	9.02	9.06	9.72	9.80	9.80
PB %	19.30	19.13	22.15	21.50	23.09	21.07	19.97	19.51
Cnzs %	6.92	6.72	6.25	6.20	6.70	6.50	6.70	6.60

EB: Energía bruta; MS: Materia seca; GB: Grasa bruta; PB: Proteína bruta; Cnzs: Cenizas; H y L: Niveles alto y bajo.
Análisis realizado por el grupo de Nutrición Animal, UAB

4.6.2. TASA DE HEMÓLISIS

Esta técnica analítica, adaptada de otros trabajos previos (Moriguchi *et al.*, 2001; Schiavone *et al.*, 2005), permite determinar la resistencia de la membrana de los eritrocitos ante cambios del gradiente de concentración extracelular. La resistencia puede verse afectada por la alteración en la estructura de los lípidos que componen la membrana celular.

Los pasos seguidos en el desarrollo de la técnica (PNT: CAA/TA/0030-00, 2006) se resumen a continuación:

Las muestras de sangre fueron centrifugadas para separar la fase sólida de la líquida, y descartar el plasma. El contenido de eritrocitos fue lavado con solución salina añadiendo posteriormente BHP (t-Butil hidroperóxido) a cada muestra. Esta suspensión se incubó a 37°C con agitación constante durante 90 min.

200 µl de la suspensión incubada se depositaron en dos tubos, uno con tampón isotónico (a pH 7,4) y otro con agua destilada, para su posterior centrifugación.

Posteriormente, se procedió a la lectura de su absorbancia (A), a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (UV-1203 SHIMADZU).

La tasa de hemólisis (%) fue calculada según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ hemólisis} = (A \text{ de la muestra en tampón isotónico} / A \text{ de la muestra en agua destilada}) \times 100$$

Donde: A = Absorbancia en el espectrofotómetro

Todas las muestras se procesaron por duplicado.

Finalmente, muestras de suspensión de eritrocitos + BHP fueron almacenadas a -80°C en tubos eppendorf, antes de ser incubadas, para concluir más adelante con la determinación de productos intermediarios de oxidación, TBARs.

4.6.3. NIVEL DE OXIDACIÓN EN SANGRE (TBARS)

La determinación (PNT: CAA/TA/0031-00, 2006) de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como productos secundarios de oxidación, en concreto malondialdehído (MDA), se realizó a partir de muestras congeladas de eritrocitos + BHP (Beuge y Aust, 1987)

1 ml de muestra enriquecida con BHP sin incubación previa, mezclado con una solución compuesta de TBA (ácido tiobarbitúrico), HCL (ácido clorhídrico), TCA (ácido tricloracético) y BHT (butil hidroxitolueno) fue llevado hasta ebullición y centrifugado, para la posterior lectura de su absorbancia (a una longitud de onda de 535 nm).

Los valores de absorbancia obtenidos se transformaron considerando un coeficiente de extinción molar de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Wills, 1969), para el MDA. Cada muestra fue procesada por duplicado.

4.6.4. PERFIL MICROBIANO POR t-RFLP

El estudio de la población microbiana de las muestras congeladas de contenido cecal se realizó mediante t-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorfism) siguiendo el procedimiento descrito por Højberg *et al.* (2005), con algunas modificaciones. Se describe a continuación:

- La extracción del DNA bacteriano se realiza a partir de muestras del contenido cecal congeladas a -80°C (0,250 g). Se emplea para ello el kit de extracción QIAamp® DNA Stool Minikit 50 (QIAGEN) siguiendo las indicaciones comerciales. Se incorpora un paso adicional de lisis enzimática de las células bacterianas con lisozima (SIGMA: from chicken egg white L7651-1G).
- El 16S rDNA bacteriano se amplifica por PCR utilizando cebadores universales, en concreto, el *primer* S-D-Bact-0008-a-S-20 (5'-6-FAM-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') marcado con fluorescencia y el *primer* reverso PH1552 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'). Las condiciones de amplificación son las siguientes: en un volumen final de 25 μl , 2.5 μl de buffer (10xPCR Buffer 1), 2 μl de MgCl_2 50 mM, 4 μl dNTPs (1x), 1 μl primer F (10 μM), 1 μl primer R (10 μM), 0.25 μl TAQ (Invitrogen) (1.25 U) y 0.2 μl ADN. La amplificación se realiza con 30 ciclos de reacción, bajo las siguientes condiciones: 95°C 30 s, 55°C 1 min y 72°C 1 min. La extensión se realiza a 72°C durante 10 min. El producto de PCR amplificado se comprueba en gel de agarosa al 1%. Se realiza una purificación del producto de PCR con el kit comercial QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) siguiendo las indicaciones comerciales.

- El producto de PCR se fragmenta con la enzima de restricción Hha I (20 U), tras 8 h de reacción, en un volumen final de reacción de 20 μ l. A continuación, se realiza un proceso de purificación de los fragmentos, siguiendo el protocolo del kit de purificación (QIAquick® Nucleotide Removal Kit 50).
- Los fragmentos obtenidos marcados con fluorescencia, con diferentes tamaños, se analizan tras separación por electroforesis capilar utilizando el modo GeneScan (en el equipo de electroforesis capilar Applied Biosystems, ubicado en el departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria de la UAB). Los tamaños de los fragmentos pueden ser calculados con ayuda del patrón GS-1000 ROX, PE Biosystems.
- Se realiza una estandarización posterior de los datos obtenidos para normalizar el DNA cargado en el capilar siguiendo las recomendaciones de Kitts (2001). Para ello, en cada muestra se suman todas las áreas de los picos para determinar el ruido basal. Se calcula la relación existente entre el área de cada muestra y el área mínima encontrada. Este cociente a su vez se multiplica por el pico más pequeño encontrado en la muestra de menor área. Los picos que presentan un valor inferior a éste obtenido son eliminados. Además se eliminan aquellos picos que presentan menos de 50 pares de bases. El dendograma se construye empleando el programa Fingerprinting II (informatix, Bio-Rad) ubicado en las instalaciones del CreSA.
- Adicionalmente, para poder inferir la posible composición bacteriana, se utiliza la restricción *in silico*, teórica, introduciendo los primers y la enzima de restricción utilizados experimentalmente. Esta restricción teórica se ha realizado con la ayuda de la herramienta TAP-RFLP del software Ribosomal Database II Project (Cole *et al.*, 2003).

4.6.5. PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES

La concentración de AGVs se determinó a partir de muestras de contenido cecal (400 mg aproximadamente) congelado a -80°C (PNT: CAA/PM/0008-00, 2005). Brevemente, el análisis de AGVs se realizó según el método de Jensen mediante cromatografía de gases tras su derivatización con MTBSTFA (N-metil-N-*tert*-butildimetilsililtrifluoroacetamida) utilizando como patrón interno 4-metil valérico (5 μ moles).

4.6.6. TÉCNICA DE McMASTER PARA LA DETERMINACIÓN DE COCCIDIAS

Fundamentada en la separación de partículas por diferencia de densidad, esta técnica nos permitió medir la concentración de oocistos de *Eimeria* por gramo de excreta y consta principalmente de los siguientes pasos:

- 3 g de excreta procedente de cada ave se disuelven en una solución de sulfato de zinc con una densidad de 1,18
- Las partículas groseras se separan por filtración y el líquido debe ser sometido a agitación constante para coleccionar de su superficie 0,15 ml que son instilados en dos compartimientos de la cámara de McMaster dejando reposar por espacio de 10 mín.
- La lectura de la concentración de oocistos por gramo, se realiza con la ayuda de un microscopio de luz óptica (Olympus CX31) a 10x y 40x de aumento, realizando el conteo total en las diez celdas que constituyen cada compartimiento, obteniendo la media aritmética de ambos compartimientos de la cámara y multiplicando el resultado final por 100.

4.6.7. HISTOMORFOLOGÍA

Las posibles alteraciones de las vellosidades intestinales, de las criptas de Lieberkung o la presencia de un número anormal de linfocitos intraepiteliales (Uni *et al.*, 1998), en respuesta a los tratamientos, se determinó a través de la inclusión en parafina de muestras de tejido intestinal, así:

- Las muestras de tejido intestinal conservadas en formol, se prepararon para la realización de cortes histológicos, mediante la inclusión en parafina. Los bloques de parafina se cortaron a 10 µm y las muestras se fijaron en portaobjetos. Posteriormente los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina-eosina.
- Los referidos cortes histológicos nos permitieron observar y medir la longitud de las vellosidades intestinales considerando la longitud desde la boca de la cripta, hasta el extremo superior de la vellosidad. El dato de cada muestra fue obtenido calculando el promedio de 10 vellosidades observadas.
- La profundidad de las criptas intestinales de Lieberkung se midió considerando la boca de la cripta hasta el fondo del lumen de la misma. También en este caso se promediaron 10 observaciones.

- El número de linfocitos intraepiteliales se determinó por conteo directo en el microscopio, considerando la relación de linfocitos presentes por cada 100 enterocitos.
- Todas las observaciones fueron hechas a través de un microscopio de luz óptica Olympus CX31 a aumentos de 10X para las mediciones de la longitud de vellosidad y profundidad de cripta y de 20X para el conteo de linfocitos.

4.6.8. OTRAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS

A. Caracterización de las materias grasas.- Las grasas utilizadas en este estudio fueron caracterizadas de forma exhaustiva a través de diferentes técnicas analíticas desarrolladas en los distintos laboratorios de los grupos integrantes del *Proyecto Europeo* (Feeding Fats Safety). El análisis químico se fundamentó en la composición (humedad; acidez; perfil ácidos grasos; ácidos grasos *trans*; ácidos grasos conjugados; colesterol; esteroides; tocoferoles/tocotrienoles); niveles de degradación (productos de oxidación esteroides; productos oxidación ácidos grasos; polímeros; mono y diacilglicerol; peróxidos; MDA; p-anisidina); y presencia de contaminantes (dioxinas y PCBs; hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAPs).

Algunos de los resultados más sobresalientes, así como el laboratorio responsable, se presentan en el apartado de anexos: perfil de ácidos grasos de las materias grasas y contenido de ácidos grasos de las materias grasas (Anexo 2: Tabla 2A y 2B, respectivamente); presencia de compuestos de alteración, colesterol y parámetros de calidad de las materias grasas (Anexo 3: Tabla 3); parámetros de oxidación lipídica y contenido de antioxidantes naturales (tocoferoles y tocotrienoles) de las materias grasas de los 4 experimentos (Anexo 3: Tabla 4); nivel de alteración o contaminación de los piensos experimentales (Anexo 4: Tabla 5); digestibilidad fecal aparente de los piensos de los experimentos D, P y O (Anexo 5: Tablas 6, 7 y 8, respectivamente).

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en los experimentos fueron procesados con la ayuda del programa SAS System® Software, version 9.1.3 (2003), SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.

La hipótesis estadística planteada se sometió a un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación múltiple.

El modelo estadístico seguido en el análisis de los datos se expresa como:

$$y_{ijk} = \mu + t_i + a_j + (ta)_{ij} + e_{ijk}$$

Donde: y_{ij} : Variable dependiente
 μ : Media
 t_i : Efecto del nivel de alteración o contaminación de la materia grasa $i=2$
 a_j : Efecto de la edad de las aves $j=1, 2, 3$ ó 4 (9,13, 21 ó 37 días de vida)
 $(ta)_{ij}$: Interacción entre tratamientos x edad
 e_{ijk} : Error experimental

$\alpha \leq 0,05$ fue utilizado para considerar las diferencias significativas.

En el caso de los parámetros productivos, la unidad experimental fue el corral mientras que para el resto de las determinaciones, la unidad experimental fue el individuo.

Los factores de variación analizados fueron:

- Nivel de alteración o contaminación de la materia grasa: H y L
- Edad de las aves: Parámetros sanguíneos a 9, 13, 21 y 37 días de vida
 - Determinaciones en excreta (Eimerias) a 18 y 37 días de vida
 - Determinaciones en contenido cecal a 9, 21 y 37 días de vida
 - Histomorfología a 9 y 21 días de vida

El procedimiento utilizado fue el PROC GLM y la comparación de medias se hizo con el test Tukey-Kramer.

Adicionalmente, se realizó el análisis global de los datos obtenidos en los 4 experimentos entre sí, con la finalidad de evaluar posibles diferencias entre experimentos o las interacciones que pudieran estar presentes (edad x experimento; nivel de alteración o contaminación x experimento).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Los resultados obtenidos en los experimentos desarrollados para la presente memoria de tesis, así como su discusión, son presentados en cuatro apartados. En cada uno de ellos se analizó la respuesta de las aves a la incorporación en el pienso de materias grasas alteradas o contaminadas. El propio diseño experimental también permitió estudiar el efecto de la edad de los animales sobre los distintos parámetros analizados. En el experimento T se estudió el efecto de la incorporación de ácidos grasos *trans*; en el experimento D la presencia de dioxinas y PCBs; en el experimento P, la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y en el experimento O la inclusión de grasas oxidadas.

Las condiciones de crianza y manejo de los animales fueron similares, a las condiciones de crianza comercial requeridas para las estirpes de aves utilizadas. Los experimentos T y D se llevaron a cabo a finales de invierno y los experimentos P y O fueron desarrollados a finales de primavera y principios del verano de 2006.

5.1. PRIMERA PRUEBA EXPERIMENTAL: “Evaluación de la presencia de ácidos grasos *trans* (T)”

El presente experimento tuvo como objeto de estudio la presencia de isómeros *trans* en materias grasas recicladas a dos niveles diferentes de concentración: nivel alto, tratamiento HT dado por la inclusión de aceite destilado de palma, con un 12,4 % de ácidos grasos *trans* (AGT) totales; y un nivel bajo, tratamiento LT dado por la inclusión de aceite hidrogenado de palma, con un 0,65 % de AGT totales. La caracterización de las grasas, realizada por el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Barcelona, en el marco del proyecto europeo “Feeding Fats Safety” (FFS), del cual forma parte el presente trabajo, reveló un perfil de ácidos grasos de estas materias grasas predominantemente saturado con valores próximos a 85 % y 54 % de ácidos grasos saturados (AGS) en los tratamientos HT y LT, respectivamente (Tabla 5.1.). A su vez, estas materias grasas presentaron un relativamente alto grado de acidez (alrededor de 180 mg KOH/g de aceite), en comparación a las materias grasas de las otras pruebas experimentales incluidas en la presente memoria de tesis.

Tabla 5.1. Perfil de ácidos grasos de las materias grasas de la primera prueba experimental (T)

Trat	AGS	AGMI	AGPI	Insat	Sat/insat
HT (%)	84,8	15,2	0,0	15,2	5,57
LT (%)	54,1	36,9	9,0	45,9	1,18

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

En los últimos años se ha publicado bastante información en relación al potencial patógeno de los AGT, ya que están implicados en la generación de enfermedades principalmente

cardiovasculares, tanto en seres humanos (Allison *et al.*, 1995; Binkoski *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2002; Karabulut, 2007; Koletzko y Decsi, 1997; Lefevre *et al.*, 2005; Léger *et al.*, 2007; Mann, 1994; Manteca, 1992; Moreno y Mitjavila, 2003; Nestel, 1995; Stender y Dyerberg, 2004; Wahrburg *et al.*, 2002), como en diferentes especies, entre ellas, ratas (Bretillon *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 2001), cerdos (Gatlin *et al.*, 2002), rumiantes (de Blas, 2004) y aves (Castillo *et al.*, 2000; Cherian, 2007; Hermier, 1997; Manteca y Noble, 1993; Yin *et al.*, 2008). A pesar de todo, son aun escasos los trabajos en los que se haya sido estudiado con profundidad, el efecto de isómeros *trans* en la dieta sobre el rendimiento productivo, la histología del tracto gastrointestinal (TGI) o la microbiota como indicadores de salud intestinal.

5.1.1. RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS E INCIDENCIAS OBSERVADAS DURANTE EL PERÍODO EXPERIMENTAL

No se observaron incidencias patológicas ni mortalidad en las aves durante el período experimental. Asimismo, no se observaron lesiones patológicas al momento de realizar el examen *post-mortem*. Estos resultados parecen indicar que el consumo de AGT hasta el nivel máximo de 12,4 % AGT total de la materia grasa, empleado en esta prueba experimental, no provocó una respuesta negativa de los animales. De igual manera, Javadi *et al.* (2008), no reportó manifestaciones clínicas, aunque en este caso los pollos fueron alimentados durante 15 días con una dieta cuya grasa añadida contenía solamente un 3 % de AGT. Tampoco se observó una respuesta negativa en la salud de cerdos alimentados con dietas que contenían hasta 50 % de AGT (17 % de grasa en el pienso) durante 10 meses (Elson *et al.*, 1981) ni en ratones alimentados durante 20 meses, con dietas que contenían 25 % de AGT (Atal *et al.*, 1994). Sin embargo estos resultados no concuerdan en cuanto a efectos sobre el crecimiento, ya que la productividad de los pollos y cerdos no fue afectada, en tanto que los ratones, presentaron un menor peso corporal al final de dicho periodo experimental, en comparación a sus homólogos que no recibieron la dieta "*trans*". Por otro lado, se ha descrito que la interferencia negativa de AGT sobre la formación de derivados de cadena larga a partir de los ácidos grasos esenciales (AGE) puede provocar serios problemas de salud. (Allison *et al.*, 1995; Barrera-Arellano y Block, 1993; Hernandez y Boatella, 1986; Koletzko y Decsi, 1997; Mann, 1994; Manteca y Noble, 1993). Este posible efecto puede prevenirse por el contenido de ácidos grasos insaturados de la dieta, en particular el ácido linoleico. Según Elson *et al.* (1981), la presencia del 3 % (como mínimo) de ácido linoleico, previene la manifestación de problemas de deficiencia de AGE, por constituir un precursor en la cadena de formación de sus derivados. Este nivel de ácido linoleico es superior al 1 % de inclusión recomendado por el NRC (1994), en condiciones de explotación comercial, o al nivel observado en nuestro pienso experimental HT, próximo al 1 % de AGI (15 % de insaturados en la grasa añadida, Tabla 5.1.) a pesar del cual no se observaron manifestaciones clínicas, como se había mencionado líneas arriba.

Con relación al rendimiento productivo, la Tabla 5.2., presenta los parámetros de consumo medio diario (CMD, expresado en gramos/ave y día), ganancia media diaria (GMD, expresado en gramos/ave y día) e índice de transformación (IT, pienso consumido en gramos/ganancia de peso en gramos), obtenidos en los controles productivos parciales a diferentes edades así como en el análisis global del periodo experimental. Los animales alimentados con el tratamiento LT (pienso con bajo nivel de AGT) mostraron una mayor eficacia alimentaria, estadísticamente significativa, que los animales alimentados con el tratamiento HT tanto en el período parcial hasta los 21 días como en el global ($P < 0,01$ en ambos casos). Este resultado se tradujo en un mayor aunque no estadísticamente significativo peso final de 1823 ± 18 g obtenido por los animales del tratamiento LT, en comparación a los 1778 ± 51 g de los animales del tratamiento HT. Se deduce que los animales que consumen altos niveles de AGT no varían la cantidad de pienso ingerida, pero obtienen menores ganancias de peso que al consumir sus isómeros *cis*.

Tabla 5.2. Resultados productivos de la prueba experimental T

Tratamientos	HT	LT	SEM	P
6-9 días				
CMD (g/ave)	17,40	17,39	0,75	0,981
GMD (g/ave)	18,96	18,97	0,52	0,989
IT	0,918	0,916	0,030	0,942
10-13 días				
CMD (g/ave)	35,18	34,43	0,93	0,296
GMD (g/ave)	26,72	27,92	0,84	0,090
IT	1,318	1,233	0,043	0,035
14-21 días				
CMD (g/ave)	69,77	69,53	0,89	0,722
GMD (g/ave)	42,08	43,70	0,87	0,041
IT	1,658	1,592	0,021	0,006
22-37 días				
CMD (g/ave)	117,82	116,55	4,04	0,672
GMD (g/ave)	61,56	62,97	1,88	0,332
IT	1,913	1,851	0,034	0,022
Parcial 6-21 días				
CMD (g/ave)	48,03	47,72	0,68	0,544
GMD (g/ave)	32,46	33,57	0,61	0,043
IT	1,479	1,422	0,011	<0,001
Global (6-37 días)				
CMD (g/ave)	85,91	85,08	2,41	0,638
GMD (g/ave)	48,26	49,53	1,09	0,153
IT	1,780	1,717	0,022	0,003

CMD: Consumo medio diario; GMD: Ganancia media diaria; IT: Índice de transformación; SEM: Error estándar de la media; HT: Nivel alto de AGT; LT: Nivel bajo de AGT.

Debido a la disposición espacial de las moléculas de isómeros *trans*, estos ácidos grasos pueden adquirir propiedades físico-químicas similares a los AGS (Barrera-Arellano y Block, 1993;

Koletzko y Decsi, 1997; Nelson y Cox, 2001; Simon *et al.*, 2000), y comportarse como tales. Podemos inferir por ello que una elevada concentración de AGT como la observada en el tratamiento HT, tuvo como resultado una menor eficiencia productiva. Además, el análisis de la grasa del pienso, reveló una mayor concentración de AGS en el tratamiento HT en comparación al tratamiento LT (84,8 % vs. 54,1 %, respectivamente), por lo que con toda probabilidad, ambos efectos han sido influidos en el mismo sentido.

5.1.2. TASA DE HEMOLISIS Y VALORES TBAR_s EN MUESTRAS DE SANGRE

El proceso de hidrogenación, del cual proceden las grasas utilizadas en este experimento, altera la estructura de los ácidos grasos de la materia grasa original. Una vez ingeridas, pueden afectar a la composición de los ácidos grasos del organismo. Entre otros efectos, pueden verse alterados los lípidos de la membrana de los eritrocitos, reduciendo la elasticidad necesaria para afrontar cambios en los gradientes de concentración extracelular (Moriguchi *et al.*, 2001), provocando una mayor susceptibilidad a la hemólisis. Además, los AG *trans* pueden sufrir un proceso de oxidación lipídica y, como los *cis*, dar lugar a la aparición de compuestos de oxidación secundaria como aldehídos y cetonas reactivos al ácido tiobarbitúrico (Beuge y Aust, 1987). En las Figuras 5.1 y 5.2 se presentan los resultados de la tasa de hemólisis y la proporción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARs en sangre, respectivamente. Ambas determinaciones se realizaron en muestras de sangre de 80 pollos utilizados en este experimento, colectadas a 9, 13, 21 y 37 días de vida.

No se observó la existencia de interacción entre los dos factores analizados (tratamiento y edad de las aves). Los pollos alimentados con la dieta HT, en comparación con el tratamiento LT, presentaron una mayor tasa de hemólisis con diferencias estadísticamente significativas los días 13 y 37 de vida de las aves ($P = 0,035$ y $P = 0,004$, respectivamente). En otras palabras, las aves que consumían el pienso con el mayor nivel de AGT presentaban una menor resistencia de la membrana de los eritrocitos. A pesar de que el efecto de la incorporación en la dieta de AGT sobre la membrana de los eritrocitos en la sangre de pollos no está suficientemente documentado, sí se ha demostrado que las formas *trans* pueden influir negativamente sobre los lípidos de la membrana en los seres humanos. En concreto, los AGT alteran la estructura de los fosfolípidos (Chini *et al.*, 2005; Ferreri *et al.*, 2005) y originan una respuesta similar a la observada por la acción de AGS que disminuyen la resistencia de la membrana al restarle flexibilidad ante cambios extracelulares o influyendo negativamente sobre el intercambio osmótico (Brito *et al.*, 2002; Ferreri *et al.*, 2005). Con relación a los valores TBARs, no se observaron diferencias provocadas por el nivel de AGT de la ración, a excepción del muestreo

realizado a 21 días de vidas, en el que la tendencia ($P < 0,10$) observada se tradujo en una mayor concentración de TBARs en los animales que consumieron la dieta LT, frente a sus homólogos HT. Como se ha mencionado previamente, el comportamiento de las formas *trans*, similar a los AGS, puede haber influido en generar una menor susceptibilidad a la oxidación (dieta HT), que la dieta mas insaturada (LT).

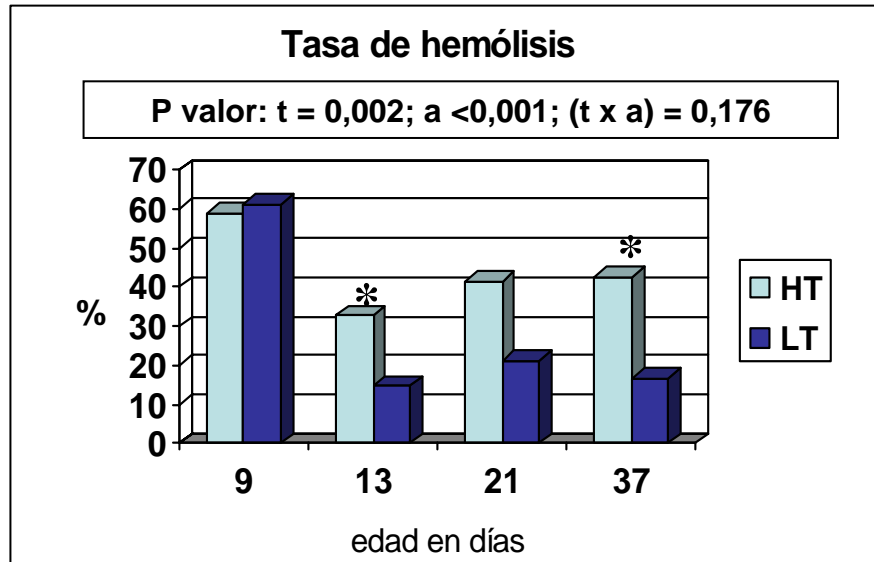


Figura 5.1. Tasa de hemólisis. t: Tratamientos; a: Edad de los animales. HT: Nivel alto de AGT; LT: Nivel bajo; Error estándar de la media (SEM) del modelo: 17,51; *: $P < 0,05$ (Diferencias observadas entre tratamientos experimentales)

Al evaluar el efecto sobre la edad de las aves, los animales más jóvenes (9 días de vida) manifestaron una elevada tasa de hemólisis, próxima al 60 %, que descendió significativamente ($P < 0,001$) a los 13 días de vida (alrededor de 30 %), para aumentar en registros posteriores (21 y 37 días de vida). En cambio, los valores TBARs fueron relativamente constantes, situándose entre 0,187 y 0,234 nmol TBARs/ml, aunque sí se evidenció una menor concentración a los 9 días de vida y una ligera mayor concentración a los 13 días de vida ($P = 0,002$) en comparación a las otras edades.

Estas variaciones demuestran una relativa mayor resistencia de la membrana de los eritrocitos de los animales con mayor edad. Con respecto a la concentración de TBARs, los resultados no son concluyentes.

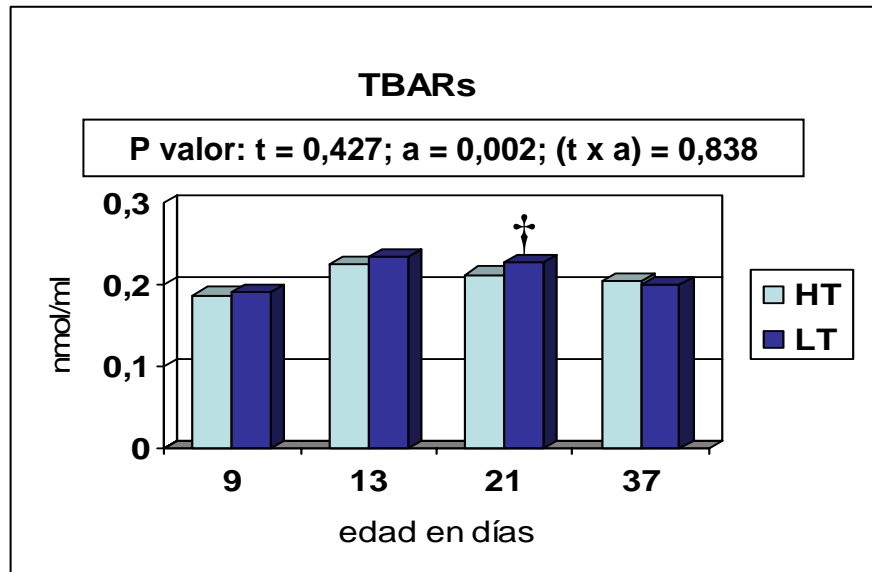


Figura 5.2. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) t: Tratamientos; a: Edad de los animales. HT: Nivel alto de AGT; LT: Nivel bajo; SEM del modelo: 0,03; †: $P < 0,10$ (Tendencia estadística observada entre tratamientos experimentales)

5.1.3. MICROBIOTA GASTROINTESTINAL (contenido cecal)

A. Diversidad Microbiana: t-RFLP.- La comparación de los distintos perfiles microbianos de las muestras de contenido cecal obtenidos en la restricción enzimática se presenta en el siguiente dendograma (Figura 5.3.). Dicho dendograma representa los resultados de 48 aves que recibieron las dietas experimentales con un nivel alto o bajo de AG *trans* y que fueron sacrificadas a 9, 21 y 37 días de vida. Las distancias de separación en el dendograma corresponden al porcentaje de similitud o de homología entre las bandas patrón generadas por los diferentes grupos microbianos.

De manera general, todas las muestras analizadas alcanzaron un porcentaje de similitud del 60%, lo cual denota que la composición de la flora microbiana de los animales estudiados fue muy parecida entre sí. La composición ecológica fue afectada por la edad de los animales, de esta manera, los animales sacrificados el día 9, mostraron elevados coeficientes de similitud entre ellos (70 %), por lo que fueron separados en un *cluster* diferente (agrupación de individuos con un alto grado de similitud en los grupos microbianos presentes). Efectos similares fueron descritos en trabajos anteriores (Knarreborg *et al.*, 2002) y se atribuyen al establecimiento paulatino y transitorio de la flora microbiana durante el crecimiento, hasta alcanzar una relativa estabilidad en el animal adulto. Diversos trabajos coinciden en indicar que la edad influye sobre la variación de la dinámica poblacional de los microorganismos gastrointestinales (Hume *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2003; Ngoc Lan *et al.*, 2004; Pérez de Rozas A.M. *et al.*, 2003;

Torok *et al.*, 2007; van der Wielen *et al.*, 2002), de forma que los microorganismos tienden a agruparse en *clusters* o segmentos diferenciados a medida que aumenta la edad, constituyendo una microbiota más homogénea y estable.

No se observó un claro efecto de la mayor o menor presencia de formas *trans* en este primer muestreo. Sin embargo, en el muestreo realizado a los 37 días de vida de las aves, los animales se separaron en dos *clusters* diferentes, tal como puede apreciarse en la figura 5.3. Así, 5 de 7 aves en un *cluster* (indicado por flechas, *cluster* B) procedían del tratamiento LT y 5 de 8 animales que fueron agrupados en otro *cluster* (indicado por flechas, *cluster* C) procedían del tratamiento HT. Por tanto, además del efecto de la edad, en este último muestreo, la composición de la microbiota también se vio afectada por los tratamientos. A este respecto se ha sugerido que la presencia de ácidos grasos con diferente grado de saturación puede influir sobre la composición de la flora microbiana. Niveles de inclusión del orden del 10 % de grasas insaturadas, frente a grasas saturadas, pueden modificar la viscosidad de la digesta (menor viscosidad), aumentando la velocidad de tránsito (menores tiempos medios de retención) y minimizando la acción de los diferentes microorganismos presentes en el TGI, al disminuir el tiempo de contacto con los sustratos disponibles en el contenido intestinal (Danicke *et al.*, 1999; Dibner, 1997; Francesch i Ollé, 2007; Knarreborg *et al.*, 2002; Palmquist, 1988).

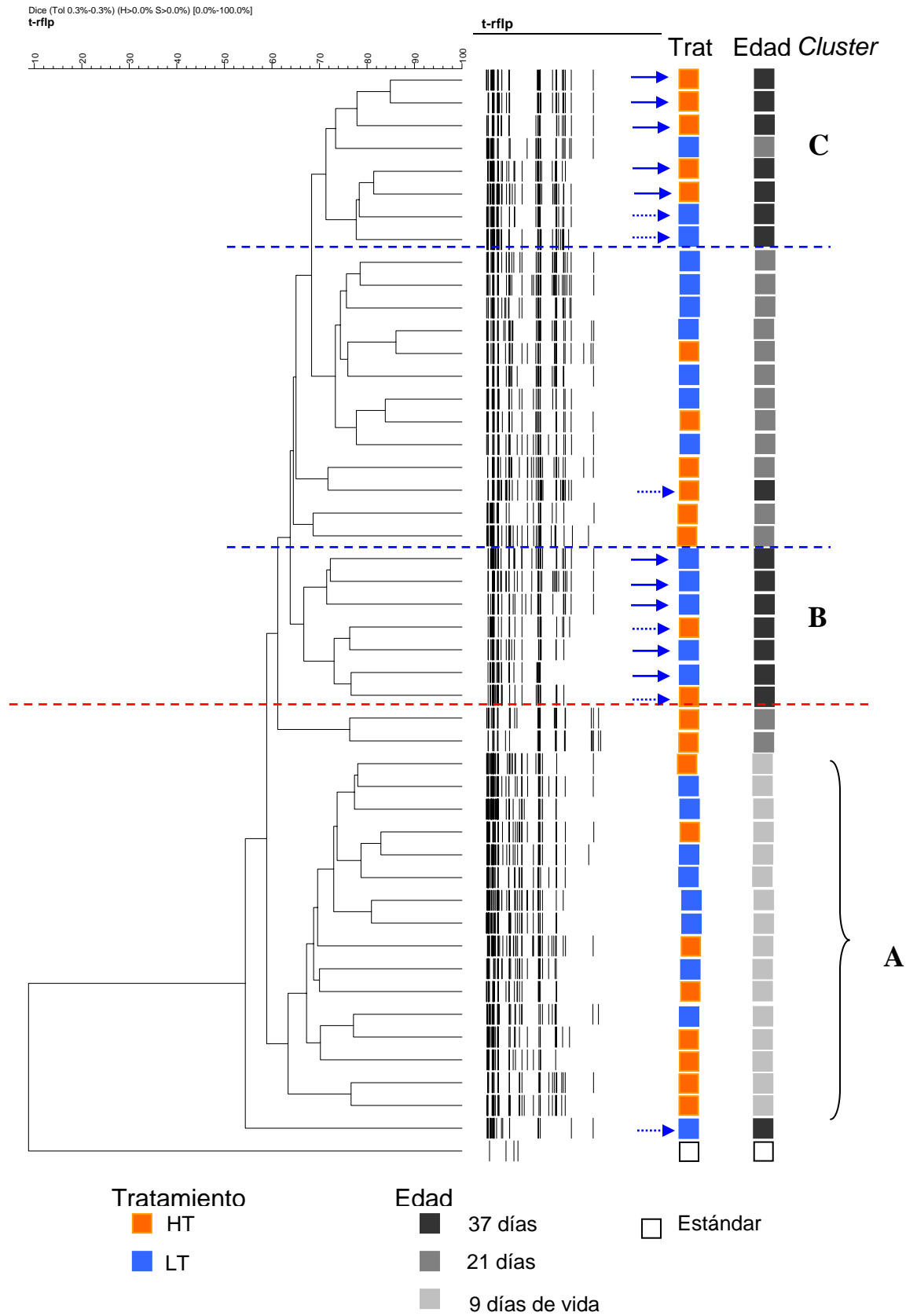


Figura 5.3. Dendrograma que presenta la similitud entre bandas patrón obtenidas por t-RFLP

Considerando la proporción de fragmentos terminales detectados en las muestras analizadas (riqueza de picos, Figura 5.4.), como un índice de la diversidad o complejidad del ecosistema microbiano, no se encontraron diferencias atribuibles a las dietas experimentales o la edad de las aves. Una elevada biodiversidad es deseable e indicativa de una óptima resistencia a la colonización del tracto digestivo por patógenos oportunistas, por lo que puede ser utilizado también como marcador de salud intestinal (MacFarlane y McBain, 1999).

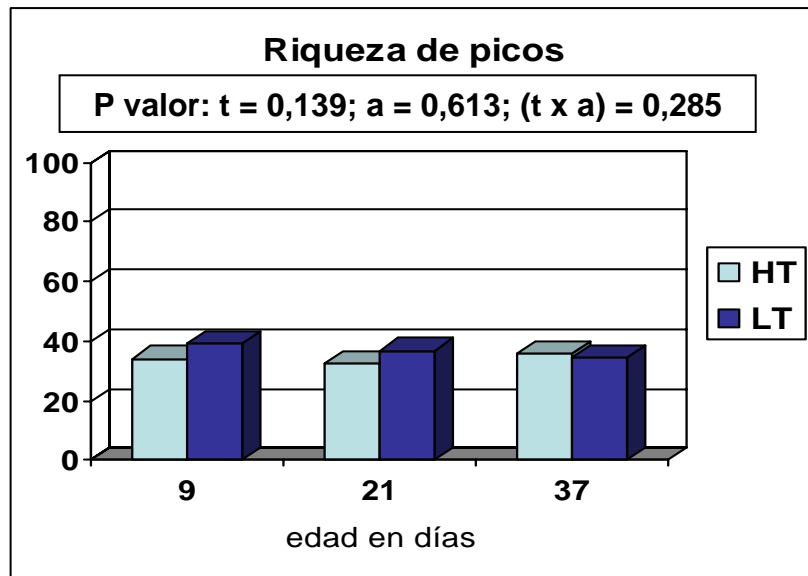


Figura 5.4. Riqueza de picos (número de picos). t: Tratamientos; a: Edad de los animales. HT: Nivel alto AGT; LT: Nivel bajo; SEM del modelo: 6,31

A pesar de que el análisis del dendograma presenta diferencias en la composición de la microbiota como efecto de la edad de los animales, estas diferencias no se relacionan con un cambio en la riqueza del ecosistema (la riqueza de picos no fue afectada por la edad). La agrupación de individuos en clusters, refleja la homología existente entre la flora microbiana observada, es decir, individuos que tienen las mismas bacterias o grupos de bacterias, pero no refleja el cambio en el número de las especies que lo componen, como indica la biodiversidad.

B. Actividad microbiana: Productos de fermentación.- La capacidad fermentativa de los microorganismos del TGI en presencia de diferentes sustratos constituye un buen indicador de actividad microbiana. Así la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) se utiliza como referencia para determinar una mayor o menor presencia de microorganismos saprofitos (flora autóctona que actúa en simbiosis con el hospedador) presentes en el animal y de su capacidad

de colonización frente a microorganismo patógenos. Las muestras de contenido cecal de las 48 aves sacrificadas a 9, 21 y 37 días de vida, se procesaron con este objetivo.

La Figura 5.5., presenta la producción total de AGVs y la producción de ácido láctico. No se observaron diferencias significativas provocadas por los tratamientos o la edad de los animales en la concentración total de AGVs. Las mayores concentraciones observadas en el presente experimento se situaron alrededor de 90 $\mu\text{mol/g}$ de muestra, menores a las encontradas por Józefiak *et al.* (2004) que alcanzaron concentraciones totales de entre 107 y 185 $\mu\text{mol/g}$. No obstante, la dieta empleada por este autor contenía un alto nivel de polisacáridos no amiláceos (PNA), alcanzando una concentración total en la dieta de 25 % de fibra dietética (FD). Si bien no se ha analizado el contenido en fibra dietética de nuestros piensos, el hecho de que la dieta estuviera constituida básicamente por maíz y soja, hace suponer que los niveles de FD serían presumiblemente mucho más bajos.

Las muestras procedentes de los animales sacrificados el día 9 presentaron una elevada producción de ácido láctico, en comparación a las muestras colectadas los otros días de sacrificio (21 y 37 días de vida). Conforme la edad avanza, distintos microorganismos colonizan el tracto digestivo. Las bacterias ácido lácticas iniciarán su actividad entre los 2 y 4 días de vida de las aves (van der Wielen *et al.*, 2000). En los subsecuentes días, otros grupos bacterianos se establecen y la influencia de bacterias productoras de ácido láctico, en concreto bacterias del género *Lactobacillus*, disminuye y se compensa con la influencia generada por los otros grupos bacterianos, principalmente en el ciego (Bjerrum *et al.*, 2006; Ewing y Cole, 1994; Hofacre *et al.*, 2007; Morales, 2007). Este hecho permite explicar una elevada concentración de lactato en los animales más jóvenes; dicha concentración puede disminuir con el tiempo, por efecto de la síntesis de otros AGVs (acético y propiónico) a partir del lactato, de lo que son responsables otros microorganismos (entre ellos *Veionella*, *Clostridium* o *Propionobacterium*), característicos del ciego aviar (Bernalier *et al.*, 1999; Hume *et al.*, 1992).

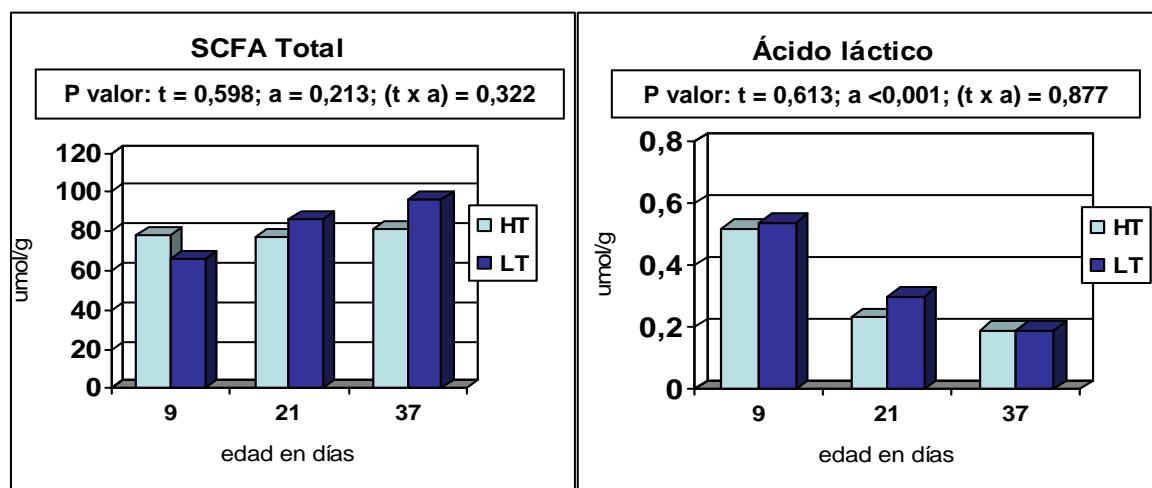


Figura 5.5. Ácidos grasos de cadena corta (SCFA) totales y concentración de ácido láctico. t: Tratamientos; a: Edad. HT: Nivel alto; LT: Nivel bajo; SEM del modelo SCFA total: 25,79; SEM del modelo Ácido láctico: 0,19

La producción de los ácidos, acético, valérico y ramificados fue influenciada significativamente por la edad de los animales. No obstante, el consumo de dietas con un elevado contenido de AGT no provocó diferencias de importancia (Tabla 5.3). La proporción de acetato disminuyó con la edad significativamente a pesar de que los otros ácidos grasos volátiles mayoritarios (propiónico y butírico) no manifestaron cambios de importancia. Al parecer, la edad influyó solamente sobre la proporción de sustrato energético de rápida disponibilidad como es el acetato (Demigne *et al.*, 1999). A diferencia de los rumiantes, el aporte energético de los AGVs para satisfacer las necesidades nutricionales de los animales monogástricos no se considera de importancia. No obstante, la disminución de acetato pudo haber sido compensada por otras fuentes energéticas a medida en que el animal crecía, ya que el crecimiento se acompaña del desarrollo de las habilidades fisiológicas del TGI y de su capacidad de digestión y absorción de nutrientes.

Tabla 5.3. Perfil de Ácidos grasos de cadena corta (%)

Edad (días)	9		21		37		SEM	Pt	Pa	P(t x a)
	HT	LT	HT	LT	HT	LT				
Acético %	76,8	75,4	70,9	73,9	68,9	71,0	4,91	0,127	0,002	0,339
Propiónico %	10,9	9,1	12,3	10,1	13,6	12,2	3,81	0,138	0,165	0,957
Butírico %	11,5	13,8	14,3	14,5	13,1	13,3	4,16	0,169	0,649	0,248
Valérico %	0,8	1,0	1,7	1,6	2,0	1,7	0,52	0,670	0,001	0,199
Ramificados %	0,9	1,0	0,9	0,7	2,4	1,9	0,64	0,396	<0,001	0,216

SEM: Error estándar de la media; Pt: p valor para los tratamientos; Pa: p valor para la edad; P(txa): p valor de la interacción. HT: Nivel alto AGT; LT: Nivel bajo

Por otro lado y a diferencia de nuestros resultados, Rehman *et al.* (2007) encontraron una baja proporción de propionato en relación al butirato, que se mantuvo con la edad, al alimentar pollos con dietas ricas en carbohidratos fermentables. Estos datos respaldan la suposición de que el tipo de sustrato puede modificar las concentraciones de los AGVs, aunque no hay una clara evidencia de la influencia de los AG, y en concreto los isómeros *trans*, sobre la concentración de los AGVs mayoritarios.

C. Microorganismos patógenos: Presencia de coccidias en excreta.- El efecto de la incorporación de materias grasas con un elevado contenido de formas *trans*, sobre la proliferación de microorganismos patógenos, en este caso de parásitos del género *Eimeria* se determinó a partir de muestras de excreta de las aves, colectadas a 18 y 37 días de vida.

La figura 5.6., presenta los resultados del conteo de ooquistes por gramo (OPG) de dichos agentes patógenos. El conteo de coccidias de *Eimeria* no superó los niveles considerados como normales en condiciones de crianza comercial de pollos (valores inferiores a 8 log OPG de excreta) y que una vez superados suponen un riesgo potencial para la salud del animal. A lo largo del periodo experimental, el tratamiento HT generó menores conteos de OPGs ($P=0,032$). Estos resultados contrastan con los descritos por otros autores (Allen *et al.*, 1997; Allen y Danforth, 1998; Korver *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2006), en lo relativo al efecto del consumo de materias grasas sobre la presencia de coccidias de *Eimeridae*. Estos autores observaron que la adición de ácidos grasos, principalmente poliinsaturados, se traduce en una disminución del número de ooquistes. Las grasas de la dieta HT, predominantemente saturadas y con un elevado contenido de AGT provocaron una disminución difícil de interpretar y que merece un estudio más detallado.

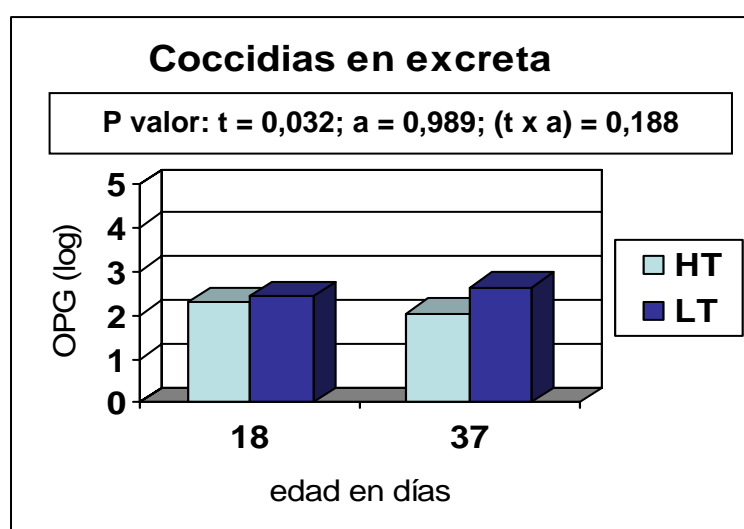


Figura 5.6. Coccidias en excreta. OPG: Ooquistes por gramo de excreta (logaritmo); HT: Nivel alto de AGT; LT: Nivel bajo; SEM del modelo: 0,24

5.1.4. HISTOMORFOLOGIA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL (secciones de yeyuno)

El siguiente apartado presenta los resultados obtenidos del análisis de muestras de tejido intestinal, en concreto, de la porción yeyuno e ileon, de los pollos del experimento 1. Las muestras fueron colectadas en los sacrificios realizados a 9 y 21 días de vida de las aves.

La observación de los cortes histológicos permitió la medición de la longitud de las vellosidades (LV) y la profundidad de criptas intestinales (PC), cuyos resultados se presentan en la Figura 5.7. A lo largo del período experimental, el tratamiento con el nivel bajo de ácidos grasos *trans* (LT) presentó la tendencia a inducir una mayor longitud de vellosidades ($P < 0,10$), frente al tratamiento HT. Así mismo, se observó una mayor, aunque no significativa, profundidad de criptas intestinales con el mismo tratamiento. Esto podría traducirse como un efecto beneficioso del tratamiento LT, ya que, a mayor longitud de las vellosidades, mayor superficie de absorción. El hecho de que la profundidad de las criptas intestinales observada en las aves alimentadas con el pienso LT sea numéricamente mayor, indicaría además un incremento de la capacidad regenerativa del epitelio. Al respecto, algunos autores (Uni *et al.*, 1998; Uni *et al.*, 2003) han relacionado el incremento de la actividad en la cripta intestinal con el aumento del número de enterocitos que migrarán hacia la vellosidad, generando el incremento en su longitud.

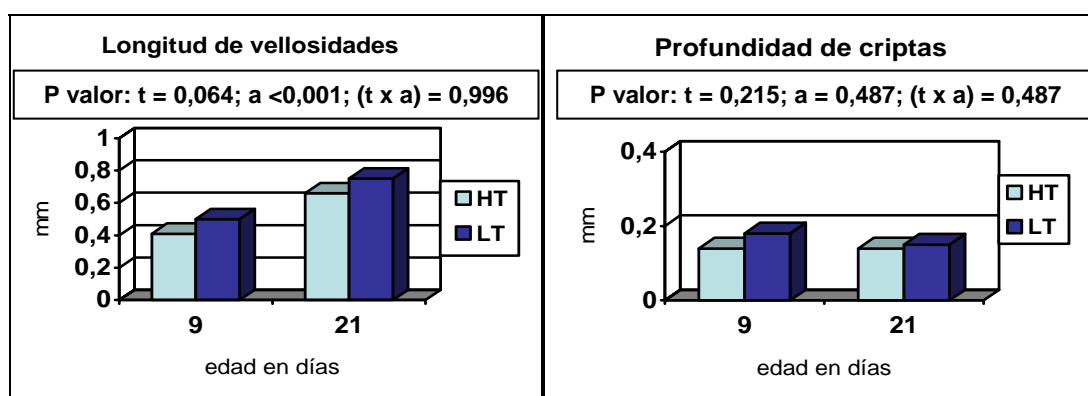


Figura 5.7. Longitud de vellosidades y profundidad de criptas. t: tratamientos; a: edad. HT: nivel alto; LT: nivel bajo; SEM del modelo longitud: 0,12; SEM del modelo profundidad: 0,05

La edad manifestó una influencia significativa ($P < 0,001$) sobre la longitud de las vellosidades, las cuales aumentaron conforme la edad avanzaba, no así la profundidad de las criptas, que disminuyó levemente en el mismo período. El desarrollo del TGI, en aves alimentadas en condiciones semejantes a explotaciones comerciales, en experimentos realizados por otros autores, sigue este comportamiento, es decir el aumento paulatino de la longitud de las vellosidades, acompañado de la disminución de criptas (Geyra *et al.*, 2001; Pelicano *et al.*, 2005;

Sklan y Noy, 2003). Los resultados observados en el presente experimento parecen estar más relacionados con el perfil de ácidos grasos de las materias grasas utilizadas (mayor contenido de AGS), que con el nivel de alteración (isómeros *trans*) presente en las mismas.

El recuento de linfocitos intraepiteliales (IEL) constituye un indicador de la activación de mecanismos de defensa ante la presencia de un estímulo externo, en cuyo caso puede observarse un aumento en el número de linfocitos que migran hacia el epitelio. La presencia de IEL fue similar entre ambos tratamientos tanto a los 9 como a los 21 días de vida estudiados. No obstante, el número de linfocitos en las vellosidades disminuyó con la edad de manera significativa ($P < 0,001$), tal como puede apreciarse en la Tabla 5.4.

Estos resultados concuerdan con los descritos por Han *et al.* (2002), quienes emplearon dietas que contenían materias grasas hidrogenadas (margarina vegetal) con un nivel de 6,7 % AGT, en comparación a dietas que contenían materias grasas saturadas (mantequilla) con 1,3% AGT. Este autor no observó diferencias en el número de linfocitos, aunque el efecto se midió en muestras de sangre de seres humanos.

Con relación al efecto de la edad, Parmentier *et al.* (2002) observó el incremento de los títulos de anticuerpos en pollos a los 7 días de edad, como respuesta a la alimentación con ácidos grasos de la serie n-6. Los títulos de anticuerpos observados por este autor la primera semana disminuyeron conforme la edad aumentaba. A pesar de que el experimento determinó los niveles de inmunoglobulinas, la respuesta podría inducir también a un comportamiento similar en los linfocitos ya que ambos elementos de defensa se activan como respuesta a la presencia de antígenos en el organismo vivo.

Tabla 5.4. Número de linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos

Edad (días)	9		21		Pt	Pa	P(t x a)
	HT	LT	HT	LT			
IEL	26,74	26,10	16,87	15,99	0,653	<0,001	0,943

Pt: p valor tratamientos; Pa: p valor edad; P(txa): p valor de la interacción HT: Nivel alto; LT: Nivel bajo; IEL: Linfocitos intraepiteliales; SEM del modelo: 4,51

5.2. SEGUNDA PRUEBA EXPERIMENTAL: “Evaluación de la presencia de Policloro-dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), Policloro-dibenzo-furanos (PCDFs) y Policloro-bifenilos (PCBs) (D)”

En este experimento se utilizaron materias grasas contaminadas con Dioxinas y PCBs a un nivel alto HD= 28,80 pg TEQ PCDD/Fs+DL-PCBs/g de aceite (1,75 pg TEQ PCDD/Fs+DL-PCBs/g de pienso) y bajo LD= 9,64 pg TEQ PCDD/Fs+DL-PCBs/g de aceite (0,59 pg TEQ PCDD/Fs+DL-PCBs/g de pienso).

Las materias grasas empleadas en la elaboración de los piensos experimentales fueron dos aceites comerciales de pescado. El análisis de calidad de dichos aceites reveló una elevada concentración de productos de oxidación secundaria (TBARs) de 2819 µg MDA/kg en el aceite incluido en el tratamiento LD y de 65 µg MDA/kg para el aceite del tratamiento HD (Análisis realizado en el Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Barcelona).

Tabla 5.5. Perfil de ácidos grasos de las grasas incluidas en el segundo experimento (D)

Trat	AGS	AGMI	AGPI	Insat	Sat/insat
HD (%)	23,2	43,0	31,8	74,8	0,31
LD (%)	30,3	34,2	33,2	67,4	0,45

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

El perfil de ácidos grasos (Tabla 5.5.) de ambas materias grasas fue similar aunque la HD presento un mayor grado de insaturación. Dentro de la caracterización de las materias grasas del proyecto europeo FFS y paralelamente al desarrollo del ensayo, se realizaron dos balances de digestibilidad a los 14 y 37 días de vida en aves alojadas en jaulas, con objeto de determinar los coeficientes de digestibilidad aparente de la materia seca, materia orgánica y del extracto etéreo (Mateus, 2007). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el coeficiente de digestibilidad aparente de las grasas a primeras edades (83,6% HD vs. 79,8% LD, $P < 0,001$) que no se manifestaron a los 37 días de vida. Es bien sabido que conforme disminuye la insaturación también lo hace la digestibilidad de la materia grasa, y tal como puede observarse en la Tabla 5.5., el tratamiento LD presenta un relativamente menor contenido de AG insaturados. Normalmente, las diferencias motivadas por el grado de saturación en la digestibilidad de las materias grasas disminuyen conforme la edad aumenta.

5.2.1. RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS E INCIDENCIAS OBSERVADAS DURANTE EL PERÍODO EXPERIMENTAL

El período experimental se caracterizó por la ausencia de incidencias y mortalidad de las aves. Así mismo, no se observaron lesiones patológicas al momento de realizar el examen post-mortem. Aparentemente, los niveles de contaminación alto y bajo de las materias grasas incluidas en las raciones alimenticias no provocaron una respuesta negativa de los animales. El hecho de que el nivel alto de dioxinas y PCBs fuera próximo al límite superior permitido por la normativa regulatoria de la UE, de 24 pg TEQ/g PCDD/Fs+DL-PCBs de aceite (Directiva 2006/13/CE, 2006) podría explicar este resultado. No obstante, el potencial tóxico de estos contaminantes orgánicos ha sido demostrado por numerosos trabajos en aves y diferentes especies, incluido el hombre (Bell *et al.*, 2006; Bernard *et al.*, 1999; Bernard *et al.*, 2002; Bruggeman *et al.*, 2007; Custer, 2000; De Vries *et al.*, 2006; Gorrachategui, 2001; Guruge y Tanabe, 2004; Halouzka *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2004; Lindstrom *et al.*, 2002; Moser y McLachlan, 1999; Pirard y De Pauw, 2005; Schecter *et al.*, 2006; Tard *et al.*, 2007). Estos estudios establecen la posibilidad de que estas sustancias tóxicas tengan un efecto acumulativo en el tiempo, fenómeno conocido como bioacumulación (Díaz, 2007), principalmente en tejido adiposo (Maervoet *et al.*, 2004) e hígado (Hansen *et al.*, 1983), motivo por el cual sería interesante evaluar su efecto por un periodo de tiempo más largo que el observado en este experimento.

La Tabla 5.6., presenta el consumo medio diario (CMD, expresado en gramos/ave), ganancia media diaria (GMD, expresado en g/ave) e índice de transformación (IT, pienso consumido/ganancia de peso) obtenidos en los controles productivos a diferentes edades, el control parcial a los 21 días de vida de las aves y el control productivo global del periodo experimental. Únicamente de los 9 a los 13 primeros días de vida, los pollos del tratamiento HD presentaron mejor IT (IT=1,289) en comparación a las aves del tratamiento LD (IT=1,333). Con tal salvedad, no se registraron variaciones importantes entre los tratamientos en los parámetros productivos estudiados. De hecho los pesos a la finalización del período experimental (37 días) de 1872±31 g del tratamiento HD y de 1904±82 g del tratamiento LD no fueron diferentes (P>0,05) y manifiestan una recuperación de las aves del tratamiento LD.

Un mejor IT a 13 días de vida podría estar relacionado a una mejor digestibilidad de las grasas del tratamiento HD, tal y como previamente se ha señalado. La ausencia general de diferencias entre los tratamientos coincide con trabajos en los que se evaluaron los rendimientos productivos de pollos de carne con el empleo de dioxinas y PCBs. En concreto, De Vos *et al.* (2003) e Iben *et al.* (2003) a niveles máximos de 12 pg TEQ/g PCDD/Fs+DL-PCBs de pienso y 25,2 pg TEQ/g

PCDD/Fs+DL-PCBs de aceite, respectivamente, no hallaron diferencias en la productividad de los animales. Por el contrario, determinaciones realizadas por otros autores, con elevados niveles de dioxinas y PCBs en las grasas (alrededor de 150 pg de PCDD/Fs por gramo de grasa) del pienso de pollos y gallinas ponedoras, revelaron un efecto contrario con rendimientos productivos muy bajos y elevada mortalidad de los animales (Bernard *et al.*, 2002; Bernard *et al.*, 1999; Pirard y De Pauw, 2005).

Tabla 5.6. Resultados productivos de la prueba experimental D

Tratamientos	HD	LD	SEM	P
6-9 días				
CMD (g/ave)	21,26	21,59	0,48	0,396
GMD (g/ave)	21,09	23,13	1,43	0,090
IT	1,011	0,934	0,054	0,063
10-13 días				
CMD (g/ave)	35,48	36,16	1,26	0,477
GMD (g/ave)	27,54	27,13	0,97	0,577
IT	1,289	1,333	0,021	0,012
14-21 días				
CMD (g/ave)	59,29	59,70	1,53	0,720
GMD (g/ave)	42,80	43,34	1,66	0,658
IT	1,387	1,378	0,043	0,785
22-37 días				
CMD (g/ave)	111,92	112,42	2,51	0,785
GMD (g/ave)	67,07	68,40	2,71	0,513
IT	1,669	1,645	0,033	0,368
Parcial 6-21 días				
CMD (g/ave)	43,83	44,28	1,11	0,586
GMD (g/ave)	30,92	31,34	0,86	0,513
IT	1,418	1,413	0,024	0,819
Global (6-37 días)				
CMD (g/ave)	80,79	81,26	1,80	0,718
GMD (g/ave)	50,55	51,46	1,78	0,494
IT	1,599	1,580	0,032	0,351

CMD: Consumo medio diario; GMD: Ganancia media diaria; IT: Índice de transformación; SEM: Error estándar de la media; HD: Nivel alto de dioxinas y PCBs; LD: Nivel bajo.

5.2.2. TASA DE HEMÓLISIS Y VALORES TBAR_s EN MUESTRAS DE SANGRE

La resistencia de los eritrocitos a la hemólisis (tasa de hemólisis) y la proporción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), para determinar el estrés oxidativo provocado en los animales, se presentan en las figuras 5.8., y 5.9., respectivamente. Se realizaron cuatro colectas de sangre a 9, 13, 21 y 37 días de vida de las aves.

La tasa de hemólisis observada revela que prácticamente no existen diferencias provocadas por los tratamientos (HD vs. LD), salvo en el caso del análisis realizado el día 21, en el que se registró una mayor proporción en los animales alimentados con la dieta LD. En general, la resistencia de la membrana parece aumentar con la edad, motivo por el cual se observa la disminución de los valores a medida que la edad avanza. Por el contrario, los valores de TBARs obtenidos presentaron un incremento en la concentración de productos de oxidación, significativa conforme la edad aumentaba ($P < 0,001$). En el caso de los animales alimentados con la dieta LD, la concentración fue mayor que la relativa a la dieta HD ($P < 0,005$), a 21 días de vida de los animales. Independientemente de la edad, se observó un efecto general de este tratamiento (LD) que generó mayores concentraciones ($P = 0,028$, Figura 5.9) de productos de oxidación secundaria.

No hay evidencia de que la presencia de dioxinas y PCBs en la sangre tenga efecto sobre la resistencia de la membrana de los eritrocitos, aún a pesar de que estos contaminantes puedan estar asociados a los lípidos circulantes e incorporarse a la membrana celular. Los contaminantes son absorbidos casi intactos (dependiendo del tamaño de la molécula), es decir, sin haber sido afectados por la digestión gastrointestinal (Gorrachategui, 2001), pueden encontrarse en la sangre en concentraciones elevadas (Schechter *et al.*, 2006) e inducir estrés oxidativo (Bruggeman *et al.*, 2007) por interferir con los niveles sanguíneos de glutathion peroxidasa. En nuestro caso, no es posible relacionar directamente la presencia de dioxinas y PCBs con los resultados obtenidos. Debido a que el tratamiento LD generó tanto una mayor susceptibilidad a la hemólisis como una mayor concentración de TBARs, es importante considerar que la grasa de este tratamiento (LD), presentaba un alto grado de oxidación (elevada proporción de productos de oxidación secundaria como el malondialdehído: 2819 $\mu\text{gMDA/kg}$ de grasa), en comparación al tratamiento HD (65 $\mu\text{gMDA/kg}$ de grasa).

Al igual que en el experimento T (isómeros *trans*), la resistencia de la membrana de los eritrocitos aumenta significativamente conforme lo hace la edad. Esto se traduce en una disminución de la proporción de hemólisis en las aves de mayor edad. Por el contrario los valores TBARs siguen un comportamiento ascendente, es decir aumentan significativamente su concentración con la edad. Dada la ausencia de un “efecto tratamiento”, es posible sugerir que la resistencia a la hemólisis aumenta con la edad, como respuesta a una mayor resistencia de los animales mayores, adquirida al alcanzar el desarrollo fisiológico de sus funciones de defensa y adaptación, tal y como ya hemos comentado en el primer experimento.

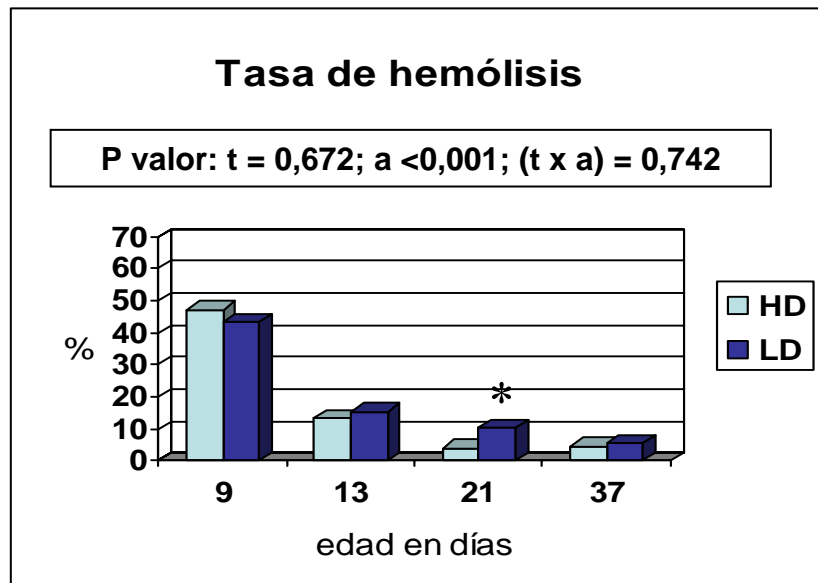


Figura 5.8. Tasa de hemólisis. t: Tratamientos; a: Edad de los animales; HD: Nivel alto de dioxinas y PCBs; LD: Nivel bajo; SEM del modelo: 12,31; *: $P < 0,05$ (Diferencias observadas entre tratamientos experimentales)

Es de especial importancia considerar que, a pesar de no observarse un claro efecto del nivel de contaminación sobre la respuesta de los animales, sí se determinó un elevado grado de transferencia y acumulación de dioxinas y PCBs presentes en el pienso ($\leq 1,75$ TEQ PCDD/Fs+DL-PCBs/g de pienso), sobre la carne de los animales, con valores de hasta 16,71 pg TEQ PCDD/Fs+DL-PCBs/g de tejido muscular (de los cuales 4,6 pg/g corresponden PCDD/Fs), frente a los 4 pg TEQ PCDD/Fs+DL-PCBs/g de tejido muscular, permitidos por la norma europea (Directiva 2006/13/CE, 2006) El análisis de la transferencia fue realizado por el Laboratorio de Dioxinas del Departamento de Ecotecnología IIQAB-CSIC, en el marco del proyecto europeo FFS. Al evaluar la estabilidad de la carne, se determinó una mayor concentración de TBARs (>400 $\mu\text{gMDA/kg}$ de tejido muscular) en la carne de pollos alimentados con la dieta LD que los alimentados con la dieta HD (Análisis realizado por la Unidad de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Barcelona), corroborando el efecto de la calidad de las grasas (grado de oxidación de las grasas) empleadas en las dietas experimentales, más que el efecto del nivel de contaminación. Hay pocas referencias acerca del efecto de estos contaminantes sobre la generación de productos de oxidación secundaria en el animal. Hilscherova *et al.* (2003) determinaron elevadas concentraciones de productos de oxidación en hígado de pollos recién eclosionados (196 nmol vs 157 nmol MDA/g, $P < 0,05$), provocadas por la inyección *in ovo* de 150 pg TCDDs (tetracloro dibenzo p-dioxinas)/g de huevos. El mecanismo propuesto es la interferencia negativa que podrían ejercer estos contaminantes sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa, lo que tendría como consecuencia la formación de elevadas concentraciones de productos de oxidación secundaria como el malondialdehído (MDA).

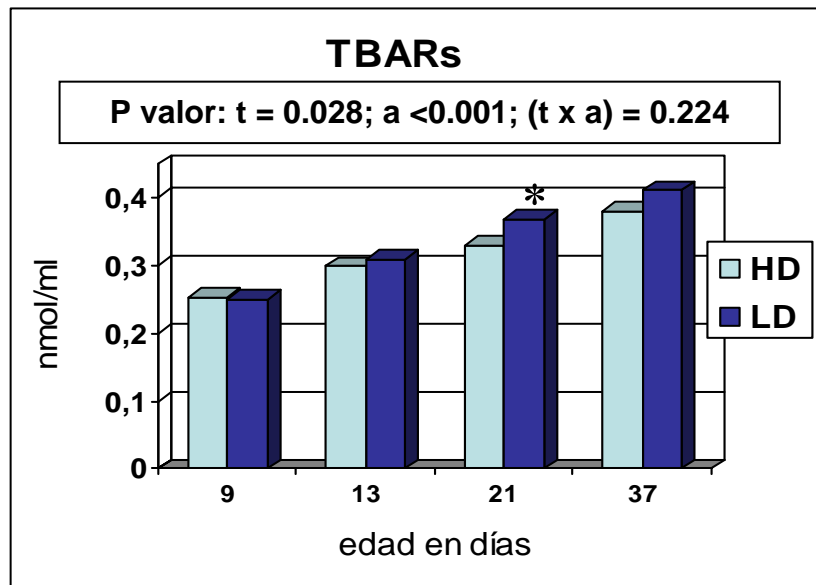


Figura 5.9. TBARs en muestras de sangre. t: Tratamientos; a: Edad de los animales; HD: Nivel alto de dioxinas y PCBs; LD: Nivel bajo; SEM del modelo: 0,03; *: $P < 0,05$ (Diferencias observadas entre tratamientos)

5.2.3. MICROBIOTA GASTROINTESTINAL (contenido cecal)

A. Diversidad microbiana: t-RFLP.- La Figura 5.10., presenta la comparación de los distintos perfiles microbianos de las aves, obtenidos en la restricción enzimática. El % de homología expresado en el dendograma representa los resultados del análisis del contenido cecal de 48 aves que recibieron las dietas experimentales con un nivel alto y bajo de dioxinas y PCBs y que fueron sacrificadas a 9, 21 y 37 días de vida.

47 de las 48 muestras analizadas alcanzaron un porcentaje de similitud del 55 %, observándose además que la composición ecológica de la microbiota fue afectada por la edad de los animales. Así, los animales sacrificados el día 9 mostraron elevados coeficientes de similitud entre ellos, del orden del 65 % constituyendo un *cluster*. Esta diferenciación de los animales en el primer período coincidió con un menor grado de biodiversidad del ecosistema microbiano (Figura 5.11.). A pesar del aparente efecto de dioxinas y PCBs en la edad temprana de los animales y de que a 21 días de vida se observe un efecto pronunciado del tratamiento HD (7 de 8 muestras en un *cluster* diferente, ver figura 5.10, día 21), el análisis del día 37 no reveló diferencias significativas, mostrando una distribución discontinua entre los *clusters* formados en nuestras condiciones analíticas.

En términos de biodiversidad, nuestros resultados, podrían compararse con el desarrollo de la microbiota en condiciones de explotación comercial ya que no se determinó un efecto directo de los tratamientos alto y bajo de dioxinas y PCBs sobre el desarrollo de la microbiota cecal.

Pedroso *et al.* (2005) indican que aún antes de la eclosión se inicia un proceso de colonización del tracto digestivo por parte de diferentes microorganismos; a medida en que la edad avanza, aumentan en concentración pero también en diversidad, paulatinamente (Lu *et al.*, 2003; van der Wielen *et al.*, 2002) hasta estabilizarse entre los 21 a 40 días de vida. Los resultados de estos autores corroboran el efecto de la edad, observado con claridad en este experimento, que se expresa en el incremento de la biodiversidad con una diferencia pronunciada entre el día 9 y los 21 y 37 días de vida de las aves (Figura 5.11.). La diferencia en la riqueza de picos debido a la edad no se manifestó en el experimento T ya descrito anteriormente.

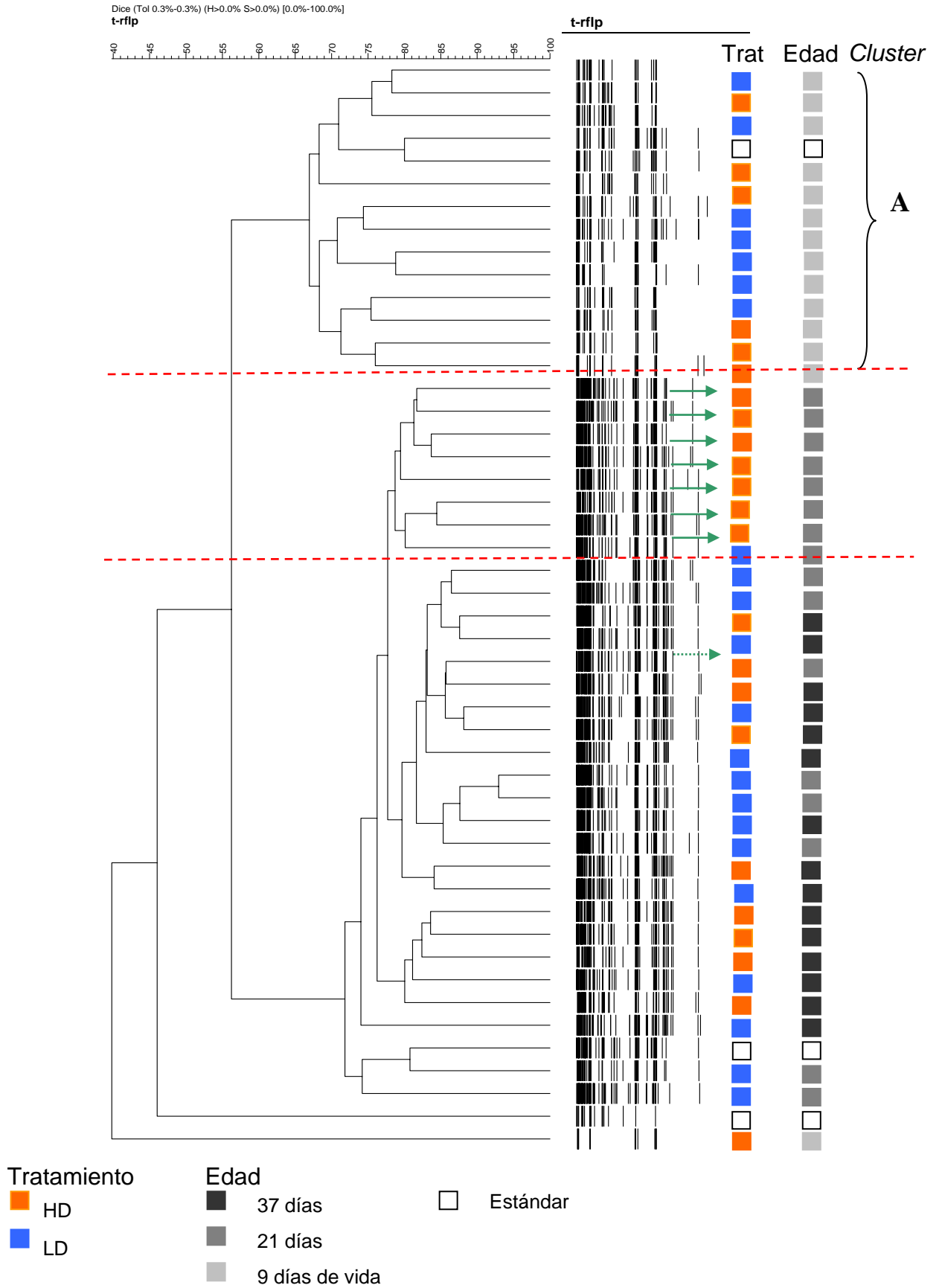


Figura 5.10. Dendrograma que presenta la similitud entre bandas patrón obtenidas por t-RFLP

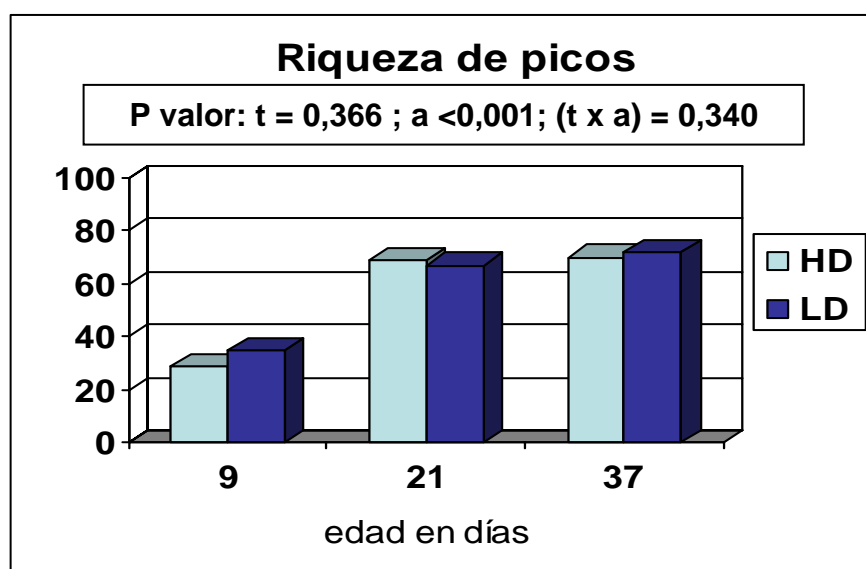


Figura 5.11. Riqueza de picos (número de picos). t: Tratamientos; a: Edad de los animales; HD: Nivel alto de dioxinas y PCBs; LD: Nivel bajo; SEM del modelo: 7,46.

B. Actividad microbiana: Productos de fermentación.- La producción total de ácidos grasos volátiles (AGVs) y la producción de ácido láctico, como indicadores de la actividad microbiana, se presentan en la Figura 5.12. Durante todo el período experimental, las muestras de contenido cecal procedentes de los animales alimentados con el tratamiento HD mostraron una mayor concentración de ácido láctico ($P=0,002$), en comparación con los animales alimentados con la dieta LD. No se observaron diferencias en cuanto a la concentración total de AGVs en función de las variables analizadas (edad o tratamientos).

Las diferencias observadas en la producción del ácido láctico pueden estar relacionadas con la calidad de los aceites empleados en este experimento. En concreto, una menor producción de lactato en el tratamiento LD, significativa en los tres muestreos realizados, podría ser la consecuencia del efecto del nivel de oxidación de la grasa de este tratamiento. Como ya se había mencionado, las referidas grasas presentaban un alto grado de oxidación, medido por elevadas concentraciones de TBARs ($2819 \mu\text{g MDA/kg}$). Algunos autores sugieren que las grasas oxidadas pueden tener un efecto negativo sobre la membrana, a través del ataque a los lípidos que la componen (Aslan *et al.*, 1998; Dibner *et al.*, 1996; Gradinski-Vrbanac *et al.*, 2002; Udilova *et al.*, 2003; Venereo, 2002). De hecho, Chin Sou Fei (1995) afirma que la proporción de *Lactobacillus sp* decrece y aumenta la presencia de *E. coli* en el contenido del TGI cuando los animales son alimentados con grasas con alto potencial oxidativo. Este autor concluye que a diferencia de *E. coli* u otras bacterias, los *Lactobacillus* no manifiestan una respuesta eficiente de la superóxido dismutasa frente al estrés oxidativo.

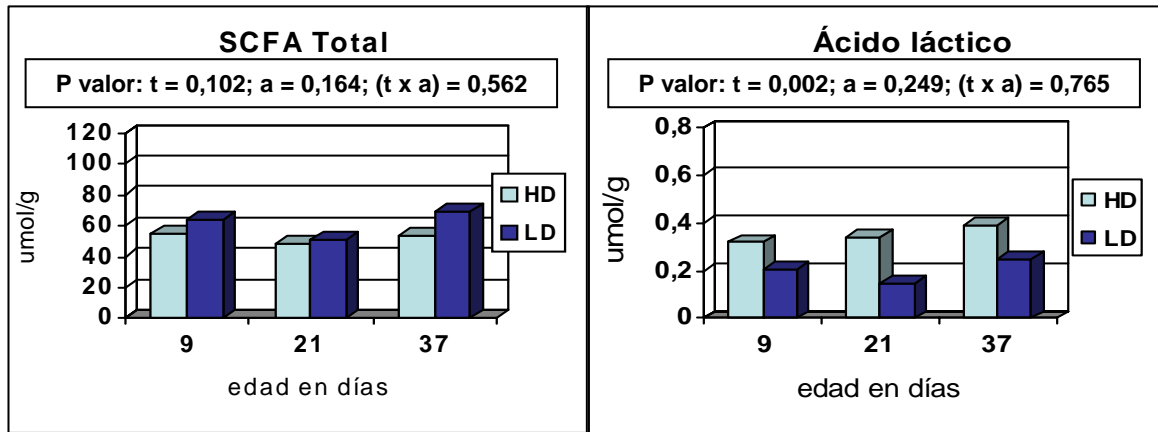


Figura 5.12. Ácidos grasos de cadena corta (SCFA) totales y concentración de ácido láctico. t: Tratamientos; a: Edad; HD: Nivel alto; LD: Nivel bajo; SEM del modelo total: 16,57; SEM del modelo láctico: 0,13

La Tabla 5.7., resume el perfil de ácidos grasos de cadena corta, en las muestras cecales de los pollos del experimento D. Las diferencias estadísticas observadas corresponden a las concentraciones de los ácidos propiónico, butírico y los ácidos grasos volátiles ramificados, que fueron influenciadas por la edad de los animales. La presencia de contaminantes del tratamiento HD o el mayor nivel de oxidación del tratamiento LD no tuvieron una clara influencia sobre la actividad microbiana. La producción de acetato se mantuvo casi inalterable durante el periodo experimental, en tanto que las ligeras variaciones en la concentración del propionato y del butirato (en general, una mayor concentración de ácido butírico que de propiónico), sugieren una mayor actividad de respuesta defensiva o regenerativa del epitelio en animales jóvenes. Una mayor producción de butirato, está asociada al mantenimiento de la salud intestinal por estímulo de la proliferación de células epiteliales y desarrollo de sus actividades metabólicas (Demigne *et al.*, 1999; Montagne *et al.*, 2003). Las concentraciones de ambos AGVs en el presente experimento descienden independientemente del tratamiento, a medida que aumenta la edad, hecho que demuestra la poca influencia del contaminante sobre los parámetros analizados y el efecto significativo de la edad.

De manera general, la relación (%) acético: propiónico: butírico, no siguió una secuencia gradativa butírico < propiónico < acético como la observada por otros autores que emplearon dietas suplementadas con carbohidratos fibrosos (Jozefiak *et al.*, 2007; Rehman *et al.*, 2007). En nuestro caso, las raciones experimentales empleadas (en base a maíz y soja) no fueron concebidas para lograr una elevada proporción de fibra (3,8 % de FB) que estimule la actividad de los microorganismos.

Tabla 5.7. Perfil de ácidos grasos de cadena corta (%)

Edad (días)	9		21		37		SEM	Pt	Pa	P(t x a)
	HD	LD	HD	LD	HD	LD				
Acético %	68,4	65,5	71,3	74,2	72,1	71,0	5,30	0,628	0,081	0,118
Propiónico %	12,2	13,2	8,2	8,3	11,7	11,1	2,92	0,935	0,001	0,929
Butírico %	16,1	17,4	17,0	14,4	10,2	13,2	4,18	0,509	0,006	0,333
Valérico %	1,8	2,4	2,2	2,1	2,4	2,2	0,53	0,694	0,548	0,182
Ramificados %	1,6	1,5	1,3	1,3	3,6	2,5	0,87	0,177	<0,001	0,192

SEM: Error estándar de la media; Pt: p valor para los tratamientos; Pa: p valor para la edad; P(txa): p valor de la interacción; HD: Nivel alto; LD: Nivel bajo

C. Microorganismos patógenos: Presencia de coccidias en excreta.- La proliferación de microorganismos patógenos, en este caso de parásitos del género *Eimeria*, como resultado de la incorporación de materias grasas contaminadas con dioxinas y PCBs, se valoró en muestras de excreta de las aves, colectadas a 18 y 37 días de vida. La figura 5.13., presenta los resultados del conteo de ooquistes de estos agentes patógenos por gramo de excreta (OPG).

Los animales alimentados con el tratamiento HD presentaron un mayor conteo de coccidias de *Eimeria* que sus homólogos LD. Además, la concentración de OPG de la excreta incrementó significativamente con la edad. No obstante, dichas concentraciones no provocaron signos clínicos durante el período experimental. Aparentemente, los niveles de contaminación empleados en este experimento, aunque notables, no revisten importancia desde el punto de vista epidemiológico.

Las diferencias observadas entre los tratamientos parecen estar condicionadas al efecto de las grasas oxidadas sobre los parásitos ya que éstos también son susceptibles al estrés oxidativo. Así, un menor conteo en las muestras de excreta de los animales del tratamiento LD podría ser consecuencia de la utilización de una grasa altamente degradada sin la adición de antioxidantes. Estos resultados coinciden con trabajos que han observado que la adición de antioxidantes, en concreto acetato de α -tocoferol, aumenta el conteo de de OPG de coccidias. Así, Allen y Fetterer (2002) con el empleo de 200 ppm de acetato de α -tocoferol y posteriormente Choque-López *et al.* (2006) con el empleo de grasas oxidadas y grasas suplementadas con vitamina E (200 ppm de acetato de α -tocoferol) se observó un incremento del conteo de OPG de coccidias en aquellas dietas que contenían la vitamina E (3 OPG log en la dieta oxidada *vs.* 5 OPG log en la dieta protegida con el antioxidante). La adición de vitamina E, cuyo objetivo era contrarrestar el

estrés oxidativo en el animal, se vio acompañado del paralelo aumento en la viabilidad de los parásitos.

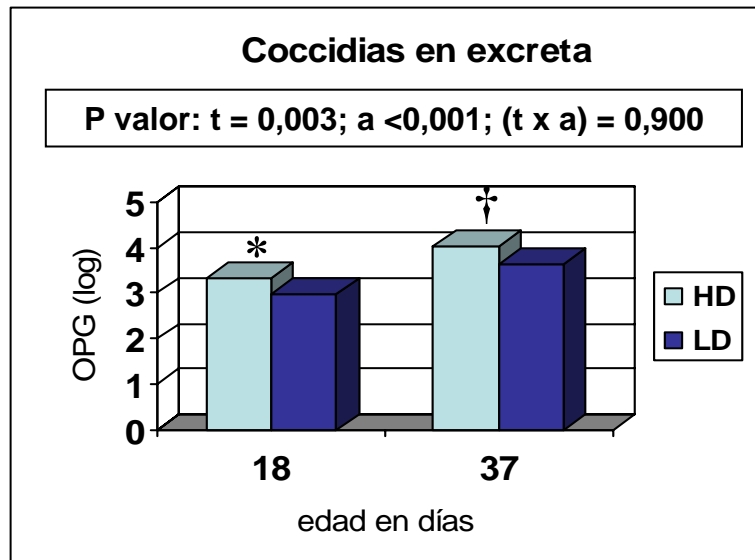


Figura 5.13. Coccidias en excreta. OPG: Ooquistes por gramo de excreta (logaritmo); HD: Nivel alto de dioxinas y PCBs; LD: Nivel bajo; SEM del modelo: 0,19; * P<0,05; † P<0,10 (Diferencias observadas entre tratamientos experimentales)

5.2.4. HISTOMORFOLOGÍA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL (secciones de yeyuno)

La Figura 5.14., presenta los resultados obtenidos al evaluar la influencia de las grasas añadidas en el pienso sobre la morfología del tracto gastrointestinal, en concreto, sobre la longitud de las vellosidades y la profundidad de criptas del yeyuno aviar. De manera general, la edad manifestó una influencia significativa (P<0,001) sobre la longitud de las vellosidades, las cuales aumentaron conforme la edad avanzaba; la profundidad de las criptas disminuyó leve pero significativamente (P<0,001) con la edad de los animales. No se observaron diferencias estadísticas generadas por los tratamientos analizados.

Al igual que en el experimento con formas *trans* (primera prueba experimental) en la dieta de los animales, el desarrollo de las vellosidades y criptas intestinales, sigue un patrón de crecimiento relativamente normal, como el observado en condiciones no experimentales. De ello derivan las diferencias observadas en cuanto a la edad de los animales.

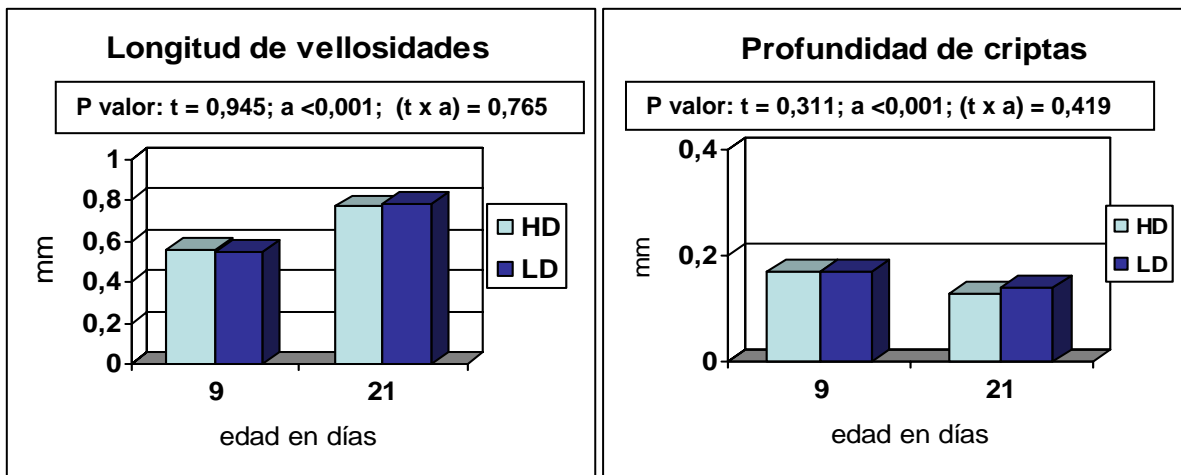


Figura 5.14. Longitud de vellosidades y profundidad de criptas. t: Tratamientos; a: Edad; SEM del modelo longitud: 0,10; SEM del modelo profundidad: 0,02

La presencia de linfocitos intraepiteliales (IEL) fue similar entre ambos tratamientos analizados, tanto a 9 como a los 21 días de vida. No obstante, el número de linfocitos en las vellosidades disminuyó significativamente (P=0,002) a los 21 días de vida, tal como puede apreciarse en la tabla 5.8, similarmente a lo observado en el primer experimento.

De acuerdo a revisiones acerca de la utilización o exposición de dioxinas y PCBs en animales y seres humanos, cabría esperar diferencias entre tratamientos. Fairbrother *et al.* (2004), Gallego *et al.* (2005) y posteriormente Schecter *et al.* (2006) coinciden en indicar que la exposición a dioxinas y PCBs tiene como una de sus consecuencias la disminución de la respuesta inmune por inmunosupresión. Pero la falta de respuesta manifestada por los animales, tanto a nivel de los rendimientos productivos como de signos clínicos, hace entrever que no existió una situación de activación del sistema inmune que pudiera permitir observar diferencias derivadas del consumo de contaminantes por parte de los animales, aunque también cabe la posibilidad de que los niveles empleados en el presente experimento no fueran lo suficientemente altos como para provocar un estado de inmunosupresión.

Tabla 5.8. Número de linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos

Edad (días)	9		21		Pt	Pa	P(t x a)
	HD	LD	HD	LD			
IEL	26,11	27,83	21,78	19,52	0,888	0,002	0,304

IEL: Linfocitos intraepiteliales; Pt: p valor tratamientos; Pa: p valor edad; P (txa): p valor de la interacción; HD: Nivel alto de dioxinas y PCBs; LD: Nivel bajo; SEM del modelo: 5,16

La mayor parte de los efectos observados corresponden principalmente a la calidad de la materia grasa, más que al contenido de las sustancias contaminantes. En general, el efecto de la edad fue significativo en tanto que los tratamientos no provocaron diferencias de importancia estadística. No obstante, la transferencia de dioxinas y PCBs del pienso hacia la carne está claramente demostrada y requiere una especial atención al momento de generar recomendaciones acerca del uso de grasas recicladas en las que se encuentren presentes niveles variables de estos contaminantes orgánicos.

5.3. TERCERA PRUEBA EXPERIMENTAL: “Evaluación de la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAPs (P)”

En esta prueba experimental, se utilizaron materias grasas con un diferente contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), en concreto, aceite ácido comercial de orujo de oliva con un contenido de 5291 ng HAPs/g de aceite (271 ng HAPs/g de pienso) añadido a la dieta experimental HP, y aceite ácido de oliva con un contenido de <18 ng HAPs/g de aceite (traza en el pienso) añadido a la dieta experimental LP. En ambos casos, había un contenido de < 2 ng PBDEs (difenilo éteres polibromados)/g de aceite. Diversos autores (Arrebola *et al.*, 2006; Ballesteros *et al.*, 2006; Guillen *et al.*, 2004; Moreda *et al.*, 2004; Moret *et al.*, 1997), coinciden en identificar elevados niveles de HAPs en aceites ácidos de oliva u orujo de oliva, más que en otros tipos de aceites, debido al proceso que siguen para su obtención y purificación.

La ración base así como el nivel de inclusión de las materias grasas fueron los mismos que en las otras pruebas experimentales. El análisis de calidad de estos aceites reveló un grado de acidez del orden de 100,4 mg KOH/g de aceite para el tratamiento HP y de 108,3 mg KOH/g de aceite para el tratamiento LP (Análisis realizado en el Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Barcelona). La Tabla 5.9., presenta el perfil de ácidos grasos de las materias grasas del presente experimento. La composición de las grasas incluidas en los dos tratamientos dietéticos es prácticamente la misma, no observándose diferencias en la relación saturado/insaturado (0,23 en ambos tratamientos). Los coeficientes de digestibilidad aparente de la materia seca y materia orgánica obtenidos a partir de balances de digestibilidad realizados a los 14 y 37 días de vida fueron similares para ambos piensos experimentales. La digestibilidad aparente fecal del extracto etéreo fue ligeramente superior en el tratamiento LP en ambas edades (74,9 % y 78,2%, LP vs. 72,8% y 76,6%, HP, 14 y 37 días respectivamente, P<0,05) (Mateus, 2007)

Tabla 5.9. Perfil de ácidos grasos de las materias grasas incluidas en el tercer experimento (P)

Trat	AGS	AGMI	AGPI	Insat	Sat/insat
HP (%)	19,0	69,7	11,3	81,0	0,23
LP (%)	18,9	71,2	9,9	81,1	0,23

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

Existe una amplia documentación y también una gran controversia sobre el efecto de estos contaminantes en el medio ambiente, los animales silvestres y los seres humanos. Sin embargo, la información es escasa en relación a su efecto sobre los animales de explotación ganadera, tanto en el impacto sobre su productividad y salud, como sobre el riesgo de la transferencia

hacia el producto final, en términos de seguridad alimentaria, objetivo último del proyecto europeo “Feeding Fats Safety”.

5.3.1. RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS E INCIDENCIAS OBSERVADAS DURANTE EL PERÍODO EXPERIMENTAL

No se observaron incidencias destacables o mortalidad de las aves durante el período experimental. Asimismo, no se observaron lesiones patológicas en el momento de realizar el examen post-mortem. Aparentemente, un alto nivel de contaminación de las materias grasas incluidas en los piensos, no genera una respuesta negativa de los animales. Estos resultados concuerdan con los observados por Ciganek (2002) y Ciganek y Neca (2006), quienes tampoco reportaron problemas de salud en cerdos y bovinos alimentados con dietas que contenían 256 ng HAPs/g de pienso y 14156 ng HAPs/g de pienso, respectivamente, durante periodos experimentales de 6 y 8 meses. Paralelamente, el impacto de los HAPs sobre la salud de los animales fue evaluado en un experimento realizado por Beauchamp *et al.* (2002), con el empleo de fibra de papel como fuente de celulosa, a niveles de inclusión en el pienso de 0 %, 5 % y 10 % (0, 310 y 620 µg HAPs/g de pienso, respectivamente), ante la posibilidad de la ingestión de este material contaminado (este tipo de trabajos está destinado a la búsqueda de material para camas, alternativo en regiones que presentan poca productividad de residuos de fibra o serrín). El período de exposición de las aves fue de 7 semanas. En dicho experimento, la salud de los animales no se vio afectada.

Por el contrario, distintas referencias apuntan a un efecto negativo de los HAPs sobre la salud, tanto de personas como de animales. Estos efectos incluyen la generación de diferentes cuadros clínicos así como la capacidad carcinogénica y mutagénica de estos compuestos de contaminación orgánica (Mastandrea *et al.*, 2005; SCF, 2002a; SCF, 2002b; vanSchooten *et al.*, 1997; Villar, 2004). No obstante, estas manifestaciones son características de individuos que han sido sometidos a un largo período de exposición, mayor al empleado por los autores anteriormente citados y en nuestro periodo experimental. Por otro lado, parece ser que cuanto menor es el desarrollo de los animales, la sensibilidad a la exposición de estos contaminantes es mayor. En el trabajo publicado por Brunström *et al.* (1990), la exposición a niveles de 4,6 – 6,5 % w/w (sobre el peso de los huevos) de soluciones de HAPs inoculadas en el saco vitelino de huevos fértiles a partir del día 5 de incubación produjo elevadas tasas de mortalidad (de hasta el 100 % en el caso de patos y del 40 % en pollos) en los embriones de pollos, pavos y patos domésticos. Otros autores (Engwall *et al.*, 1999; Matlova *et al.*, 1995) coinciden en indicar la mayor susceptibilidad, a elevadas dosis del contaminante, durante el desarrollo de embriones de pollo.

En el marco del proyecto de investigación (FFS) del cual forma parte la presente memoria, Devier y Budzinski (2007) realizaron un experimento en el que alimentaron pollos de carne con piensos que contenían materias grasas a las que se contaminó con niveles cuatro veces superiores a los empleados en la presente prueba experimental (1200 ng HAPs/g de pienso). En dicha prueba no se observaron manifestaciones clínicas ni incidencias durante el periodo experimental de 40 días. Además, se midió la transferencia del contaminante en la carne e hígado de los animales, observándose niveles que no superaron los 8 ng HAPs/g de tejido tanto hepático como muscular. La transferencia del contaminante en la carne e hígado de los pollos de nuestra prueba experimental tampoco supero los 8 ng HAPs/g de tejido.

La Tabla 5.10., presenta el consumo medio diario (CMD, expresado en gramos/ave y día), ganancia media diaria (GMD, expresado en g/ave y día) e índice de transformación (IT, pienso consumido/ganancia de peso), obtenidos en los controles productivos a diferentes edades, el control parcial a los 21 días de vida de las aves y el control productivo global del periodo experimental. En general, el rendimiento productivo de las aves no se vio afectado por los niveles de contaminación de HAPs en la dieta, ya que no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos. Los pesos vivos finales alcanzados por las aves a la conclusión del periodo experimental fueron similares entre tratamientos (1902 ± 120 g, HP vs 1920 ± 140 g LP; $P < 0,05$). Estos resultados corroboran los obtenidos por Devier y Budzinski (2007), en cuyo experimento con niveles de concentración superiores, descritos previamente, no generaron diferencias en la productividad de los pollos de carne.

En el trabajo ya mencionado de Beauchamp *et al.* (2002), se determinó la transferencia del pienso a los tejidos del animal, hallando niveles de concentración de HAPs totales, próximos a 7 ng HAPs/g de tejido hepático y de 4 ng HAPs/g de tejido adiposo, cuando el nivel de inclusión de la fibra de papel era del 10 %, aportando 620 μ g HAPs/g de pienso. A pesar de ello, las aves no manifestaron problemas de salud, pero si una menor ganancia de peso en comparación a los animales que no consumieron las dietas que contenían HAPs (tratamiento con el 0% de inclusión), que puede ser explicada por las diferencias en el contenido en fibra de las dietas experimentales utilizadas por los autores.

Tabla 5.10. Resultados productivos de la prueba experimental P

Tratamientos	HP	LP	SEM	P
6-9 días				
CMD (g/ave)	17,15	17,20	0,58	0,902
GMD (g/ave)	13,92	13,83	0,79	0,874
IT	1,233	1,245	0,030	0,602
10-13 días				
CMD (g/ave)	33,82	34,16	5,30	0,931
GMD (g/ave)	26,68	27,38	0,65	0,186
IT	1,266	1,247	0,184	0,892
14-21 días				
CMD (g/ave)	52,76	54,48	0,78	0,021
GMD (g/ave)	42,20	43,38	1,01	0,149
IT	1,251	1,256	0,031	0,802
22-37 días				
CMD (g/ave)	117,19	118,86	2,51	0,384
GMD (g/ave)	69,73	70,07	6,61	0,945
IT	1,690	1,709	0,160	0,869
Parcial 6-21 días				
CMD (g/ave)	39,12	40,08	1,09	0,258
GMD (g/ave)	31,25	31,99	0,54	0,104
IT	1,253	1,253	0,043	0,994
Global (6-37 días)				
CMD (g/ave)	81,5	82,85	1,34	0,204
GMD (g/ave)	52,14	52,66	3,71	0,85
IT	1,569	1,580	0,111	0,896

CMD: Consumo medio diario; GMD: Ganancia media diaria; IT: Índice de transformación; SEM: Error estándar de la media; HP: Nivel alto de HAPs; LP: Nivel bajo.

5.3.2. TASA DE HEMÓLISIS Y VALORES TBARs EN MUESTRAS DE SANGRE

Las muestras de sangre colectadas a 9, 13, 21 y 37 días de vida de las aves se analizaron para determinar la resistencia de la membrana de los eritrocitos a la hemólisis (tasa de hemólisis) y la proporción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). Estos resultados se presentan en las figuras 5.15., y 5.16., respectivamente. Con relación a la tasa de hemólisis, no se observaron diferencias provocadas por los tratamientos (HP vs. LP), salvo en el caso del análisis realizado el día 13, en el que se registró una mayor tasa de hemólisis en los animales alimentados con la dieta LP, sin razón aparente. En general, la resistencia de la membrana aumentó con la edad reflejándose en una disminución del porcentaje de hemólisis a medida que la edad aumentaba, tal y como también se observó en los experimentos anteriores. A pesar del efecto significativo de la edad ($P < 0,001$), los valores de oxidación secundaria TBARs

presentaron variaciones de concentración ligeras situándose en valores de entre los 0,189 y 0,264 nmol/ml de TBARs. Los tratamientos no generaron diferencias estadísticamente significativas en esta segunda determinación analítica.

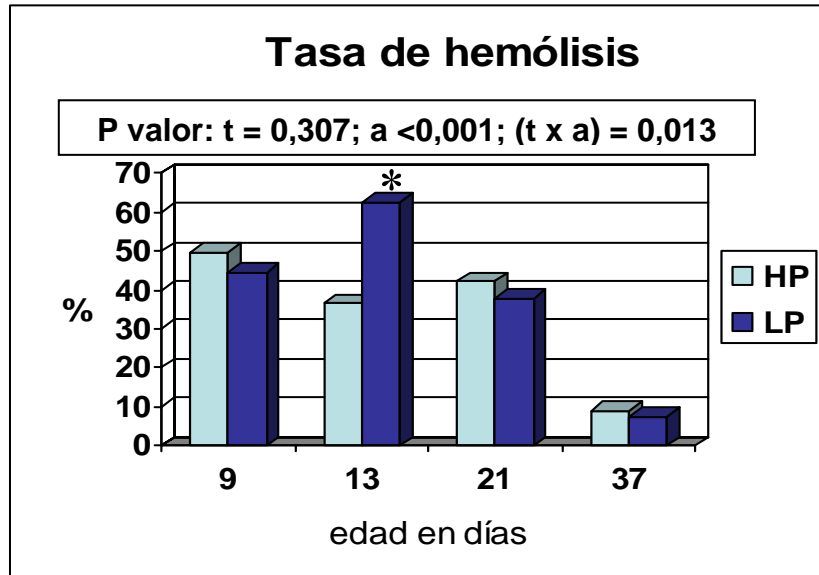


Figura 5.15. Tasa de hemólisis. t: Tratamientos; a: Edad de los animales; HP: Nivel alto de HAPs; LP: Nivel bajo; SEM del modelo: 13,06; *: $P < 0,05$ (diferencia observada entre tratamientos a esta edad)

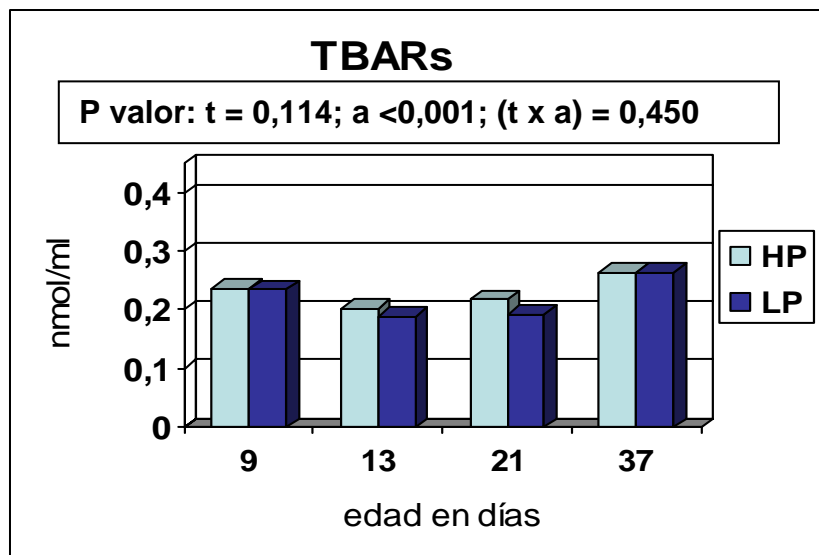


Figura 5.16. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). t: Tratamientos; a: Edad de los animales; HP: Nivel alto de HAPs; LP: Nivel bajo; SEM del modelo estadístico: 0,02

Al analizar muestras de aceite de orujo de oliva, resultantes del procesamiento de aceite virgen de oliva extra, Guillen *et al.* (2004) concluyen que los antioxidantes naturales que están presentes en estos aceites pueden ser absorbidos junto a los HAPs que los contaminan, inhibiendo ciertas reacciones de oxidación. De hecho, las materias grasas del experimento

presentaron un nivel relativamente alto de antioxidantes (tocoferoles y tocotrienoles), en concreto el α -tocoferol alcanzó una concentración de 248 mg/kg tratamiento HP y 69 mg/kg en el tratamiento LP (Análisis realizado en el Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Barcelona).

5.3.3. MICROBIOTA GASTROINTESTINAL (contenido cecal)

A. Diversidad microbiana: t-RFLP.- La comparación de los distintos perfiles microbianos de las aves, obtenidos en la restricción enzimática se presenta en la Figura 5.17. El dendograma (obtenido del análisis de muestras de contenido cecal de 48 pollos) representa los resultados observados a la aplicación de las dietas experimentales con un nivel alto y bajo de HAPs. Al igual que los otros experimentos, las muestras corresponden a aves que fueron sacrificadas a 9, 21 y 37 días de vida. Las distancias de separación en el dendograma corresponden al porcentaje de similitud.

En nuestras condiciones y de manera general, todas las muestras analizadas alcanzaron un considerable grado de similitud del 68 %. La composición ecológica de la microbiota fue afectada por la edad de los animales, en tanto que los tratamientos no manifestaron diferencias de importancia estadística. Así, los animales sacrificados los días 9 ó 37 mostraron elevados coeficientes de similitud entre ellos (76 y 78 %, respectivamente), separándose en *clusters* diferentes (*clusters* A y B, respectivamente). Esta diferenciación de los animales en el primer y último período, es una consecuencia de la transición de la microbiota del animal joven hacia el adulto, fenómeno que fue discutido ya en apartados anteriores. Con relación a los animales sacrificados el día 21, estos se distribuyen heterogéneamente a lo largo del dendograma sin manifestar un claro efecto asociado a los tratamientos (flechas de color azul).

Por otro lado, algunos animales sacrificados el día 21, que recibieron el nivel alto de HAPs (HP), se agruparon en un *cluster* asociado a los animales sacrificados el día 37 (sección inferior del dendograma). Este aparente efecto de los HAPs sobre la microbiota en el tercer período, podría sugerir un ligero desarrollo de la microbiota influenciado por el tratamiento, pero que no se considera como un claro disturbio en el equilibrio de la ecología microbiana.

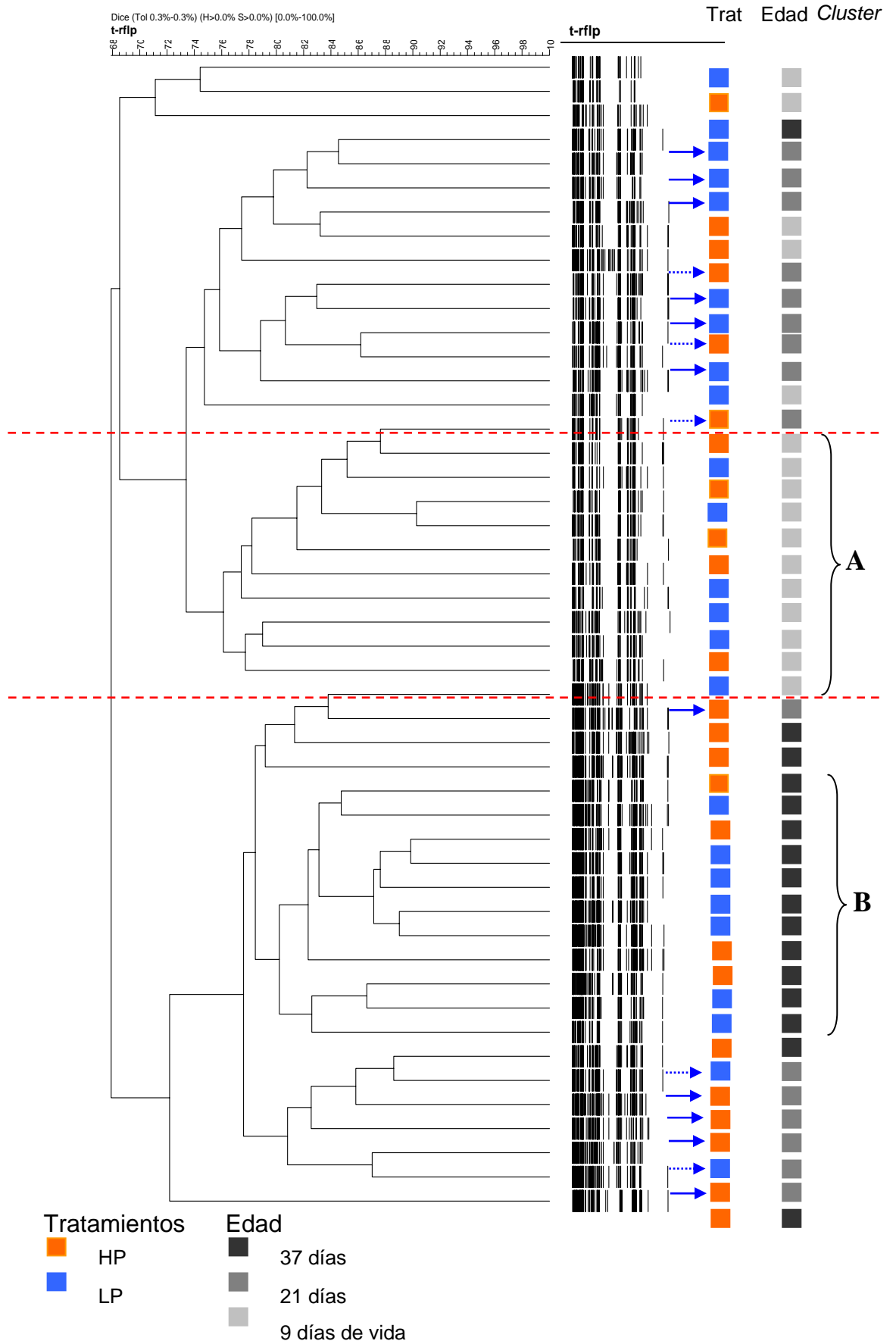


Figure 5.17. Dendrograma que presenta la similitud entre bandas patrón obtenidas por t-RFLP

A pesar del número de fragmentos terminales que incrementó progresivamente con la edad de los animales (Figura 5.18.), no se observaron diferencias estadísticas provocadas por la aplicación de los tratamientos. El incremento en la biodiversidad, similar al esperado en condiciones no experimentales, sugiere un cierto grado de adaptación por parte de las bacterias a las condiciones del medio (probablemente muy próximo al rango mínimo de adaptación).

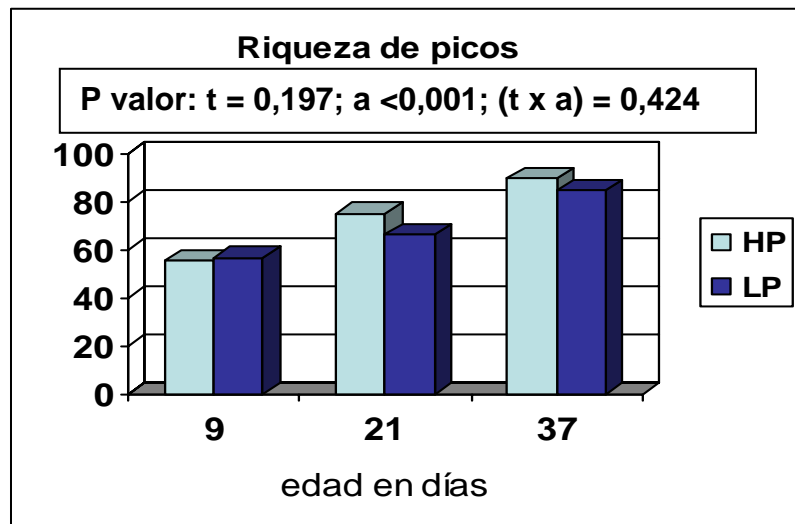


Figura 5.18. Riqueza de picos (número de picos). t: Tratamientos; a: Edad de los animales; HP: Nivel alto de HAPs; LP: Nivel bajo; SEM del modelo: 10,61

B. Actividad microbiana: productos de fermentación.- Las muestras de contenido cecal, se procesaron para determinar la actividad microbiana en términos de concentración ($\mu\text{mol/g}$ de muestra), así como de proporción (%) de los más importantes productos de fermentación. Así, la producción total de ácidos grasos volátiles (AGVs) y la producción de ácido láctico se presentan en la Figura 5.19., en tanto que la proporción de los AGVs mayoritarios se presenta en la tabla 5.8.

El total de los AGVs producidos manifestó un descenso en la concentración conforme la edad avanzaba, aunque esta disminución así como las diferencias entre los tratamientos no fueron estadísticamente significativas.

En cuanto a la concentración de ácido láctico, las muestras procedentes de animales sacrificados el día 21 presentaron un desmesurado nivel de ácido láctico, que se normalizó a los 37 días de vida. Este fenómeno no tiene una clara explicación y podría estar relacionado con un error metodológico en el procesado de las muestras, por lo que estos resultados deben considerarse con precaución.

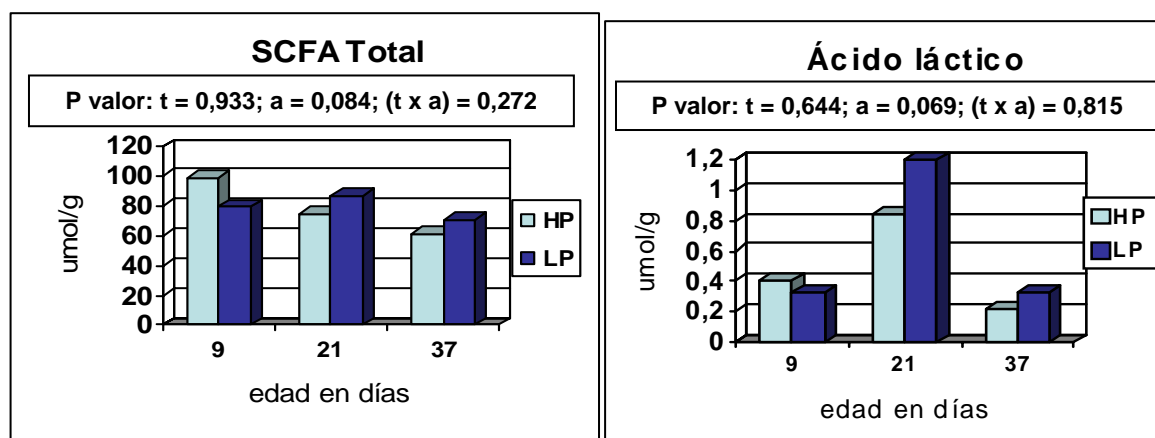


Figura 5.19. Ácidos grasos de cadena corta (SCFA) totales y concentración de ácido láctico. t: Tratamientos; a: Edad de los animales; HP: Nivel alto; LP: Nivel bajo; SEM del modelo SCFA Total: 27,67; SEM del modelo Ácido láctico: 0,94

La Tabla 5.11., resume el perfil de ácidos grasos de cadena corta en las muestras de contenido cecal de los pollos del experimento P. Las diferencias estadísticas observadas corresponden a la concentración de los ácidos, acético, propiónico, valérico y los ácidos grasos volátiles ramificados, que fue influenciada significativamente por la edad de los animales. La proporción de acetato disminuyó significativamente en tanto que la producción de ácido propiónico aumentó al igual que las proporciones de los ácidos volátiles ramificados. En ninguno de los casos se observó diferencia entre los tratamientos (HP vs. LP).

Tabla 5.11. Perfil de ácidos grasos de cadena corta (Expresado en %)

Edad (días)	9		21		37		SEM	Pt	Pa	P(t x a)
	HP	LP	HP	LP	HP	LP				
Acético %	78,8	76,8	75,4	77,5	69,7	69,1	3,87	0,877	<0,001	0,366
Propiónico %	4,7	7,6	6,3	6,2	13,9	11,9	3,58	0,812	<0,001	0,198
Butírico %	13,4	12,4	15,5	13,9	12,2	14,3	3,98	0,892	0,448	0,396
Valérico %	1,9	2,2	1,7	1,4	2,0	2,3	0,45	0,712	0,002	0,107
Ramificados %	1,2	1,4	1,0	1,0	2,2	2,5	0,83	0,536	<0,001	0,768

SEM: Error estándar de la media; Pt: p valor para los tratamientos; Pa: p valor para la edad; P(txa): p valor de la interacción; HP: Nivel HAPs; LP: Nivel bajo.

La relación entre los AGV mayoritarios mantuvo la tendencia de acético > butírico > propiónico durante todo el periodo experimental. Este comportamiento es similar al observado por van der Wielen *et al.* (2000), quienes estudiaron la producción de AGVs en pollos en crecimiento en condiciones comerciales, en las que el pienso estaba compuesto principalmente por maíz y soja (de manera similar a nuestro experimento). A diferencia de este autor, Rehman *et al.* (2007) y

Montagne *et al.* (2003) observaron un incremento en la proporción de propionato por encima de la proporción de butirato (y menor que la de acetato), en pollos alimentados con dietas suplementadas con fibra. Parece lógico suponer que el sustrato alimenticio puede modificar la producción de AGVs, en tanto que no se ha detectado un efecto del nivel de contaminación de las materias grasas empleadas en nuestro experimento.

C. Microorganismos patógenos: Presencia de coccidias en excreta.- El número de *coccidias* en excreta contabilizados a 18 y 37 días de vida de los animales se presenta en la Figura 5.20. Las aves alimentadas con la dieta HP, mostraron un mayor conteo de *ooquites* de coccidia por gramo de excreta (OPG). Así mismo, la concentración de OPGs, incrementó significativamente con la edad. No obstante, los niveles encontrados no provocaron manifestaciones clínicas y se situaron dentro de rangos considerados normales en condiciones comerciales.

No hay evidencia que nos permita relacionar un efecto de estos contaminantes orgánicos sobre una mayor o menor viabilidad de los parásitos. Los efectos observados parecen estar relacionados más a la calidad y a la composición de las materias grasas que al diferente nivel de contaminación estudiados. Así, la diferencia significativa entre los conteos de ooquistes de coccidias de los tratamientos HP vs. LP podría estar relacionada con su mayor contenido de antioxidantes como los tocoferoles y tocotrienoles, que alcanzaron una concentración total de 278 mg/kg de aceite en HP en comparación a los antioxidantes determinados en el tratamiento LP de 69 mg/kg de aceite. Allen y Fetterer (2002) observaron un incremento en el conteo de OPGs en la excreta de pollos alimentados con una dieta suplementada con 200 ppm de acetato de α -tocoferol, frente a otra sin la adición del antioxidante.

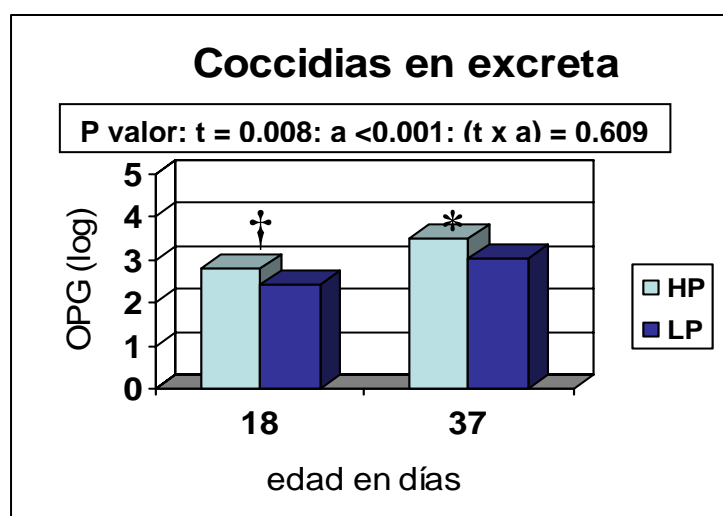


Figura 5.20. Coccidias en excreta. OPG: Ooquistes por gramo de excreta (logaritmo); HP: Nivel alto; LP: Nivel bajo; SEM del modelo: 0,19; * $P < 0,05$; † $P < 0,10$ (Diferencias observadas entre tratamientos experimentales)

5.3.4. HISTOMORFOLOGÍA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL (secciones de yeyuno)

La Figura 5.21., presenta los resultados obtenidos al evaluar la influencia de las grasas contaminadas añadidas en el pienso sobre la morfología del tracto gastrointestinal, en concreto, sobre la longitud de las vellosidades y la profundidad de criptas de una sección intestinal correspondientes al yeyuno de las aves utilizadas en este experimento.

De manera general, la edad manifestó una influencia significativa ($P < 0,001$) sobre la longitud de las vellosidades, las cuales aumentaron conforme la edad avanzaba; la profundidad de las criptas disminuyó leve pero significativamente ($P < 0,001$) con la edad de los animales. No es posible establecer una clara relación entre la presencia de HAPs en el pienso de los animales y la morfología del tracto digestivo, aun a pesar de la diferencia significativa observada en la profundidad de las criptas entre los animales que consumían la dieta LP y sus homólogos que consumían la dieta HP ($P < 0,05$) a 21 días de vida, debido a que no se dispone de información suficiente a cerca del efecto de estos contaminantes sobre los parámetros histológicos estudiados.

El patrón evolutivo de las vellosidades intestinales, así como la disminución en la profundidad de las criptas intestinales conforme la edad aumenta, se corresponden con los experimentos anteriores (isómeros *trans* y Dioxinas – PCBs) y con el desarrollo esperado en condiciones no experimentales.

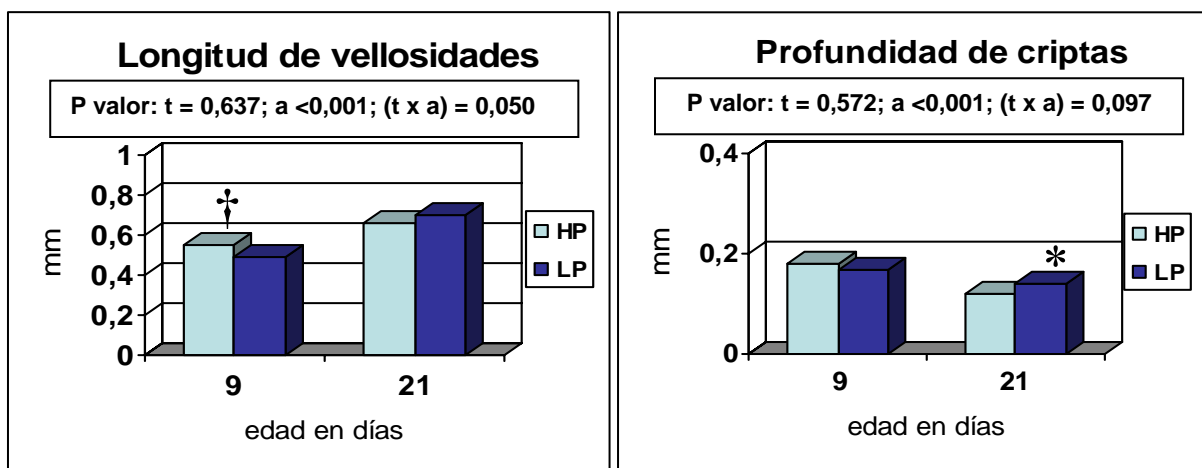


Figura 5.21. Longitud de vellosidades y profundidad de criptas. t: Tratamientos; a: Edad de los animales; HP: Nivel alto HAPs; LP: Nivel bajo; SEM del modelo longitud: 0,06; SEM del modelo profundidad: 0,02; †: $P < 0,10$; *: $P < 0,05$ (Diferencias observadas entre tratamientos experimentales)

La respuesta inmune estimada únicamente a partir del número de linfocitos intraepiteliales (IEL, Tabla 5.12.) no manifestó diferencias de importancia entre tratamientos tanto en el conteo

realizado a 9 como a 21 días de vida. No obstante, y al igual que en los experimentos anteriores, el número de linfocitos en las vellosidades disminuyó significativamente ($P < 0,001$) a los 21 días de vida de las aves.

La presencia de HAPs en la dieta no manifestó un claro efecto sobre la respuesta inmune de los animales. Similarmente a lo apuntado en el caso de las dioxinas, cabía esperar que la presencia de grasas contaminadas provocara una inmunosupresión. Los reportes y la opinión científica del Scientific Committee on Food de la UE (SCF, 2002a; SCF, 2002b) evaluaron el riesgo de exposición a los HAPs de los seres vivos y concluyen en que uno de sus efectos es la inmunosupresión, e incluye entre otras cosas, la disminución de la respuesta mediada por células (linfocitos T).

No obstante, nuestros resultados no son concluyentes. La respuesta inmune, como ya se ha comentado en el experimento anterior, es un proceso complejo que en muchos casos necesita una activación para manifestar diferencias. Es probable que la falta de respuesta observada también en este experimento se deba a la no activación o no estimulación del sistema inmune, motivo por el cual se deben cuestionar la importancia relativa de este parámetro (conteo de IELs) como único indicativo de la respuesta inmune.

Tabla 5.12. Número de linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos

Edad (días)	9		21		Pt	Pa	P(t x a)
	HP	LP	HP	LP			
IEL	26,07	22,70	18,05	18,82	0,384	<0,001	0,169

Pt: P valor tratamientos; Pa: P valor edad; P(txa): P valor de la interacción; HP: Nivel alto HAPs; LP: Nivel bajo HAPs; SEM del modelo: 4,16

El efecto de los HAPs presentes en las materias grasas que se incluyen en los piensos animales depende, fundamentalmente, del nivel de contaminación (grado de exposición) y el tiempo de exposición en los animales. En este sentido, la ausencia de diferencias de importancia estadística observadas entre nuestros tratamientos, reflejan hasta cierto grado la inocuidad del nivel empleado. No obstante, la transferencia y las vías de excreción de estos contaminantes deben ser consideradas con especial atención. Así por ejemplo, Devier y Budzinski, en el marco del proyecto europeo FFS determinaron niveles totales próximos a 130 ng HAPs/g de bilis en los pollos de nuestro experimento alimentados con la dieta HP, en comparación a < 15 ng HAPs/g de bilis del tratamiento LP; el resto pudo ser eliminado en la excreta aunque lamentablemente no se disponen de datos de esta vía de excreción.

5.4. CUARTA PRUEBA EXPERIMENTAL: “Evaluación de la presencia de productos de oxidación (O)”

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la presencia de aceites reciclados de freiduría en la dieta de pollos de carne durante un período experimental de 5 a 37 días de vida. Los piensos experimentales empleados, estaban compuestos por una ración base (maíz y soja) que incluían un 6 % de grasa con 2 niveles de alteración: nivel alto, compuesto por una mezcla 70/30 de aceite de girasol y oliva, residuo de freiduría (HO=6,61 % de contenido de polímeros y 67,43 valor p-anisidina) y nivel bajo, compuesto por una mezcla 70/30 de aceites comerciales de girasol y oliva sin calentar (LO=0,35 % de contenido de polímeros y 2,74 valor p-anisidina). Como se había mencionado en el capítulo de material y métodos, los aceites del tratamiento HO se calentaron adicionalmente a 165-170°C durante 8 horas, para conseguir el presente grado de oxidación.

Determinaciones realizadas por el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona revelaron que el perfil de ácidos grasos de las grasas utilizadas fue bastante similar (Tabla 5.13), aunque la grasa LO presentó 7 unidades porcentuales más de AGPI. Debido a que la proporción de AGMI fue inversa a la proporción de AGPI, la proporción de insaturados así como la relación saturados vs insaturados fue prácticamente la misma en los dos tratamientos experimentales.

El contenido en Vitamina E de los aceites también fue diferente. Probablemente como resultado del proceso de calentamiento de la grasa HO, el contenido en tocoferoles y tocotrienoles totales (317,78 mg/kg de los cuales 296,58 correspondían a α -tocoferol) fue inferior al determinado en el aceite del tratamiento LO que presentó una concentración total de 501,96 mg/kg, de los cuales 460,72 correspondían al α -tocoferol. Por otro lado, la digestibilidad aparente fecal de las grasas (extracto etéreo), no se diferenció de las obtenidas en los experimentos 2 (dioxinas y PCBs) y 3 (HAPs), situándose en valores próximos a 78 % en tanto que las grasas de los otros 2 experimentos alcanzaron 82 y 75 %, respectivamente.

Tabla 5.13. Perfil de ácidos grasos de las materias grasas de la cuarta prueba experimental (O)

Trat	AGS	AGMI	AGPI	Insat	Sat/insat
HO (%)	14,1	44,9	40,9	85,9	0,16
LO (%)	12,4	39,2	48,4	87,6	0,14

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

El efecto de la adición de grasas poliinsaturadas y antioxidantes en la dieta sobre los rendimientos productivos y los niveles de oxidación en la carne de pollo y huevos, está bien documentado (Bou *et al.*, 2006; Cortinas *et al.*, 2004; Galobart, 2000; Galobart *et al.*, 2001; Grau *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 1989b; Maraschiello *et al.*, 1999; Robey y Shermer, 1994; Ruiz *et al.*, 1999; Villaverde *et al.*, 2004; Villaverde, 2005; Wang *et al.*, 1997). Estos trabajos se centran en los resultados de determinaciones post-mortem realizadas con el objetivo de evaluar el efecto del potencial oxidativo de las grasas poliinsaturadas y su corrección a través de antioxidantes en el pienso sobre la estabilidad de los lípidos de los productos finales.

Por el contrario, son escasos los trabajos orientados a estudiar el impacto de la ingestión de materias grasas oxidadas sobre parámetros de salud de los animales en producción (estrés oxidativo *in vivo*) y, más concretamente sobre parámetros indicadores de lo que genéricamente denominamos “salud gastrointestinal” (efecto sobre la mucosa), así como sobre la flora microbiana (tanto saprofita como patógena).

5.4.1. RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS E INCIDENCIAS OBSERVADAS DURANTE EL PERÍODO EXPERIMENTAL

El periodo experimental se caracterizó por la ausencia de incidencias y mortalidad de las aves. Así mismo, no se observaron lesiones patológicas al momento de realizar el examen post-mortem. El nivel de alteración de las materias grasas incluidas en los piensos no parece provocar una respuesta negativa de los animales. Estas observaciones son similares a las descritas por Oertel y Hartfiel (1982), con el empleo de grasas oxidadas. En este trabajo, un nivel de inclusión en el pienso de 7 % de aceite de soja oxidado (condiciones de oxidación no especificadas) no generó problemas de salud. Liu y Huang (1996) tampoco observaron problemas en la salud en ratas alimentadas con piensos que contenían grasas oxidadas (15 % de aceite de soja termooxidado a $205 \pm 5^\circ\text{C}$ por 6 horas). En contraposición, diversos trabajos (Chin Sou Fei, 1995; Dibner *et al.*, 1996; Eder *et al.*, 2003; Penumetcha *et al.*, 2000; Staprans *et al.*, 1996a; Staprans *et al.*, 1996b) resaltan el potencial riesgo de la generación de enfermedades con el empleo de materias grasas oxidadas. También se alerta de que una severa oxidación de los lípidos en grasas potencialmente oxidables de la dieta pueden causar la depleción del contenido de antioxidantes como la vitamina E (Sheehy *et al.*, 1993), provocando severos cuadros de encefalomalacia (Lin *et al.*, 1989a; Wang *et al.*, 1997), e inmunoincompetencia (Turek *et al.*, 2003).

Los parámetros productivos, consumo medio diario (CMD, expresado en gramos/ave y día), ganancia media diaria (GMD, expresado en g/ave y día) e índice de transformación (IT, pienso

consumido/ganancia de peso), obtenidos en los controles productivos a diferentes edades, el control parcial a los 21 días de vida de las aves y el control productivo global del periodo experimental, se presentan en la Tabla 5.14. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el periodo productivo global entre tratamientos, aunque los animales alimentados con el tratamiento LO (pienso con bajo nivel de productos de oxidación) mostraron un ligero mejor IT que los animales alimentados con el tratamiento HO (P=0,018) en el período comprendido entre 6 y 21 días de vida. Las diferencias no se mantuvieron en los animales a mayor edad cuyos pesos finales fueron 1815 ± 68 g para el tratamiento HO y de 1802 ± 64 g para el tratamiento LO.

Tabla 5.14. Resultados productivos de la prueba experimental O

Tratamientos	HO	LO	SEM	P
6-9 días				
CMD (g/ave)	21,58	21,19	0,23	0,053
GMD (g/ave)	18,04	17,39	0,58	0,162
IT	1,198	1,219	0,044	0,485
10-13 días				
CMD (g/ave)	38,59	37,60	0,77	0,120
GMD (g/ave)	29,18	28,73	0,90	0,502
IT	1,323	1,309	0,031	0,537
14-21 días				
CMD (g/ave)	66,31	65,01	1,16	0,165
GMD (g/ave)	46,64	47,84	1,39	0,269
IT	1,422	1,359	0,032	0,020
22-37 días				
CMD (g/ave)	104,14	103,25	4,18	0,772
GMD (g/ave)	61,53	60,59	3,18	0,689
IT	1,694	1,705	0,041	0,720
Parcial 6-21 días				
CMD (g/ave)	48,20	47,21	0,70	0,094
GMD (g/ave)	35,12	35,45	0,59	0,469
IT	1,372	1,331	0,024	0,018
Global				
CMD (g/ave)	78,57	77,62	2,48	0,610
GMD (g/ave)	49,46	49,10	1,88	0,796
IT	1,589	1,581	0,033	0,708

CMD: Consumo medio diario; GMD: Ganancia media diaria; IT: Índice de transformación; SEM: Error estándar de la media; HO: Nivel alto de productos de oxidación; LO: Nivel bajo.

La presencia de grasas oxidadas en el pienso de los animales ha recibido especial atención por parte de algunos autores (Chin Sou Fei, 1995; Hamilton y Kirstein, 2003; Robey y Shermer, 1994; Sheehy *et al.*, 1994; Sheehy *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997), quienes coinciden en indicar que el empleo de materias grasas sometidas a procesos térmicos tiene una repercusión negativa en el rendimiento productivo, de manera que aves alimentadas con dichos aceites, entre ellos

aceite de girasol oxidado, provocaron menores rendimientos productivos en comparación con las aves que consumían dietas suplementadas con aceites sin procesar. En vista de nuestros resultados, nosotros no podemos concluir un efecto negativo sobre la productividad las grasas derivado de la presencia de productos de oxidación en el pienso de los pollos en crecimiento. De hecho, como anteriormente se ha comentado, los balances de digestibilidad aparente efectuados a dos edades (Mateus, 2007) no mostraron diferencias entre tratamientos en el coeficiente de digestibilidad fecal de la materia seca, la materia orgánica o el extracto etéreo.

5.4.2. TASA DE HEMÓLISIS Y VALORES TBAR_s EN MUESTRAS DE SANGRE

Los parámetros sanguíneos tasa de hemólisis y valores TBARs, son presentados en la Figura 5.22. Las muestras de sangre procedían de los 80 pollos incluidos en esta prueba experimental y corresponden a 32 aves de la colecta realizada a 9 días de vida (16 muestras = pool de 2 aves/muestra) y 16 aves cada uno de los 13, 21 y 37 días de vida. No se observó la existencia de interacción entre las dos variables analizadas (tratamientos y edad de las aves). La aplicación de los tratamientos no generó diferencias estadísticas significativas relativas a la resistencia de la membrana de los eritrocitos. En el caso de la concentración de productos de oxidación secundaria (TBARs) tampoco se observaron diferencias entre tratamientos. Únicamente los animales de 9 días de vida que recibieron la dieta HO presentaron una ligera mayor concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico ($P < 0,05$) que los animales que recibieron la dieta con el nivel bajo (LO). Por otro lado, la tasa de hemólisis fue menor estadísticamente ($P < 0,001$) en animales que alcanzaron mayor edad (37 días de vida) que aquellos más jóvenes, demostrando el efecto de la edad sobre el estado oxidativo *in vivo*. Por el contrario, los valores TBARs, que se situaron entre 0,201 y 0,237 nmol TBARs/ml de sangre, no se diferenciaron estadísticamente con la edad a lo largo del periodo experimental.

Por tanto podemos concluir que el consumo de productos de oxidación lipídica no provocó un claro efecto sobre los parámetros sanguíneos estudiados. Un ensayo experimental previo realizados por nuestro grupo (Choque-López *et al.*, 2006) corrobora los resultados obtenidos en la tasa de hemólisis ya que el empleo de grasas oxidadas, en concreto, aceite de girasol oxidado calentado a 180 °C durante 35 horas vs aceite de girasol sin oxidar, al mismo nivel de inclusión utilizado en este experimento (6%), no provocó efecto alguno en este parámetro.

Las diferencias encontradas en la bibliografía en la tasa de hemólisis de los eritrocitos (como parámetro indicativo del estado oxidativo *in vivo* del animal) se deben al potencial oxidativo de

las grasas, relacionado con el grado de insaturación. Conforme aumenta el grado de insaturación de las materias grasas se incrementa su susceptibilidad a la oxidación. (Moriguchi *et al.*, 2001; Schiavone *et al.*, 2005) observaron un descenso en la integridad de los eritrocitos al aumentar el grado de insaturación de la grasa dietética, coincidiendo con otro de los trabajos de nuestro grupo (Choque-López *et al.*, 2005) que reveló que animales alimentados con grasa insaturada (9 % de linaza), presentaron una mayor sensibilidad a la hemólisis (39 %), que los animales alimentados con una dieta control (0 % de grasa añadida, hemólisis del 23 %) o los alimentados con grasas saturadas (9 % sebo, hemólisis del 21 %). La colecta de sangre en este experimento se realizó a 42 días de vida de las aves. Este dato también coincide con los observados en la presente prueba experimental, en la que los animales de mayor edad registran menores tasas de hemólisis.

Con relación a la concentración de TBARs, la ausencia de diferencias entre tratamientos y el hecho de que los valores registrados no sean elevados, nos induce a insistir en la idea de que los ácidos grasos insaturados (fundamentalmente poliinsaturados) tienen un mayor potencial oxidativo que los ácidos grasos oxidados, pero además sugiere el papel antioxidante de la vitamina E y su capacidad de actuar como agente protector. El mayor contenido en vitamina E de los piensos experimentales se ha observado en los aceites utilizados en este experimento, con concentraciones próximas a 500 mg/kg, en la grasa LO y a 300 mg/kg, en la grasa de la dieta HO.

El nivel de oxidación en el organismo depende fundamentalmente del equilibrio entre la presencia de sustancias susceptibles de oxidación, sobre todo ácidos grasos insaturados, y de compuestos que previenen este proceso, en concreto la disponibilidad de vitamina E. De hecho, el empleo de grasas poliinsaturadas en la dieta de los animales hace necesario el suplementar una mayor cantidad de vitamina E con la finalidad de proporcionar estabilidad oxidativa a los lípidos del organismo. Numerosos estudios han demostrado que el perfil en ácidos grasos de los depósitos del animal refleja el perfil lipídico de la dieta. Así, la incorporación de altos niveles de AGPI en la ración y, consecuentemente, en los tejidos, provocan una menor estabilidad frente a la oxidación (Cortinas *et al.*, 2005; Golapakrishna y Prabhakar, 1986; Villaverde *et al.*, 2004). Otros trabajos de nuestro grupo (Villaverde *et al.*, 2008; Villaverde *et al.*, 2004) observaron que conforme aumenta el nivel de inclusión de vitamina E disminuye la susceptibilidad a la oxidación de los tejidos. En el presente trabajo, debemos considerar que el alto nivel de antioxidantes totales (tocoferoles y tocotrienoles) mencionado con anterioridad podría haber generado un aporte de vitamina E que previniera la posible oxidación provocada por las grasas administradas.

A la vista de estos resultados y en función a la bibliografía consultada, los AG poliinsaturados sin oxidar parecen tener un mayor potencial oxidativo que AG oxidados.

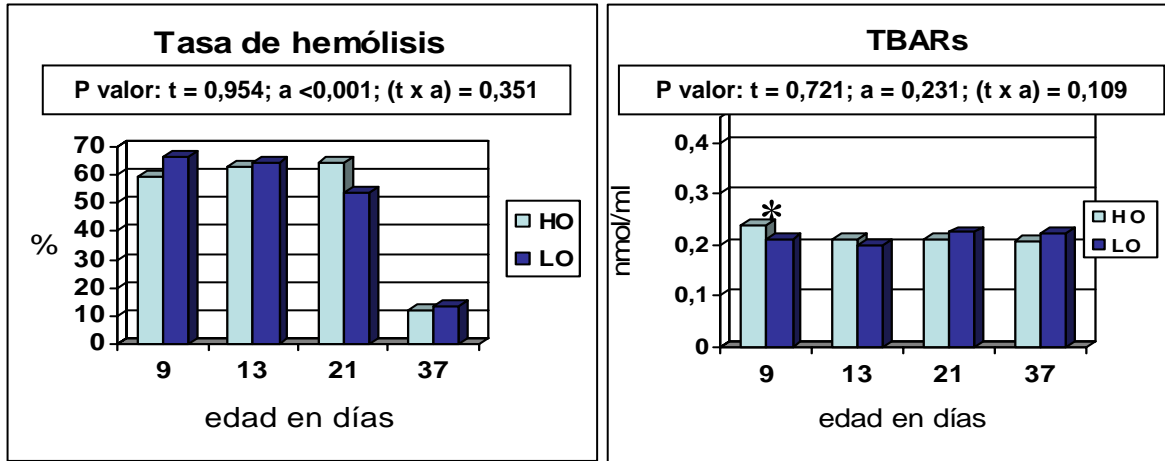


Figura 5.22. Tasa de hemólisis y Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) en muestras de sangre. t: Tratamientos; a: Edad de los animales; HO: Nivel alto de productos de oxidación lipídica; LO: Nivel bajo; Error estándar de la media (SEM) del modelo hemólisis: 13,50; SEM del modelo TBARs: 0,02; *: P<0,05 (Diferencia observada entre tratamientos experimentales)

5.4.3. MICROBIOTA GASTROINTESTINAL (contenido cecal)

A. Diversidad microbiana: t-RFLP.- El perfil microbiano de las 48 aves alimentadas con las dietas experimentales HO y LO (niveles alto y bajo de productos de oxidación, respectivamente) se presenta en la Figura 5.23. Las muestras de contenido cecal fueron colectadas en los sacrificios realizados a 9, 21 y 37 días de vida. Las distancias de separación en el dendograma corresponden al porcentaje de similitud.

El proceso de restricción dio como resultado un inusual bajo número de bandas patrón, en comparación a las anteriores pruebas experimentales, probablemente por razones metodológicas no establecidas. La mayor parte de las aves (39 de 48 aves) presentaron un porcentaje de similitud del 55 %. A su vez, la composición de la microbiota fue afectada por la edad de los animales, de modo que los animales del último sacrificio (37 días) se agruparon en un *cluster* diferente (*cluster A*, homología del 63 %). No se observaron diferencias inducidas por los tratamientos, los cuales se distribuyeron irregularmente a lo largo del dendograma.

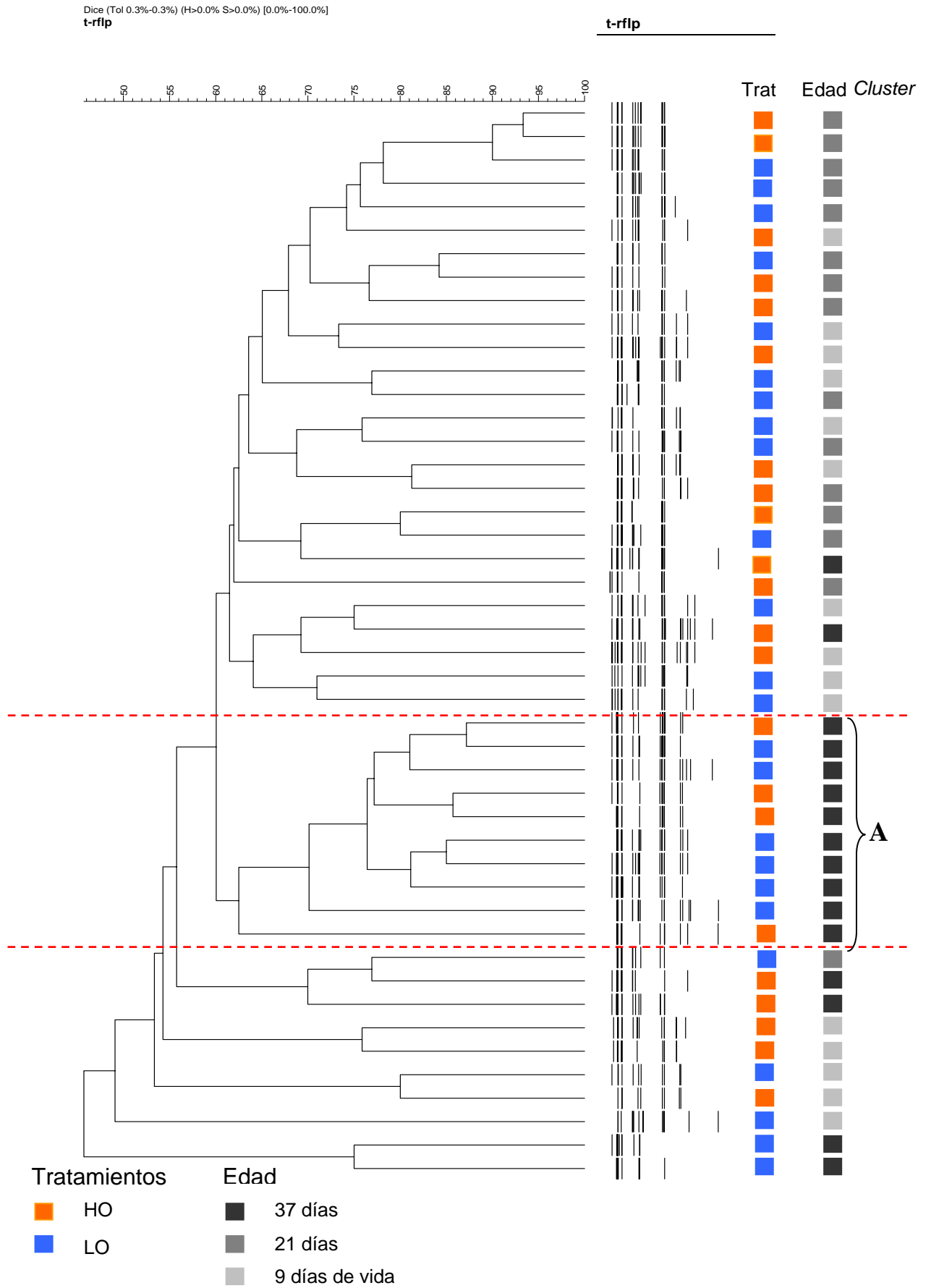


Figura 5.23. Dendrograma que presenta la similitud entre bandas patrón obtenidas por t-RFLP

El efecto observado demostró estar más relacionado con la edad de los animales que con los tratamientos aplicados. Así, la agrupación de individuos relativamente más homogénea observada el día 37 podría compararse con la flora microbiana de un animal en condiciones no experimentales, que ha alcanzado estabilidad con la edad. Al respecto, se considera que la población microbiana intestinal alcanza niveles estables entre los 21 y 40 días de vida de las aves (Barnes, 1972; Corrier *et al.*, 1992; Furuse y Yokota, 1985; Lu *et al.*, 2003; Salanitro *et al.*, 1978). En este caso, la ausencia de homogeneidad en las otras edades podría estar relacionada al periodo de colonización, proceso transitorio hasta alcanzar estabilidad a la edad indicada.

Al analizar la proporción de fragmentos terminales detectados en las muestras analizadas (Riqueza de picos, figura 5.24.), como un índice de la diversidad o complejidad del ecosistema microbiano, no se encontraron diferencias atribuibles a las dietas experimentales o la edad de las aves. Cada pico representa una bacteria o grupo de bacterias afines, en este caso, la cantidad de picos contabilizados en las muestras de contenido cecal se situó alrededor de 40 picos.

Si bien el efecto de la ingestión de grasas oxidadas no tuvo significancia estadística, las diferencias numéricas observadas entre los tratamientos (HO > LO) a 9 y 21 días de vida, se parecen al efecto descrito por otros autores (Aslan *et al.*, 1998; Chin Sou Fei, 1995; Dibner *et al.*, 1996; Gradinski-Vrbanac *et al.*, 2002), relativos a la influencia negativa que ejercen las grasas oxidadas sobre los lípidos de la membrana. Es importante señalar que existe una laguna importante en el conocimiento del efecto de los productos de oxidación sobre la población microbiana.

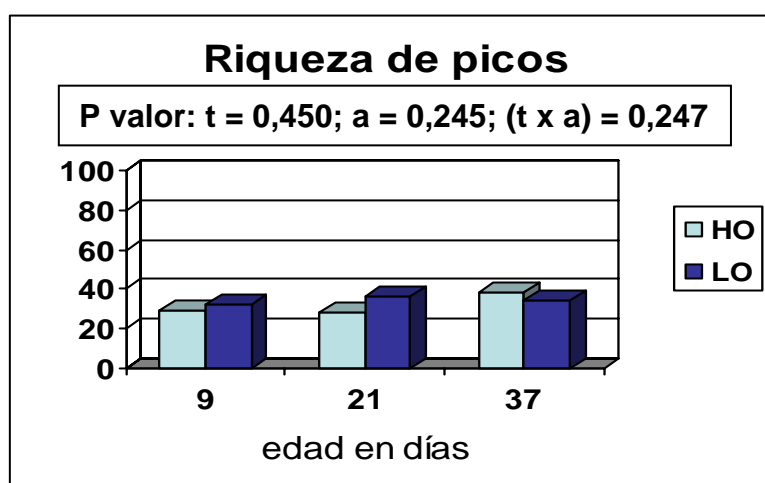


Figura 5.24. Riqueza de picos (número de picos). t: Tratamientos; a: Edad de los animales; HO: Nivel alto de los productos de oxidación lipídica; LO: Nivel bajo; SEM modelo: 9,73.

B. Actividad microbiana: Productos de fermentación.- El siguiente apartado, presenta la concentración de ácidos grasos volátiles (AGVs) de cadena corta, como productos de fermentación resultantes de la actividad microbiana, en las muestras de contenido cecal de las aves. La Figura 5.25., presenta la producción total de AGVs y la producción de ácido láctico. La producción total de AGVs no fue afectada por la dieta, no observándose diferencias estadísticas significativas tanto entre los tratamientos (HO vs. LO), como por la edad de los animales. A diferencia de la producción total, los animales alimentados con la dieta HO presentaron una relativa mayor producción de ácido láctico ($P < 0,1$) en comparación a sus homólogos LO. En general, la concentración de lactato disminuyó significativamente con la edad ($P = 0,006$).

No parece que las grasas insaturadas, que inicialmente pueden actuar como catalizadores en la reacción de oxidación, una vez oxidadas supongan un riesgo para la actividad microbiana, aun a pesar del menor contenido en antioxidantes presentes en el aceite HO. Tampoco las pequeñas diferencias en el perfil de ácidos grasos resultaron en diferencias en la producción de AGVs por parte de la microbiota cecal. Por ello, las diferencias en el contenido de ácido láctico son de difícil interpretación. En cualquier caso, estos resultados avalan la suposición de que la presencia de productos de oxidación lipídica en el alimento no constituye un serio riesgo para la microbiota.

El efecto significativo de la edad, traducido en la disminución de la producción de lactato, conforme la edad aumenta, podría estar relacionado con la proliferación de otros microorganismos que utilizan el ácido láctico como sustrato fermentativo para la producción de acético y propiónico. En condiciones no experimentales, se ha evidenciado el predominio de bacterias ácido lácticas en animales jóvenes, cuya proporción desciende con la edad para dar paso a otros microorganismos tales como *Veilonella*, *Clostridium* o *Propionobacterium*. (Bernalier *et al.*, 1999; Hume *et al.*, 1992).

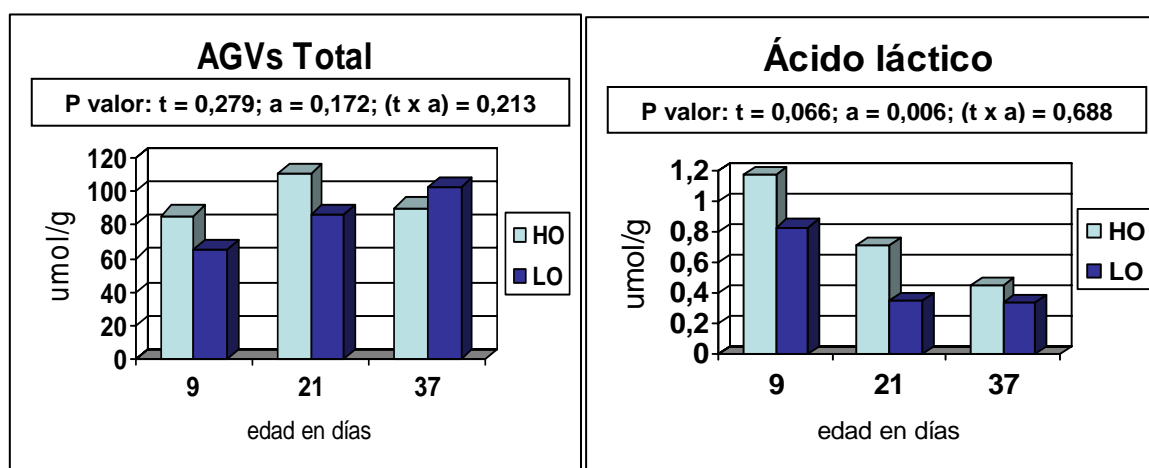


Figura 5.25. Ácidos grasos de cadena corta (SCFA) totales y concentración de ácido láctico. t: Tratamientos; a: Edad de las aves; HO: Nivel alto; LO: Nivel bajo; SEM modelo AGVs Total: 29,39; SEM modelo Ácido láctico: 0,42

El perfil de ácidos grasos volátiles de cadena corta presentado en la Tabla 5.15., muestra que el porcentaje de los ácidos, propiónico, butírico, valérico y los ácidos grasos volátiles ramificados, fue influenciado significativamente por la edad de los animales, pero no por los tratamientos. La tendencia observada en la concentración del ácido acético, que disminuye levemente con la edad ($P=0,059$), el aumento en la proporción de ácido propiónico ($P<0,001$) desde 9 % (9 días de vida) hasta casi 15 % (37 días de vida) y las proporciones fluctuantes en la concentración del ácido butírico, no proporcionan una clara evidencia del efecto de las grasas alteradas. En principio, una mayor producción de butirato como la que se observa a los 9 y 21 días de vida está asociada al mantenimiento del endotelio, como sustrato para la proliferación de células epiteliales y desarrollo de sus actividades metabólicas. Demigne *et al.* (1999) y Montagne *et al.* (2003), entre otros autores, señalan una correlación positiva entre la concentración de butírico y la proliferación de células epiteliales, acompañado de un aumento en la profundidad de criptas intestinales.

Tabla 5.15. Perfil de ácidos grasos de cadena corta

Edad (días)	9		21		37		SEM	Pt	Pa	P(t x a)
	HO	LO	HO	LO	HO	LO				
Acético %	73,1	74,9	71,5	71,1	71,1	69,5	3,62	0,976	0,059	0,540
Propiónico %	9,7	10,1	10,7	9,0	14,5	14,8	3,34	0,791	<0,001	0,654
Butírico %	14,2	11,3	15,1	17,3	10,2	12,1	3,63	0,725	0,002	0,230
Valérico %	1,8	1,9	1,7	1,6	2,1	2,0	0,30	0,757	0,014	0,764
Ramificados %	1,3	1,7	1,0	0,9	2,2	1,7	0,69	0,746	0,003	0,300

SEM: Error estándar de la media; Pt: p valor para los tratamientos; Pa: p valor para la edad; P (txa): p valor para la interacción; HO: Nivel alto de oxidación; LO: Nivel bajo.

C. Microorganismos patógenos: Presencia de coccidias en excreta.- El efecto de la incorporación de lípidos dietéticos alterados sobre la proliferación de microorganismos patógenos, en este caso de parásitos del género *Eimeria* se determinó a partir de muestras de excreta de las aves. La figura 5.26., presenta los resultados del conteo de ooquistes por gramo de excreta (OPG).

A pesar de establecer diferencias significativas entre los tratamientos experimentales (HO vs LO), en concreto, un mayor conteo de coccidias observado en las excretas de los animales alimentados con el tratamiento HO en los dos controles a 18 y 37 días de vida ($P<0,05$ en ambos casos) y la influencia significativa de la edad (aumento del número de coccidias con la edad de los animales), el conteo de coccidias de *Eimeria* no superó los niveles considerados normales en

condiciones comerciales (valores inferiores a 8 log. OPG) y que una vez superados suponen un riesgo potencial para la salud del animal.

El estadísticamente significativo menor conteo de coccidias en las muestras de los animales alimentados con la dieta LO ($P < 0,05$), en comparación a sus homólogos HO, en los muestreos realizados a ambas edades, podría estar relacionado con la menor presencia de grasas oxidadas ya que el perfil en AG de las dietas es similar.

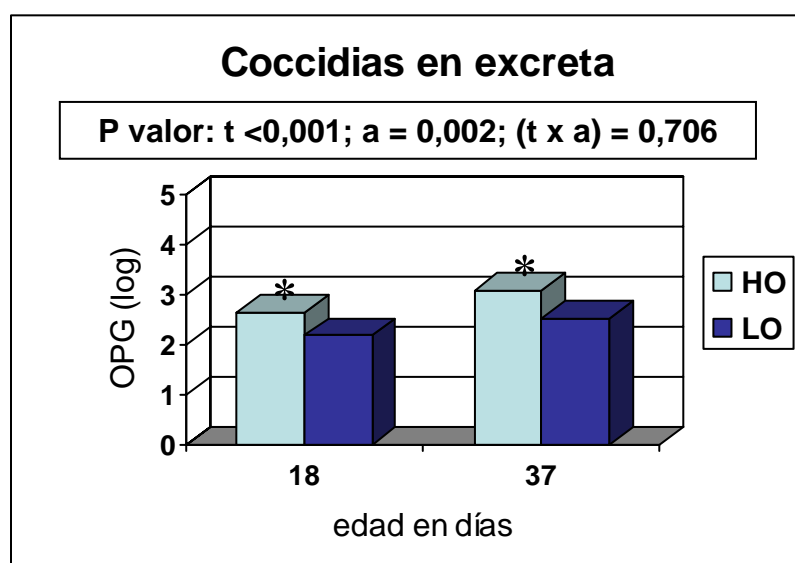


Figura 5.26. Coccidias en excreta. OPG: Ooquistes por gramo de excreta (logaritmo); HO: Nivel alto de productos de oxidación; LO: Nivel bajo; SEM modelo: 0,19; * $P < 0,05$ (Diferencias observadas entre tratamientos experimentales)

5.4.4. HISTOMORFOLOGÍA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL (secciones de yeyuno)

La influencia de las grasas añadidas en el pienso sobre la morfología del tracto gastrointestinal, en concreto sobre la longitud de las vellosidades (LV) y la profundidad de criptas (PC) del intestino aviar, se presenta en la Figura 5.27. Tanto la LV como la PC observadas en los dos tratamientos fueron prácticamente iguales, no observándose diferencias estadísticas significativas entre ellas. Por el contrario, la edad tuvo, al igual que lo observado en los experimentos anteriores, una influencia significativa ($P < 0,001$) sobre ambos parámetros. En el caso de la longitud de las vellosidades, se observó un aumento de tamaño conforme la edad avanzaba, en tanto que la profundidad de las criptas disminuyó levemente con la edad.

El incremento en la LV, acompañado de un descenso en el desarrollo de las criptas y la ausencia de lesiones en la mucosa, observada en el examen post-mortem, sugieren un desarrollo relativamente normal de las aves, tal como se observa en condiciones de explotación comercial,

con independencia de los tratamientos. Contrariamente a nuestros resultados, estudios previos demostraron que dietas con presencia de lípidos oxidados provocaron una respuesta negativa tanto en la longitud de las vellosidades (disminución de la LV) como en la profundidad de las criptas (incremento de la PC), aun a pesar de que, en algunos casos, estaban protegidas con antioxidantes añadidos a la dieta, como la vitamina E (Chin Sou Fei, 1995; Dibner, 1997; Dibner *et al.*, 1996).

Una posible diferencia entre los trabajos mencionados y los resultados observados en esta prueba experimental es la proporción de productos de oxidación presentes en la materia grasa, resultante de un diferente protocolo de oxidación, es decir, el tiempo e intensidad de calor al que fueron sometidas las grasas. En nuestro caso el aceite ya utilizado en freiduría fue sometido adicionalmente al calentamiento durante 8 horas a 165-170 °C, obteniéndose un valor de peróxidos (PV) de 1,7 meq/kg de aceite en el tratamiento HO, frente a 5,13 meq/kg de aceite en el tratamiento LO. En tanto que Dibner *et al.* (1996), por ejemplo, obtuvieron PVs de hasta 212,5 meq/kg calentando la grasa a 90 °C por un lapso de tiempo indeterminado, presumiblemente más corto que el nuestro. Bajo estas condiciones, los animales respondieron desfavorablemente, incrementando el intercambio celular (mayor actividad cripta-vellosidades), además de presentar bajos índices productivos. Una menor proporción de productos de oxidación, en concreto peróxidos, en las grasas empleadas en nuestro experimento, es reflejo de un mayor grado de oxidación de las grasas a efecto de un mayor tiempo e intensidad de calor. Los peróxidos son productos de oxidación primaria y su concentración disminuye conforme aumenta o prosigue el proceso de autooxidación, dando lugar a la formación de otros compuestos, denominados compuestos de oxidación secundaria como el MDA.

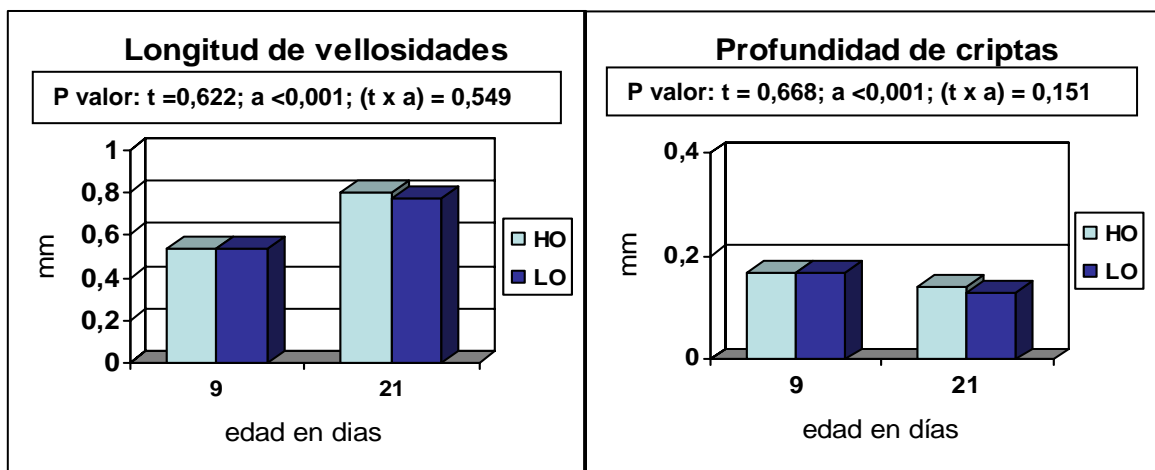


Figura 5.27. Longitud de vellosidades y profundidad de criptas. t: Tratamientos; a: edad; HO: Nivel alto; LO: Nivel bajo; SEM modelo longitud: 0,10; SEM modelo profundidad: 0,02

Tal como puede apreciarse en la Tabla 5.16., la respuesta inmune medida por la presencia de linfocitos intraepiteliales (IEL) fue similar entre ambos tratamientos durante los períodos estudiados. Por tanto, no hubo diferencias derivadas del grado de oxidación de la grasa dietética. Por otra parte, el número de linfocitos que migraron hacia las vellosidades disminuyó con la edad de manera significativa ($P < 0,001$). La reducción en el conteo de linfocitos con la edad, se debe probablemente a una respuesta fisiológicamente normal, que implica el descenso de la respuesta inmune ante la ausencia de un estímulo externo.

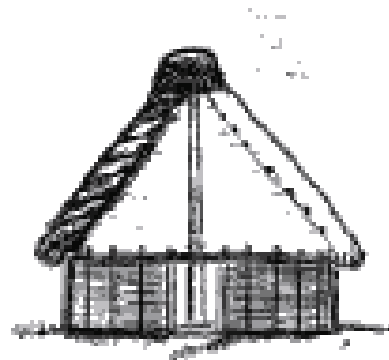
Acercas del efecto de la grasa oxidada sobre parámetros inmunológicos, Girotti (1998) indica que la presencia de productos de oxidación, entre ellos hidroperóxidos, puede inducir a una apoptosis (renovación fisiológica de células mediada por fagocitosis, que implica la muerte celular sin la presencia de una respuesta inflamatoria) no programada. Esto conlleva, entre otras cosas, un aumento en el número de leucocitos (células de la serie blanca entre las que se encuentran los linfocitos), principalmente neutrófilos. Sin embargo, no está establecido que las grasas oxidadas actúen directamente sobre la proliferación de los linfocitos presentes en la mucosa intestinal.

Tabla 5.16. Numero de linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos

Edad (días)	9		21		Pt	Pa	P(t x a)
	HO	LO	HO	LO			
IEL	26,41	26,98	20,76	20,21	0,997	<0,001	0,695

Pt: p valor tratamientos; Pa: p valor edad; P (txa): p valor interacción; HO: Nivel alto; LO: Nivel bajo; IEL: Linfocitos intraepiteliales; SEM modelo estadístico: 3,98

6. ANALISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS E IMPLICACIONES



En este capítulo se aborda la comparación de los resultados obtenidos en las cuatro pruebas experimentales con el empleo de dos niveles, alto y bajo, de AG *trans* (experimento T), dioxinas y PCBs (experimento D), HAPs (experimento P) y productos de oxidación lipídica (experimento O), presentes en las materias grasas recicladas objeto de estudio.

Las dietas experimentales se prepararon a partir de una mezcla base (maíz y soja) con un nivel de inclusión de las materias grasas del 6 %. La composición nutricional de los piensos experimentales fue similar en todos los ensayos (Tabla 4.4., Material y métodos), aunque los contenidos de energía bruta (EB) y de proteína bruta (PB) de los experimentos D y P fueron ligeramente superiores en comparación a los experimentos T y O. Por otra parte, las grasas empleadas eran diferentes en los distintos ensayos. Así, las grasas de las pruebas D, P y O, presentaron en general un mayor contenido de ácidos grasos insaturados (AGI), principalmente de las series n-3, n-9 y n-6 (aceites de pescado, de oliva y girasol/oliva, respectivamente) que las grasas de las pruebas T que fueron predominantemente saturadas (aceite de palma).

De manera general, el análisis de la interacción entre las variables, tratamiento y edad de los animales, no presentó una interacción significativa, motivo por el cual, ambas se trataron independientemente. El hecho de que los tratamientos no generaran diferencias de significación estadística, en casi todas las determinaciones realizadas, permite incluir un análisis de la comparación entre experimentos y su posible interacción con la edad de los animales, aún a pesar de las posibles diferencias derivadas de las condiciones ambientales que, en cierta medida, se han tenido en cuenta en la discusión conjunta de los resultados.

6.1. RENDIMIENTOS PRODUCTIVOS E INCIDENCIAS OBSERVADAS DURANTE EL PERÍODO EXPERIMENTAL

Un factor común entre las cuatro pruebas experimentales fue la ausencia de incidencias y mortalidad de las aves. De igual manera, no se observaron lesiones patológicas en los exámenes *post-mortem*, que permitan suponer un efecto negativo como consecuencia de los contaminantes o productos de alteración a los que fueron expuestos.

La productividad de los animales no fue afectada por los tratamientos experimentales, excepto en el caso de la primera prueba experimental (AG *trans*), en la que los animales alimentados con la dieta que contenía el nivel de alteración bajo (LT), presentaron un mejor índice de transformación (IT), que los animales alimentados con la dieta HT (Tabla 5.2.). El análisis de la calidad de estas grasas reveló una elevada proporción de AGS en la dieta HT, motivo por el cual no es posible suponer que el efecto observado esté relacionado únicamente con un efecto directo del nivel de AGT de la dieta experimental.

La Tabla 6.1., presenta el resumen de los resultados obtenidos del análisis de la productividad de los animales, en las cuatro pruebas experimentales. Las ganancias de peso (GMD) de las pruebas experimentales D y P, superiores ($P=0,022$) a las obtenidas en las pruebas T y O, explican las diferencias estadísticas significativas ($P=0,025$), observadas en el peso vivo final de los animales, superiores (próximos a 1900 g) en los experimentos D y P, que los observados en los experimentos T y O (próximos a 1800 g). En el experimento O se registraron consumos inferiores, en gran medida la época del año pudo afectar la ingestión, ya que éste último experimento se realizó entre mediados de mayo y junio, registrándose temperaturas ambientales de 26-30 °C como máximas y de 20-24 °C como mínimas en la granja experimental de la UAB, donde se desarrollaron los ensayos experimentales. Normalmente, la temperaturas ambiente recomendada a partir de la cuarta semana de vida, oscila entre 19 y 23 °C. Las diferencias en el IT fueron evidentes en el experimento T, en el que los animales presentaron peores índices de transformación en comparación a las otras pruebas experimentales. Aunque existen numerosas referencias bibliográficas, acerca de la menor digestibilidad de las grasas saturadas vs las insaturadas (Blanch *et al.*, 2000; Blanch *et al.*, 1995; Zumbado *et al.*, 1999), lamentablemente no disponemos de la determinación de los coeficientes de digestibilidad aparente en este experimento, que ayude a explicar las diferencias observadas.

Tabla 6.1. Resumen de resultados productivos de las cuatro pruebas experimentales

Exp.*	1(T)		2(D)		3(P)		4(O)		SEM	P		
	H	L	H	L	H	L	H	L		EXP	TRAT	E x T
CMD	85,92 ^a	85,08 ^a	80,79 ^{bc}	81,28 ^{bc}	81,50 ^b	82,85 ^b	78,57 ^c	77,62 ^c	2,06	<0,001	0,985	0,640
GMD	48,26 ^b	49,53 ^b	50,55 ^a	51,46 ^a	52,14 ^a	52,66 ^a	49,46 ^b	49,10 ^b	2,33	0,022	0,483	0,908
IT	1,780 ^a	1,718 ^a	1,599 ^b	1,580 ^b	1,569 ^b	1,580 ^b	1,589 ^b	1,581 ^b	0,06	<0,001	0,371	0,667
Pi (g)	88,93 ^a	89,23 ^a	83,77 ^b	83,52 ^b	76,89 ^c	76,91 ^c	83,67 ^b	83,95 ^b	0,43	<0,001	0,574	0,569
Pf (g)	1778 ^c	1823 ^c	1872 ^b	1904 ^b	1901 ^a	1919 ^a	1815 ^c	1802 ^c	81,52	0,025	0,485	0,907

* 1: AG *trans*; 2: Diox PCBs; 3: HAPs; 4: Oxidación; CMD: Consumo medio diario (g/ave); GMD: Ganancia media diaria (g/ave); IT: índice de transformación (g/g); Pi: Peso inicial; Pf: Peso final; SEM: Error estándar de la media; EXP: Experimentos; Trat: Tratamientos; E x T: Interacción; Exp x Trat; H: Nivel de concentración alto del alterado o contaminante; L: Nivel bajo; a, b, c: diferentes estadísticamente ($P<0,05$).

6.2. TASA DE HEMOLISIS Y VALORES TBARS

Ni la resistencia de la membrana de los eritrocitos (tasa de hemólisis) ni la presencia de productos secundarios de oxidación (TBARs), estuvieron bajo la influencia del tratamiento. Es decir, el efecto generado por la presencia de contaminantes o productos de alteración, en general, no fue estadísticamente significativo, salvo en el caso del experimento 1, en el que un mayor grado de saturación de la grasa (tratamiento HT), se tradujo en una mayor fragilidad de la membrana. En apartados anteriores hemos establecido que las características físico-químicas de las grasas *trans*, les confieren propiedades similares a los AGS (Barrera-Arellano y Block, 1993; Koletzko y Decsi, 1997; Nelson y Cox, 2001). Además, hay evidencia que sugiere que el tipo de grasa, en función al grado de saturación y su nivel de oxidación, afecta tanto a la resistencia de la membrana como a la susceptibilidad a la oxidación del eritrocito (Moriguchi *et al.*, 2001; Schiavone *et al.*, 2005). Por lo que es difícil distinguir si los efectos observados son atribuibles a las grasas *trans* o al grado de saturación de las grasas empleadas.

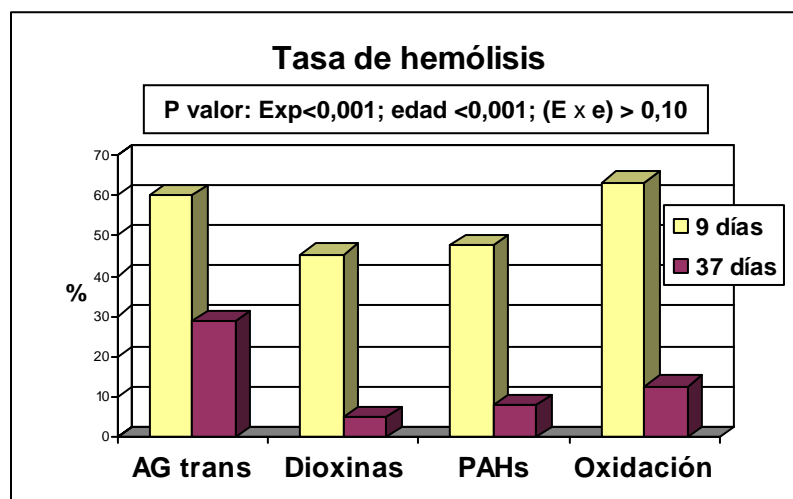


Figura 6.1. Tasa de hemólisis. Exp: Experimentos; E x e: Interacción experimento y edad; SEM modelo: 14,31

La Figura 6.1., presenta la comparación de los experimentos a dos diferentes edades, al inicio y al final del período experimental. El efecto de la edad, se tradujo en diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$), entre animales jóvenes (9 días) y animales de mayor edad (37 días de vida). A medida que el animal crece aumenta la resistencia de los eritrocitos y la integridad de la membrana mejora. Este hecho fue notorio en los experimentos D, P y O, en los que partiendo de elevadas tasas de hemólisis a 9 días de vida (entre 45 y 65 %) se alcanzaron bajas tasas de hemólisis a 37 días de vida (entre 5 y 15 %). En el experimento T, también se observó una mejora de la integridad de la membrana con la edad, aunque de menor magnitud (de 60 % a 28

%). Como ya se ha puntualizado, el contenido de AGS de estas dietas podría ser el responsable de esta menor respuesta.

Las gráficas relativas a los niveles de oxidación en sangre en las diferentes edades estudiadas (9, 13, 21 y 37 días), se muestran en los apartados correspondientes a cada ensayo. Cabe destacar que, al comparar los resultados obtenidos con el empleo de las diferentes grasas recicladas en la dieta, los valores de TBARs observados en las pruebas experimentales T, O y P, no siguen un patrón de comportamiento acumulativo como el observado en la exposición a grasas contaminadas con dioxinas y PCBs. No se encontraron reportes acerca del efecto acumulativo de grasas alteradas, pero sí de la acumulación y biomagnificación de grasas contaminadas. En general los niveles de concentración TBARs fueron claramente superiores en la prueba experimental D (dioxinas y PCBs), en la que los niveles observados probablemente responden al empleo de aceites de pescado (mayor poliinsaturación y potencial de oxidación).

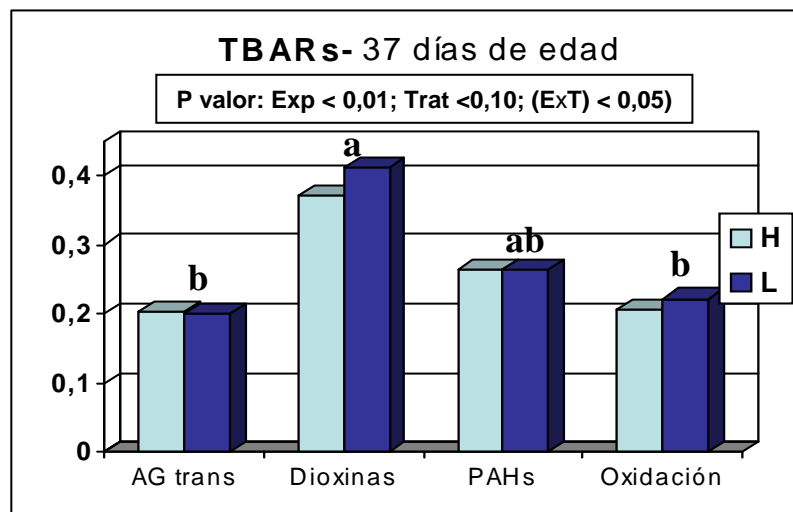


Figura 6.2. Valores TBARs en muestras de sangre (expresado en nmol/ml de sangre). Exp: Experimentos; Trat: Tratamientos; E x T: Interacción experimento x tratamiento, H: Nivel alto; L: Nivel bajo; SEM: 0,04^{a,b}(experimentos): letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre experimentos (P<0,05)

Así, el análisis realizado al final del periodo experimental a los 37 días de vida (Figura 6.2.), permitió establecer diferencias estadísticamente significativas entre los experimentos (P<0,01). En el experimento D (dioxinas y PCBs) los productos secundarios de oxidación sobrepasaron los 0,400 nmol TBARs/ml, en contraste con los experimentos T, P y O que mostraron valores próximos a 0,220 nmol TBARs/ml de sangre. Este valor concuerda con anteriores resultados obtenidos por nuestro equipo de trabajo (Choque-López *et al.*, 2005), cuando se utilizaron piensos sin grasa añadida o bien suplementadas con aceite de girasol sin oxidar u oxidado por calentamiento. Las muestras de sangre de los animales utilizados, presentaron concentraciones

próximas a 0,200 nmol TBARs/ml tanto en las dietas control como en las dietas que contenían el aceite de girasol. A falta de referencias bibliográficas, esta concentración de TBARs es la que se puede considerar como fisiológicamente normal en animales sin exposición a un alto potencial oxidativo, como el provocado en el experimento D.

6.3. MICROBIOTA GASTROINTESTINAL

El estudio de la microbiota presente en el tracto digestivo de los animales se centró en muestras de contenido cecal debido a que el ciego representa una sección idónea en la que es posible coleccionar una suficiente cantidad de muestra (las otras secciones presentan generalmente menos cantidad de contenido intestinal) y con una mayor facilidad. Los parásitos del género *Eimeria* se estudiaron en muestras de excreta, en la que es posible encontrar una mayor concentración de ooquistes. La eliminación de los parásitos por esta vía constituye un factor importante en la epidemiología de la coccidiosis.

A. Diversidad microbiana: t-RFLP.- La evaluación de los dendogramas obtenidos en los cuatro experimentos demostró que la composición de la flora microbiana no fue influenciada por los tratamientos experimentales. Por el contrario, los microorganismos o grupos de microorganismos presentes en cada muestra mostraron porcentajes de homología relativamente elevados entre animales de la misma edad (esto fue más notorio a los 37 días de vida). Así, el número de fragmentos terminales, expresado en pares de bases (bp) obtenidos por la restricción enzimática (t-RFLP), fue similar entre las diferentes muestras de contenido cecal (entre individuos) y a medida en que la edad aumentaba, el número de fragmentos también lo hacía. La figura 6.3. presenta tal desarrollo, tomando como ejemplo las muestras de contenido cecal de los pollos del experimento P (HAPs), en el que se observó la mayor biodiversidad y, como en los otros experimentos, la ausencia de efecto tratamiento. El análisis de la biodiversidad cecal (de acuerdo al tamaño de los fragmentos terminales expresado en pares de bases) presenta la distribución de los 48 pollos utilizados en este experimento, divididos en 3 grupos de acuerdo a la edad, del 1 al 16 corresponden a pollos de 9 días de vida, del 17 al 32 a pollos de 21 días de vida y del 33 al 48 a pollos de 37 días de vida. La restricción enzimática se realizó con el enzima de restricción HhaI. Los diferentes microorganismos o grupos de microorganismos se presentan asociados en secciones (intervalos de amplitud variable, según el tamaño en pares de bases), que van desde la A hasta la K, siguiendo un orden ascendente a medida que los grupos aumentan de tamaño.

Análisis Global de los Resultados e Implicaciones

Como pueden apreciarse en los segmentos E y F, algunos de los animales de 21 días de vida (animales del 17 al 32) manifestaron la aparición de bacterias o grupos de bacterias que no estaban habitualmente presentes o que tenían una baja proporción a los 9 días de vida (animales del 1 al 16), manteniéndose a los 37 días (animales del 33 al 48). Estas bacterias podrían corresponder a *Escherichia coli* y *Eubacterium*.

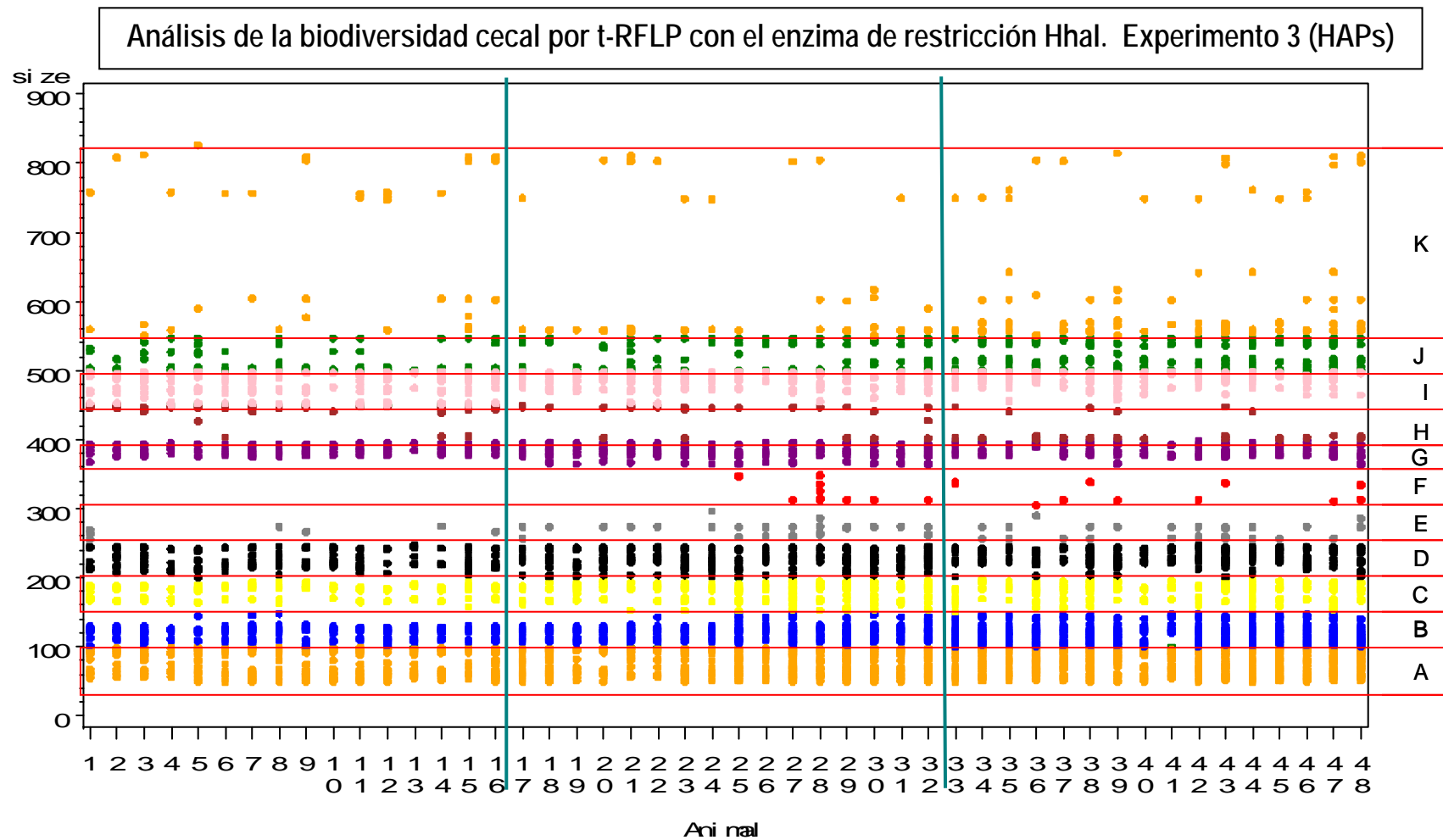


Figura 6.3. Fragmentos terminales obtenidos tras la restricción enzimática (enzima HhaI) de muestras de contenido cecal a 9 (animales del 1 al 16), 21 (animales del 17 al 32) y 37 (animales del 33 al 48) días de vida de los pollos del experimento 3 (HAPs): Análisis de los fragmentos obtenidos y comparación con la restricción teórica de las muestras procesadas con la herramienta TAP-RFLP del software Ribosomal Database II Project. Size: Tamaño en pares de bases (bp); A: 70-109 bp = *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Bacteriodes*, *Flavobacterium sp.*, *Campylobacter sp.*; B: 109-140 bp = NE (no establecido); C: 140-200 bp = *Fibrobacter succinogenes* (140-147 bp), *Clostridium clostridiforme* (184-194 bp), *Ruminococcus*, *Eubacterium*; D: 200-260 bp = *Fusobacterium sp.* (201 bp), *Lactobacillus delbrueckii* (223-225 bp), *Mycoplasma*; E: 260-310 bp = NE; F: 310-380 bp = *Escherichia coli* (371-377 bp), *Eubacterium*; G: 380-400 bp = *Lactobacillus aviarius* (385-394); H: 400-450 bp = NE; I: 450-500 bp = *Streptomyces* (466-474 bp); J: 500-560 bp = *Clostridium butyricum* (546-557 bp); K: >560 bp = NE.

Con relación a la proporción de microorganismos, la restricción enzimática muestra una mayor abundancia para aquellos fragmentos comprendidos entre 70 y 260 bp (segmentos A, B, C y D); dichos fragmentos estaban presentes en todos los animales independientemente del tratamiento y edad estudiados e incluyen especies o grupos bacterianos considerados como grupos mayoritarios (entre las que se encuentran *Bacteroides* y *Flavobacterium*). Además puede observarse, en general, una mayor abundancia de fragmentos en las muestras correspondientes a 21 y 37 días de vida, intervalo de edad en la cual la flora microbiana ya presenta una mayor estabilidad, según se ha discutido en apartados anteriores.

La comparación entre los fragmentos obtenidos tras la restricción enzimática (restricción real), con los fragmentos calculados con el programa TAP-RFLP del software Ribosomal Database II Project (restricción *In silico*), propuesto por Cole *et al.* (2003), que se presenta en la Figura 6.3., permitió hacer una estimación de los microorganismos presentes en las muestras analizadas. Muchos de estos microorganismos concuerdan con los descritos por otros autores como flora habitual del pollo (Tabla 6.2.). La bibliografía encontrada presenta los resultados del empleo de distintas técnicas analíticas, entre las que se incluye la t-RFLP, y describe un mayor número de microorganismos que en este estudio, basándose en la obtención de mayores tamaños de fragmentos, algunos superiores a 1119 bp. En nuestro caso, las bacterias compatibles identificadas a partir de la restricción teórica (*In silico*) alcanzaron los 560 bp, no lográndose identificar más grupos bacterianos por encima de esta cifra. Siendo las causas metodológicas la explicación más probable (cuando en un gel de electroforesis entran muchos fragmentos cortos la detección de los fragmentos más largos se hace más difícil), estas diferencias también pueden ser atribuibles a las diferentes condiciones ambientales, a las diferentes dietas de estudio o a la diferente edad de los animales entre los trabajos referenciados. Además, se debe mencionar que la asignación de los fragmentos encontrados con dichos grupos bacterianos (Figura 6.3.) es meramente especulativa, y deben entenderse como bacterias potencialmente compatibles teniendo en cuenta la descripción de la microbiota habitual realizada por otros autores.

Tabla 6.2. Descripción de las especies microbianas identificadas como microbiota habitual del pollo, por otros autores. Simulación computacional de los fragmentos 5' esperados tras restricción enzimática con el enzima HhaI.

Microorganismo identificado	Técnica de análisis utilizada	Fragmento 5' calculado* (Pares de bases, bp)	Referencia
<i>Ochrobactrum anthropi</i> <i>Peptostreptococcus spp.</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación)	61	(Lu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Flavobacterium ferrugineum</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación)	67	(Lu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Bacteroides spp.</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación), FISH, cultivos tradicionales	95-104	(Lu <i>et al.</i> , 2003; Salanitro <i>et al.</i> , 1978; Zhu y Joerger, 2003)
<i>Fusobacterium sp.</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación),	199-212	(Lu <i>et al.</i> , 2003; Salanitro <i>et al.</i> , 1978)

Análisis Global de los Resultados e Implicaciones

	cultivos tradicionales		
<i>Enterococcus cecorum</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación)	218	(Gong <i>et al.</i> , 2002; Lu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Enterococcus faecium</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación)	220	(Lu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación)	223	(Lu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Clostridium perfringens</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación)	233	(Lu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación)	254	(Lu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Escherichia coli</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación), diseño de sondas, cultivos tradicionales	371-373	(Amit-Romach <i>et al.</i> , 2004; Gong <i>et al.</i> , 2002; Lu <i>et al.</i> , 2003; Salanitro <i>et al.</i> , 1978)
<i>Eubacterium desmolans</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación), cultivos tradicionales	377	(Gong <i>et al.</i> , 2002; Lu <i>et al.</i> , 2003; Salanitro <i>et al.</i> , 1978)
<i>Lactobacillus aviarius subsp. aviarius</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación), TRFLP	394	(Lu <i>et al.</i> , 2003; Ngoc Lan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación), TRFLP	407	(Lu <i>et al.</i> , 2003; Ngoc Lan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación)	567 ^a	(Lu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Alcaligenes spp.</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación)	67, 580, 852	(Lu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación), TRFLP	597	(Lu <i>et al.</i> , 2003; Ngoc Lan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Weissella spp.</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación)	609-610	(Lu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Fusobacterium prausnitzii</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación)	670 ^b	(Gong <i>et al.</i> , 2002)
<i>Ruminococcus spp.</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación)	1074, 189	(Gong <i>et al.</i> , 2002; Lu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Clostridium oroticum</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación y secuenciación), cultivos tradicionales	1087	(Lu <i>et al.</i> , 2003; Salanitro <i>et al.</i> , 1978)
<i>Lactobacillus spp.</i>	FISH, TRFLP	1119	(Amit-Romach <i>et al.</i> , 2004; Ngoc Lan <i>et al.</i> , 2004; Zhu y Joerger, 2003)
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación), cultivos tradicionales		(Gong <i>et al.</i> , 2002; Salanitro <i>et al.</i> , 1978)
<i>Holdemania filiformis</i>	Análisis del 16S rRNA (clonación)		(Gong <i>et al.</i> , 2002)

* Los resultados se obtuvieron con la herramienta TAP-RFLP del software Ribosomal Database II Project.

^a y ^b El fragmento se calculó manualmente con la secuencia de la bacteria publicada en el GeneBank

Paralelamente, las muestras fueron procesadas con otra enzima de restricción, la RsaI, con la finalidad de ayudarnos a identificar más grupos bacterianos. La Figura 6.4., presenta el análisis de la biodiversidad de las mismas 48 muestras de contenido cecal de los pollos del experimento P (HAPs) analizadas en la Figura 6.3. La asignación de individuos por edades es similar a la anterior figura (3 edades: 9, 21 y 37 días de vida), así como la agrupación en secciones (de A a K) según el tamaño en pares de bases.

En general, la mayor presencia de grupos microbianos se observó a partir de los 400 bp, hasta los 921 bp. Al igual que los resultados de la restricción con el enzima HhaI, la biodiversidad aumenta con la edad, observándose una relativa mayor abundancia de especies (diversidad entendida como número de fragmentos) a partir de la mitad de la distribución (animales del 17 al 32, de 21 días de vida), hasta estabilizarse en los animales del tercer grupo (aves de la 33 a la 48, de 37 días de vida). Por otro lado, se observa un menor número de fragmentos entre los microorganismos de < 109 a 140 bp (secciones A y B), al contrario de lo observado con el empleo del enzima HhaI, cuando en estas secciones estaban incluidos los microorganismos considerados mayoritarios en las aves, como es el caso de los generos Flexibacter y Bacteroides. No obstante, estos microorganismos se situaron en otras secciones (D e I, respectivamente). Cada enzima realiza el corte en un punto diferente alejado del extremo 5', por lo que existe poca probabilidad de que un mismo fragmento corresponda a diferentes bacterias. El hecho de que se observara un mayor número de microorganismos con mayores tamaños de bp y que sea posible estimar algunos microorganismos que no fueron identificados con el anterior enzima (p.e *Lactobacillus reuteri*, *Ochrobactrum anthropi* ó *Flavobacterium ferrugineum*) hace posible concluir que la restricción realizada con el enzima RsaI, podría servir de complemento a los resultados obtenidos con el enzima HhaI, en el estudio de un mayor espectro de bacterias presentes en las muestras analizadas. Los resultados no son, por tanto, excluyentes, sino complementarios.

La Tabla 6.3., resume la diversidad microbiana (riqueza de picos) establecida en las muestras de contenido cecal a diferentes edades (9, 21 y 37 días de vida), en las cuatro pruebas experimentales. Ni la interacción entre variables (edad x tratamiento), ni la presencia de niveles alto y bajo de contaminantes o productos de alteración provocaron diferencias de significación estadística. No obstante, se observó un aumento estadísticamente significativo ($P < 0,001$), en el número de picos conforme aumentaba la edad, en los experimentos D y P este incremento es el esperado en animales en crecimiento en los que la microbiota sigue un proceso de desarrollo. Por el contrario, en los experimentos T y O no se observaron diferencias con la edad. Si bien podría especularse que la diferencia entre la riqueza de picos de las pruebas experimentales en las que se emplearon grasas contaminadas, de las que se emplearon grasas alteradas, pudiera estar relacionada con las diferencias encontradas en la composición nutritiva de los piensos experimentales, y más concretamente con el contenido en proteína bruta (PB) de las dietas (Tabla 4.4. del apartado 4.6.1., material y métodos) que resultó superior en los piensos experimentales D y P (próximas a 22 % de PB) respecto al pienso de las pruebas T y O (19 % de PB), lo más probable es que las diferencias observadas estén relacionadas con problemas metodológicos, ya que las muestras de cada experimento se procesaron en diferentes placas, por lo que no es factible comparar los resultados entre dichos experimentos. La restricción

enzimática de la cual se obtuvieron estos datos se realizó con la ayuda de la enzima de restricción HhaI.

Tabla 6.3. Riqueza (número) de picos de las cuatro pruebas experimentales, obtenidas tras la restricción enzimática con el enzima Hha I (t-RFLP)

Experim	9		21		37		SEM	Pt	Pe	P (t x e)
	H	L	H	L	H	L				
Trans (T)	34,25	39,38	32,28	36,87	36,12	34,75	6,31	0,139	0,613	0,285
Dioxinas (D)	28,86	35,00	68,88	66,88	69,88	71,86	7,46	0,366	<0,001	0,340
PAHs (P)	55,50	56,75	75,00	66,38	89,25	84,62	10,61	0,197	<0,001	0,424
Oxidación(O)	29,71	31,88	28,57	36,75	38,50	34,75	9,73	0,450	0,245	0,247

9, 21 y 37: Días de vida de las aves; SEM: Error estándar de la media; Pt: P valor de los tratamientos; Pe: P valor edades; P (t x e): Interacción entre las variables tratamiento y edad; H: Nivel alto; L: Nivel bajo

A pesar de que el efecto edad no pudo ser detectado analizando el número de fragmentos presentes en los electroferogramas en los experimentos T y O, los dendogramas permitieron agrupar por similitud los animales de 9 y 37 días de vida, indicando una mayor homología entre dichos animales diferenciándose incluso en un *cluster* separado al del resto de animales.

B. Actividad microbiana: Productos de fermentación.- La producción y absorción de ácidos grasos volátiles representa un aporte de nutrientes modesto para el animal pero, como se ha comentado, tiene implicaciones destacadas en la modulación de las poblaciones microbianas y el metabolismo local de la mucosa intestinal. El butírico se considera el principal sustrato energético de los enterocitos y presenta efectos beneficiosos sobre la mucosa intestinal lesionada (Topping y Clifton, 2001). La concentración total de AGVs en las muestras de contenido cecal de los cuatro experimentos no fue afectada por los tratamientos, no observándose diferencias significativas provocadas por los productos de alteración o los contaminantes estudiados. De manera general, la concentración total no superó los 90 $\mu\text{mol/g}$ de muestra analizada y el segundo experimento (D) presentó concentraciones próximas a 50 $\mu\text{mol/g}$. El sustrato alimenticio parece estar relacionado con la diferente producción de AGVs en el TGI y valores de 50 a 200 $\mu\text{mol/g}$, han sido registrados en muestras de contenido cecal de pollos alimentados con distintos niveles de polisacáridos no amiláceos (PNA) que llevaron a contenidos en FD en pienso muy variables, de entre 18 y 37% (Jorgensen *et al.*, 1996; Józefiak *et al.*, 2004; Montagne *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2001). Hay que recordar que los sustratos mayoritariamente utilizados por la microbiota intestinal son los componentes no absorbidos, principalmente carbohidratos (almidón resistente, algunos azúcares libres no absorbidos y los PNA).

Nuestras dietas fueron concebidas con la finalidad de determinar si las materias grasas alteradas o contaminadas ejercen algún efecto sobre la dinámica poblacional de la microbiota cecal. No se dispone de información bibliográfica acerca del efecto de las materias grasas sobre la actividad microbiana, ni si las materias grasas utilizadas constituyen un sustrato idóneo o no para el desarrollo de los microorganismos o si modifican el tiempo de tránsito digestivo, factor determinante en el patrón de los AGV. La menor producción de AGVs observada en el segundo experimento (D) podría estar relacionada con la composición y calidad de las materias grasas ya que éstas eran predominantemente poliinsaturadas. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes ya que la disminución de la producción de AGVs no se acompañó del cambio en las especies bacterianas mayoritarias. El perfil microbiano obtenido por t-RFLP no nos ayuda a interpretar estos resultados. Es preciso recordar que las técnicas de “fingerprinting” basadas en la PCR solamente toman en cuenta los grupos microbianos que representan más del 1 % de la población total, sin considerar a los grupos minoritarios que podrían tener impacto sobre la cuantificación del metabolismo y la actividad fermentativa del ecosistema global.

A pesar de las ligeras diferencias observadas entre los 4 experimentos, la relación acético: propiónico: butirico fue bastante similar, situándose entre 70 y 74 % para el caso del ácido acético, 9 y 12 % para el ácido propiónico y 12 a 14 % para el ácido butirico. En general, la relación acético > propiónico < butirico fue constante entre las 4 pruebas experimentales, hecho que respalda la conclusión del poco efecto del nivel de contaminación o alteración estudiados. Dicha relación es semejante a la que podría esperarse en condiciones de crianza no experimentales en aves alimentadas con piensos comerciales (van der Wielen *et al.*, 2000).

A parte de los AGVs mayoritarios, se encuentran en menor cantidad otros ácidos orgánicos como el lactato. El contenido en ácido láctico de las muestras cecales fue muy variable en los distintos experimentos y muestras analizadas. Esto no es de extrañar si tenemos en cuenta que el lactato puede considerarse como un compuesto intermediario, ya que recientemente se ha sugerido su papel como un precursor en la síntesis de butirato (Bourriaud *et al.*, 2005) y, por tanto, su concentración fluctúa a la vez que lo hace la concentración de este último. Observando conjuntamente los cuatro experimentos, vemos que la concentración de lactato fue influenciada significativamente por los tratamientos en los experimentos D y O, no observándose diferencias estadísticas significativas en los otros dos experimentos (T y P). Las diferencias observadas en los experimentos D y O se orientaron hacia una menor producción de ácido láctico en el tratamiento con el nivel bajo (L) que el alto (H). Como ya se había mencionado, en el caso del experimento D, el aceite empleado en el tratamiento LD presentaba una alta concentración de TBARs. El descenso en la producción de lactato como consecuencia de la ingestión de grasas altamente reactivas fue descrito por Chin Sou Fei (1995) y está relacionado con la deficiente

respuesta de las bacterias ácido lácticas frente a estrés oxidativo (inadecuada respuesta del antioxidante superóxido dismutasa). Pero en el caso del experimento O fue en las muestras cecales del tratamiento LO y, no del HO, donde se observó la menor concentración de ácido láctico, por lo que, una vez más parece más el potencial oxidativo de la digesta que no la presencia de grasas oxidadas lo que condiciona la respuesta.

Por otro lado, el significativo descenso en la concentración de lactato conforme la edad avanzaba, observado en los experimentos T y O, corresponde a la evolución esperada en condiciones de crianza comercial. Conforme la edad avanza, la proporción de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Streptococcus*) desciende, para dar lugar a la colonización de otros grupos bacterianos como *Veionella*, *Clostridium* o *Propionobacterium* entendiéndose como un proceso de maduración (Bernalier *et al.*, 1999; Hume *et al.*, 1992). Sin embargo, esta evolución no se observó en los experimentos D y P, en los que los valores no presentaron una clara tendencia a disminuir con la edad, sin que podamos dar una explicación plausible a la falta de respuesta.

C. Microorganismos patógenos: Presencia de coccidias en excreta.- A pesar de que la determinación de la presencia de coccidias de *Eimeria* en la excreta de las aves fue la única técnica analítica en la que se observó un claro efecto de los tratamientos, no se sobrepasaron los niveles de concentración considerados peligrosos desde el punto de vista epidemiológico y no se observaron manifestaciones clínicas. Las diferencias estuvieron orientadas a un menor conteo de OPGs del tratamiento bajo (L) en los experimentos D, P y O que su homólogo H (nivel alto). Estos resultados parecen indicar que el nivel de alteración o contaminación estudiado se traduce en un ligero efecto directo sobre la proliferación de estos parásitos, pero sin relevancia clínica. Por el contrario, el efecto observado en el experimento T (mayores conteos en el tratamiento LT que en el HT), en el que las grasas presentaron una mayor proporción de AGS, principalmente en el tratamiento HT. Estos resultados se entrelazan con el nivel de alteración (proporción de AG *Trans*) lo que hace difícil su interpretación. Aparentemente la presencia de formas *trans* y de grasas más saturadas tuvo un impacto negativo sobre la proliferación de coccidias, a diferencia de lo observado por otros autores (Allen *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1998; Allen y Danforth, 1998; Korver *et al.*, 1997) que describen que altos niveles dietéticos de AG insaturados se traducen en una disminución del número de oocistos presentes en la yacija de los animales.

Por otro lado, el análisis conjunto de los datos, cuyos resultados se presentan en la Figura 6.5., hacen referencia a un efecto de la edad. Este efecto es evidente en 3 de las cuatro pruebas

experimentales. Nuevamente el primer experimento (AG *trans*) salta la tendencia observada en los otros experimentos (efecto de la interacción E x e). Si hay un efecto inhibitorio provocado por las grasas saturadas o en su defecto por la presencia de AG *trans*, sobre la infestación por coccidias, sería interesante realizar más pruebas para dilucidar esta hipótesis.

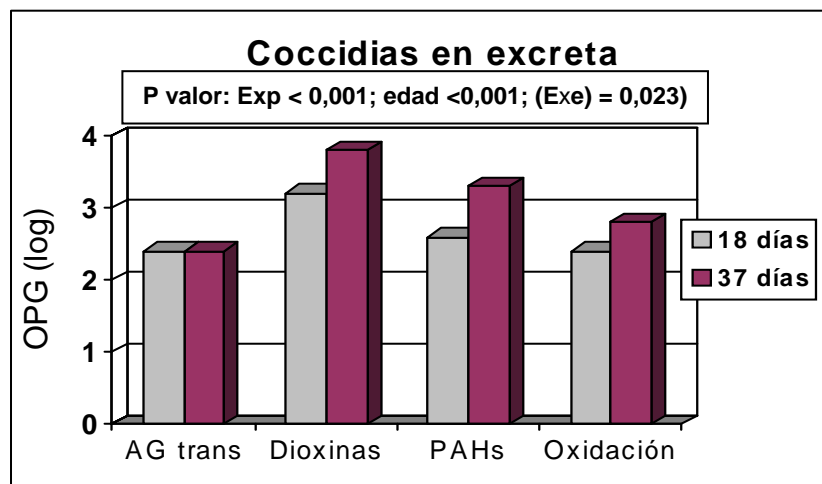


Figura 6.5. Presencia de coccidias en excreta observada en las cuatro pruebas experimentales. OPG (log): Ooquistes por gramo de excreta expresado en logaritmo en base 10; Exp.: P valor experimentos; (E x e): P valor de la interacción entre los experimentos y la edad de los animales; SEM modelo: 0,30

6.4. HISTOMORFOLOGIA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

La ausencia tanto de diferencias significativas entre los tratamientos en las cuatro pruebas experimentales en cuanto a la histomorfología de las vellosidades y criptas intestinales, como de lesiones en el epitelio intestinal en el examen post-mortem, indican que el nivel de alteración o contaminación estudiados no tienen un efecto directo sobre estos parámetros. Por otro lado, la edad tuvo un efecto significativo (Tabla 6.4.), traducido en un general aumento de la longitud de la vellosidades (LV), una disminución en las profundidades de criptas (PC) y un descenso en la proporción de linfocitos intraepiteliales (IEL). La toma de muestras para histología en los cuatro experimentos fue concebida con la finalidad de observar el efecto de las materias grasas recicladas en los animales, durante el período de desarrollo del TGI, que según se ha descrito en el capítulo de revisión bibliográfica, es de aproximadamente 21 días a partir de la eclosión de los pollos. Así, nuestras determinaciones se realizaron a 9 y 21 días de vida de las aves por lo que se disponen de dos puntos de apreciación. Esto limita, en parte, el análisis ya que en el caso de los linfocitos, por ejemplo, tal vez un mayor número de observaciones en el tiempo nos

Análisis Global de los Resultados e Implicaciones

permitirían estimar más claramente una respuesta inmune asociada a nuestros resultados. Como ya se ha comentado en los capítulos correspondientes a los distintos experimentos, la respuesta inmune es compleja y puede estar condicionada por diversos factores y mecanismos desencadenantes que no se han manifestado en los ensayos realizados. La sola cuantificación del número de linfocitos intraepiteliales probablemente no es parámetro suficiente para valorar cambios en la respuesta inmune asociados a la exposición de contaminantes o productos de alteración de las grasas.

Tabla 6.4. Parámetros histológicos de secciones de yeyuno-ileon de pollos a 9 y 21 días de vida, determinados en las cuatro pruebas experimentales.

Experim.*	1		2		3		4		SEM	P valor		
	9	21	9	21	9	21	9	21		Exp	edad	E x e
LV (mm)	0,46	0,70	0,56	0,77	0,52	0,68	0,54	0,79	0,10	0,001	<0,001	0,269
PC (mm)	0,16	0,15	0,17	0,14	0,18	0,13	0,17	0,14	0,03	0,986	<0,001	0,176
IEL	26,42	16,40	26,97	20,65	24,39	18,44	26,69	20,49	4,39	0,044	<0,001	0,234

* 1: AG *trans*; 2: Diox PCBs; 3: HAPs; 4: Oxidación; SEM: Error estándar de la media; LV: longitud de vellosidades; PC: profundidad de criptas; IEL: linfocitos intraepiteliales x 100 células observadas.

Al hacer una retrospectiva en los resultados observados en las anteriores pruebas experimentales y comparar los cocientes vellosidad/cripta (V/C) obtenidos de las cuatro pruebas experimentales (Fig. 6.6.), puede apreciarse una relativa similitud de resultados existente entre las pruebas experimentales, aunque el cociente fuera ligeramente superior en el caso de los experimentos D y O. Estas relaciones no están suficientemente documentadas en la bibliografía encontrada. En todos los experimentos se alcanzaron los mayores cocientes a 21 días de vida ($P < 0,001$), por lo que si queda evidente el efecto de la edad y demuestra el incremento estadísticamente significativo ($P < 0,001$) de la relación V/C conforme el animal crece.

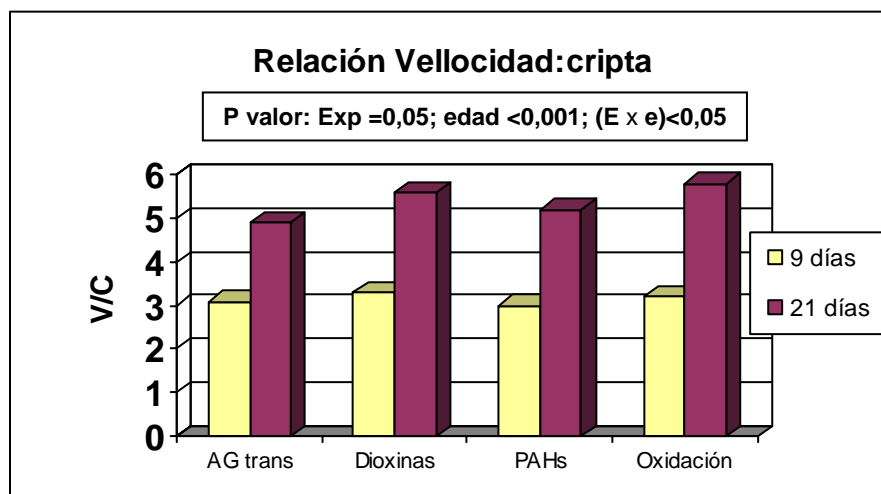


Figura 6.6. Relación Vellosidad/cripta (V/C) de las cuatro pruebas experimentales. Exp: Experimentos; E x e: Interacción entre los experimentos y la edad; SEM modelo: 0,57

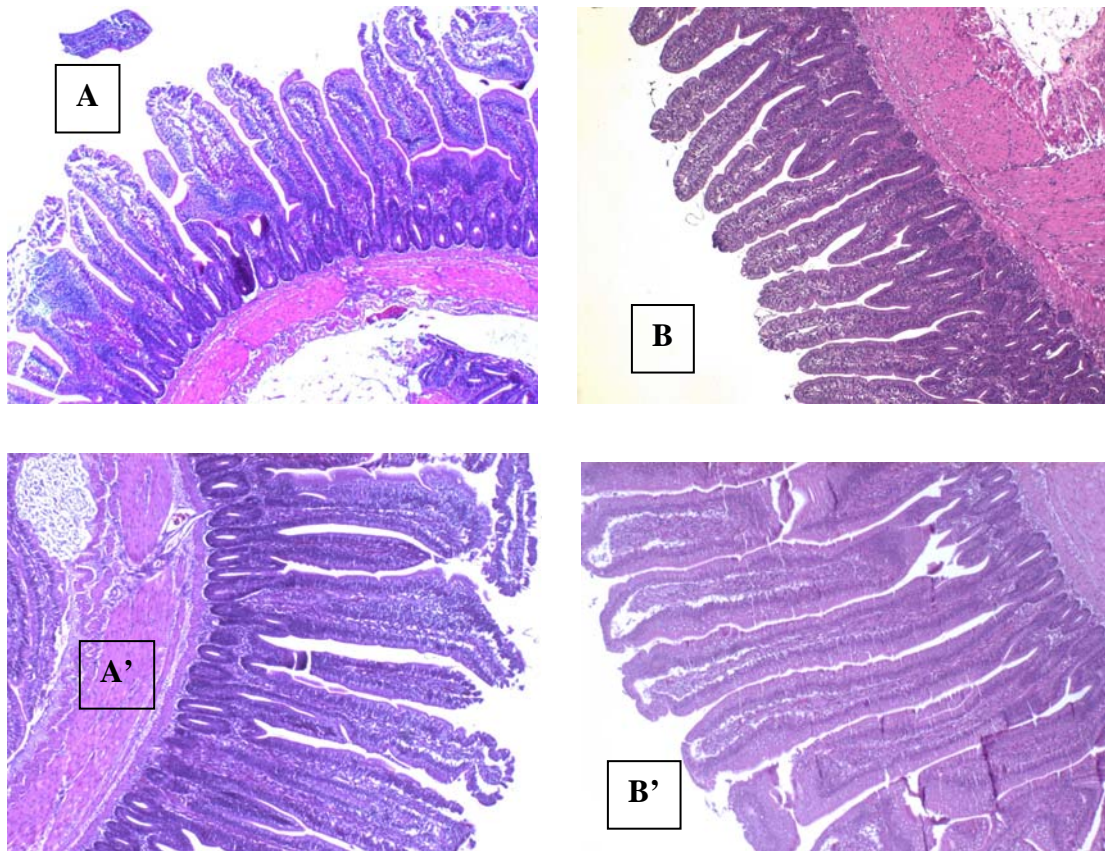


Figura 6.7. Mucosa intestinal: Cortes histológicos de secciones de yeyuno a 4X de aumento. Tinción hematoxilina-eosina. A y A': 9 y 21 días de vida, respectivamente, del experimento T (AG *Trans*); B y B': 9 y 21 días de vida del experimento O (Oxidación). Las muestras no correspondían al mismo tratamiento, debido a la ausencia de efecto provocado por esta variable. Nótese la diferencia entre la longitud de las vellosidades y la profundidad de criptas. La relación V/C aumenta con la edad.

6.5. IMPLICACIONES

Con la realización de las cuatro pruebas experimentales se pretendía conocer las implicaciones de la utilización de grasas recicladas en la alimentación de pollos de carne sobre la productividad y la salud de los animales, a partir del estudio de una serie de parámetros. Algunos de estos parámetros se centran en el TGI como primera barrera de defensa y porque su integridad compromete a la digestibilidad y absorción de nutrientes que el animal necesita para su desarrollo. Los resultados obtenidos en los cuatro experimentos, de manera general, no mostraron un claro efecto de los tratamientos (alto vs bajo), reflejando el bajo impacto del nivel de contaminación o alteración de las materias grasas recicladas utilizadas en este estudio en la productividad y la salud de los animales. Esto no quiere decir, sin embargo, que no se observaran en algún caso diferencias entre los tratamientos pero, a menudo, dichas diferencias parecen estar ligadas a la calidad de las materias grasas o a su diferente composición.

La caracterización química y la trazabilidad de materias grasas recicladas utilizadas como suplemento alimenticio adquieren una singular importancia. Ya en una primera parte del proyecto Feeding Fats Safety, del cual forman parte los experimentos realizados, se procedió a la caracterización de distintas materias grasas recicladas (un total de 120 grasas diferentes entre las que se encuentran las utilizadas en nuestros ensayos). Los niveles de alteración o contaminación encontrados no fueron alarmantes.

El mayor nivel de contaminación empleado en la prueba D (dioxinas y PCBs) estuvo muy próximo al nivel máximo establecido por la normativa regulatoria en materia de seguridad alimentaria y fue bajo en comparación a otros trabajos realizados sobre esta temática. Los aceites de pescado utilizados, sobre todo para el nivel bajo de contaminación, presentaban niveles de oxidación muy elevados. El nivel alto de HAPs no sobrepasó los empleados por otros autores, presentando además variaciones en la calidad de la grasa (elevada acidez). El mayor nivel de alteración de las grasas con isómeros *trans* se confunde con un mayor contenido de AGS y también presentó variaciones en la calidad de la grasa (elevada acidez).

Las características de las materias grasas recicladas procedentes de diferentes procesos y de calidad variable, con toda probabilidad, influyen sobre su aporte energético, hecho que condiciona su uso en los piensos de los animales.

Es bien sabido que el valor energético de las materias alimenticias influye sobre la eficiencia de alimentación y los costes de producción. Este factor debe ser necesariamente considerado en la formulación de los piensos. Por ello, muchos esfuerzos son realizados con la finalidad de hacer una mejor valoración de su potencial energético y de los factores que afectan a su utilización. Desde este punto de vista, el empleo de materias grasas en la formulación de raciones es una práctica habitual por ser una fuente concentrada de energía. El nivel de inclusión normalmente empleado, en la dieta de los pollos de carne, se sitúa entre 3 – 10 % y representa el 50 – 75 % de la grasa dietaria total que el animal consume.

Así, la inclusión de materias grasas recicladas hidrogenadas, ricas en AG *Trans* (y AGS), o de aceites ácidos con altos niveles de HAPs en el pienso de los animales, puede reducir la digestibilidad de las grasas, generar un inferior valor energético de la dieta y reducir los rendimientos productivos en los animales que las consumen. Consecuentemente, sería recomendable realizar la valoración del potencial energético de estas materias grasas recicladas

así como complementar la información existente acerca de su digestibilidad, cuando se destinen a la alimentación animal, con tal de completar su caracterización en términos de energía metabolizable.

La inclusión de aceites de pescado que contenían policlorobibenzo-p-dioxinas y dibenzofuranos (PCDD/Fs), así como policlorobifenilos (PCBs) a niveles ligeramente superiores a los permitidos por la normativa vigente (117 %), no provocó un efecto negativo sobre los rendimientos productivos ni la salud de los animales. No obstante, es importante considerar que el uso de aceites de pescado al nivel de inclusión en la dieta estudiado (6 %) podría ser responsable del deterioro de la calidad sensorial de la carne. De hecho, algunos trabajos como el de Lopez-Ferrer *et al.* (1999) concluyen en que el uso de aceites de pescado no es apto para la alimentación de los pollos en fase de acabado. También el control de calidad y la caracterización de las materias grasas adquieren relevancia ante la posibilidad de encontrar en el mercado aceites (en este caso aceite de pescado) con un alto grado de deterioro.

A pesar de no haber observado un efecto negativo con el empleo de grasas con alto grado de oxidación, sería recomendable realizar controles adicionales con estas grasas recicladas. Lamentablemente los trabajos relativos al empleo de grasas oxidadas y su efecto sobre los parámetros productivos y de salud son aún escasos; solamente dietas con altos niveles de grasas oxidadas (por encima del 12 %), claramente superiores a la inclusión normal en piensos para animales de granja, provocaron lesiones hepáticas en ratas (Lopezvarela *et al.*, 1995) y carnívoros (Engberg y Borsting, 1994), además de provocar inmunosupresión y una deficiente formación del hueso, entre otros efectos (Turek *et al.*, 2003).

De vuelta a nuestros resultados, debemos considerar algunos elementos que contribuyeron a la obtención de los mismos:

- En primer lugar, el nivel de alteración o contaminación, como se ha mencionado, no fue extremo en ninguno de los casos, sino que estuvo por debajo o cerca del límite máximo exigido por la legislación europea, cuando este límite existe. Por ello, es difícil determinar un nivel de riesgo ante la ausencia de una respuesta significativa tanto a nivel productivo como de salud de los animales.
- En segundo lugar, no fue posible el uso del mismo tipo de fuente o grasa reciclada en todos los experimentos. De ello derivan las diferencias en la composición, el perfil de ácidos grasos y otros valores analíticos de los piensos experimentales, sin considerar la alteración o contaminación orgánica estudiada.

Bajo tales condiciones, la ausencia de un claro efecto del nivel de contaminación o alteración estudiado sobre la salud de los animales o la respuesta en términos de productividad, observadas en las 4 pruebas experimentales, no condiciona el hecho de que tales productos sean transferidos al producto final (Ábalos *et al.*, 2008). Así, la presencia en la carne y tejido hepático de contaminantes como las dioxinas y PCBs, en una concentración igual o mayor a la establecida en el pienso y superior a las recomendaciones emitidas por la CE (en determinaciones hechas en el marco del proyecto europeo), así como de elevadas concentraciones de TBARs, que pueden influir negativamente sobre la estabilidad oxidativa del producto final, requieren de estudios complementarios, dada su importancia en materia de seguridad y calidad alimentaria, respectivamente.

7. CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos en los experimentos desarrollados en la presente memoria de tesis, bajo las condiciones experimentales indicadas, nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

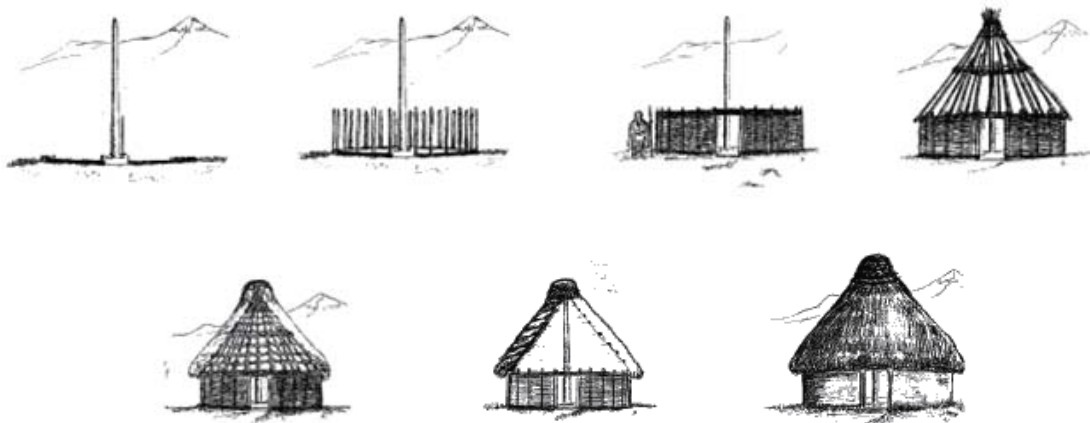
La inclusión en el pienso de materias grasas recicladas con diferentes niveles de isómeros *trans*, dioxinas y PCBs, HAPs o productos de oxidación lipídica:

1. No genera problemas de salud en los pollos carne, ya que no se observaron signos clínicos durante el período productivo, ni alteraciones patológicas en los exámenes post-mortem realizados en cada uno de los sacrificios.
2. No tiene un efecto negativo en la producción de las aves, a excepción de grasas con un nivel elevado de ácidos grasos saturados y dobles enlaces en configuración *trans* que da lugar a peores rendimientos productivos.
3. No afecta a los niveles de oxidación secundaria de la sangre ni a la integridad de la membrana del eritrocito. Sin embargo la utilización de grasas saturadas y con presencia de dobles enlaces tipo *trans* provoca una mayor tasa de hemólisis.
4. No tiene un efecto importante sobre el equilibrio de la microbiota cecal, evaluado por t-RFLP a través del análisis de la homología entre bandas patrón (dendograma) o bien por el número de fragmentos terminales (biodiversidad). Tampoco afecta a la actividad microbiana, medida en términos de concentración de productos de fermentación.
5. No se asoció con contajes de ooquistes de coccidia por gramo de excreta que alcanzaran niveles de infestación de importancia clínica o patológica.
6. No altera la estructura de la mucosa intestinal (porción de yeyuno) medida en base a la longitud de las vellosidades y la profundidad de criptas ni la respuesta inmune medida por la presencia de linfocitos intraepiteliales (IEL).

En cuanto al efecto de la edad:

7. Con la edad del ave aumenta la resistencia a la hemólisis de los eritrocitos, la complejidad de la microbiota cecal y la longitud de las vellosidades, al mismo tiempo que se produce un descenso de la profundidad de criptas y del número de linfocitos intraepiteliales.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



La construcción del conocimiento se asemeja a la construcción de una casa, parte de un proyecto que se consolida paulatinamente a medida en que se incorporan nuevos elementos.

"...los individuos construyen nuevos conocimientos a partir de las experiencias..." Jean Piaget (1896-1980)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Ábalos, M., Parera, J., Abad, E., y Rivera, J. (2008) PCDD/Fs and DL-PCBs in feeding fats obtained as co-products or by-products derived from the food chain. *Chemosph.* 71:1115-1126.
- Allen, P.C., Danforth, H., y Levander, O.A. (1997) Interaction of dietary flaxseed with coccidia infections in chickens. *Poult.Sci.* 76:822-827.
- Allen, P.C. y Danforth, H.D. (1998) Effects of dietary supplementation with n-3 fatty acid ethyl esters on coccidiosis in chickens. *Poult.Sci.* 77:1631-1635.
- Allen, P.C., Danforth, H.D., y Augustine, P.C. (1998) Dietary modulation of avian coccidiosis. *Int.J.Parasitol.* 28:1131-1140.
- Allen, P.C. y Fetterer, R. (2002) Interaction of dietary vitamin E with *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poult.Sci.* 81:41-48.
- Allison, D.B., Denke, M.A., Dietschy, J.M., Emken, E.A., Kris-Etherton, P.M., y Nicolosi, R.J. (1995) Trans fatty acids and coronary heart disease risk. Report of the experts panel on *trans* fatty acids and coronary heart disease. *Am. J Clin. Nutr.* 62:655S-708S.
- Amit-Romach, E., Sklan, D., y Uni, Z. (2004) Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poult.Sci.* 83:1093-1098.
- AOAC (1995) Official method of analysis. Association of official analytical chemists (16th edition). Washington D.C.-USA.
- Arrebola, F.J., Frenich, A.G., Rodríguez, M.J.G., Bolanos, P.P., y Vidal, J.L.M. (2006) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oil by a completely automated headspace technique coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 41:822-829.
- Aslan, R., Sekeroglu, M.R., Tarakcioglu, M., Bayiroglu, F., y Meral, I. (1998) Effect of acute and regular exercise on antioxidative enzymes, tissue damage markers and membran lipid peroxidation of erythrocytes in sedentary students. *Tr. J. Med. Sci.* 28:411-414.
- Atal, S., Zarnowski, M.J., Cushman, S.W., y Sampugna, J. (1994) Comparison of body weight and adipose tissue in male C57Bl/6J mice fed diets with and without *trans* fatty acids. *Lipids* 29:319-325.

B

- Ballesteros, E., Sánchez, A.G., y Martos, N.R. (2006) Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromat. A.* 1111:89-96.

- Barnes, EM. (1972) The Avian Intestinal Flora With Particular Reference To Possible Ecological Significance Of Cecal Anaerobic Bacteria. *Am.J.Clin.Nutr.* 25:1475-1479.
- Barrera-Arellano, D. y Block, J.M. (1993) Ácidos grasos trans en aceites hidrogenados: implicaciones técnicas y nutricionales. *Grasas y Aceites* 44:286-293.
- Beauchamp, C.J., Boulanger, R., Matte, J., y Saint-Laurent, G. (2002) Examination of the contaminants and performance of animals fed and bedded using de-inking paper sludge. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42:523-528.
- Bell, J.G., McGhee, F., Dick, J.R., y Tocher, D.R. (2006) Dioxin and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Scottish farmed salmon (*Salmo salar*): effects of replacement of dietary marine fish oil with vegetable oils. *Aquaculture* 243:305-314.
- Bernalier, A., Dore, J., y Durand, M. (1999) Biochemistry of fermentation. In: *Colonic Microbiota, Nutrition and Health* (Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B., Ed.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht The Netherlands 3: 37-53.
- Bernard, A., Broeckaert, F., De Poorter, G., De Cock, A., Hermans, C., Saegerman, C., y Houins, G. (2002) The Belgian PCB/Dioxin Incident: Analysis of the Food Chain Contamination and Health Risk Evaluation. *Environ. Res. Sec. A* 88:1-18.
- Bernard, A., Hermans, C., Broeckaert, F., De Poorter, G., De Cock, A., y Houins, G. (1999) Food contamination by PCBs and dioxins. Brief communication. *Nature* 401:231-232.
- Beuge, J.A. y Aust, S.D. (1987) Microsomal Lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-310.
- Binkoski, A.E., Kris-Etherton, P.M., Wilson, T.A., Mountain, M.L., y Nicolosi, R.J. (2005) Balance of Unsaturated Fatty Acids is important to a Cholesterol Lowering Diet: Comparison of Mid-oleic Sunflower Oil and Olive Oil on Cardiovascular Disease Risk Factors. *J.Am.Diet.Assoc.* 105:1080-1086.
- Bjerrum, L., Engberg, R.M., Leser, T.D., Jensen, B.B., Finster, K., y Pedersen, K. (2006) Microbial Community Composition of the Ileum and Cecum of Broiler Chickens as Revealed by Molecular and Culture-Based Techniques. *Poult.Sci.* 85:1151-1164.
- Blanch, A., Barroeta, A.C., Baucells, M.C., y Puchal, F. (2000) Effect of the nutritive value of dietary fats in relation to their chemical composition on fatty acid profiles of abdominal and skin fat in finishing chickens. *Archiv fur Geflugelkunde* 64:14-18.
- Blanch, A., Barroeta, A.C., Baucells, M.D., y Puchal, F. (1995) The Nutritive-Value Of Dietary Fats In Relation To Their Chemical Composition - Apparent Fat Availability And Metabolizable Energy In 2-Week-Old Chicks. *Poult.Sci.* 74:1335-1340.
- Bou, R., Grimpa, S., Baucells, M.D., Codony, R., y Guardiola, F. (2006) Dose and Duration Effect of α -Tocopheryl Acetate Supplementation on Chicken Meat Fatty Acid Composition, Tocopherol Content, and Oxidative Status. *J.Agric.Food Chem.* 54:5020-5026.
- Bourriaud, C., Robins, R.J., Martin, L., Kozlowski, F., Tenailleau, E., Cherbut, C., y Michel, C. (2005) Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J. Appl. Microb.* 99:201-212.

- Bretillon, L., Chardigny, J.M., Sébédio, J.L., Poullaim, D., Noël, JP., y Vatèle, JM. (1998) Oxidative metabolism of (1-¹⁴C) mono-*trans* isomers of linoleic and α -linoleic acids in the rat. *Biochim. et Bioph. Acta* 1390:207-214.
- Brito, M.S., Villavicencio, A.L.C.H., y Mancini, J. (2002) Effects of irradiation on trans fatty acids formation in ground beef. *Rad. Phys. Chem.* 63:337-340.
- Bruggeman, V., Van Den Bergh, G., Clerens, O., Onagbesan, O., Arckens, L., y Decuypere, E. (2007) Differential Protein Expression in Liver and Ovary of the One-Day-Old chick as a Result of a Single in ovo Injection of 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin. *Feedinfo New Service* 1-4. www.feedinfo.com
- Brunström, B., Broman, D., y Näf, C. (1990) Embryotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Three Domestic Avian Species, and of PAHs and Coplanar Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in the Common Eider. *Environ. Pollution* 67:133-143.
- ### C
- Castillo, M., Amalik, F., Linares, A., y Garcia-Peregrin, E. (2000) Fish oil reduces cholesterol and arachidonic acid levels in plasma and lipoproteins from hypercholesterolemic chicks. *Mol.Cell.Biochem.* 210:121-130.
- Cherian, G. (2007) Metabolic and cardiovascular diseases in poultry: Role of dietary lipids. *Poult.Sci.* 86:1012-1016.
- Chin Sou Fei (1995) Technical bulletin: The detrimental effects of feeding oxidized fats to animals. American Soybean Association: 1-6. www.asasea.com/technical/po21-1995.html
- Chini, L., Angelini, F., Chatgialiloglu, C., Dellonte, S., Moschese, V., Corrente, S., Iannini, R., Chianca, M., Rossi, P., y Ferreri, C. (2005) Trans fatty acid and atopic eczema/dermatitis syndrome: The relationship with a free radical cis-trans isomerization of membrane lipids trans LIPIDS in atopic dermatitis. *Clin.Immunol.* 115:S54-S55.
- Choque-López, J.A., Manzanilla, E.G., Baucells, M.D., y Barroeta, A.C. (2005) El tipo de grasa y su estado oxidativo provocan cambios en la resistencia de la membrana de los eritrocitos en pollos broiler. *XLII Symposium Científico de Avicultura*: 201-207.
- Choque-López, J.A., Manzanilla, E.G., Gómez de Segura, A., Baucells, M.D., y Barroeta, A.C. (2006) Effects of Oxidated Fat and Vitamin E Inclusion on Resistance to Haemolysis, Intestinal Microbiota, Faecal Coccidia Counts and Epithelium Structure of Broiler Chicken. In: *Avian Gut Function, Health & Disease*, (Perry, G. C., Ed.). CAB International. Bristol-UK pp. 384-384.
- Ciganek, M. y Neca, J. (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbons in porcine and bovine organs and tissues. *Vet.Med.(Praha)*. 51:239-247.
- Ciganek, M., Ulrich, R., Neca, J., y Raszyk, J. (2002) Exposure of pig fatteners and dairy cows to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Vet.Med.- Czech* 47:137-142.

- Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, S., McGarrell, D.M., Schmidt, T.M., Garrity, G.M. y Tiedje, J.M. (2003) The ribosomal database project (RDB-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 31:442-443.
- Corrier, D.E., Hinton, A., Hargis, B., y DeLoach, J.R. (1992) Effect Of Used Litter From Floor Pens Of Adult Broilers On Salmonella Colonization Of Broiler Chicks. *Avian Dis.* 36:897-902.
- Cortinas, L., Barroeta, A., Villaverde, C., Galobart, J., Guardiola, F., y Baucells, M.D. (2005) Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: Lipid oxidation. *Poult.Sci.* 84:48-55.
- Cortinas, L., Villaverde, C., Galobart, J., Baucells, M.D., Codony, R., y Barroeta, A.C. (2004) Fatty acid content in chicken thigh and breast as affected by dietary polyunsaturation level. *Poult.Sci.* 83:1155-1164.
- Custer, T.W., Custer, C.M., Hines, R.K., Sparks, D.W. (2000) Trace elements, organochlorines, polycyclic aromatic hydrocarbons, dioxins, and furans in lesser scaup wintering on the Indiana Harbor Canal. *Environ. Pollution* 110:469-482.

D

- Danicke, S., Vahjen, W., Simon, O., y Jeroch, H. (1999) Effects of dietary fat type and xylanase supplementation to rye-based broiler diets on selected bacterial groups adhering to the intestinal epithelium, on transit time of feed, and on nutrient digestibility. *Poult.Sci.* 78:1292-1299.
- de Blas, C. (2004) Cambios en el perfil de ácidos grasos en productos animales en relación con la alimentación animal y humana. Importancia del Ácido Linoleico Conjugado. 1. Rumiantes. XX Curso de especialización FEDNA 79-100.
- De Vos, S., Maervoet, J., Schepens, P., y De Schrijver, R. (2003) Polychlorinated biphenyls in broiler diets: their digestibility and incorporation in body tissues. *Chemosph.* 51:7-11.
- De Vries, M., Kwakkel, R.P., y Kijlstra, A. (2006) Dioxins in organic eggs: a review. *NJAS* 54:207-221.
- Demigne, C., Remes, C., y Morand, C. (1999) Short chain fatty acids. In: *Colonic Microbiota, Nutrition and Health* (G.R.Gibson and M.B.Roberfroid, Ed.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht The Netherlands 4: 55-69.
- Devier, M. y Budzinski, H. (2007) (Personal comunicación) Levels of PAHs and PBDEs in animal tissues and rate of transfer from feed. *Feeding Fats Safety (FOOD-CT-2004-007020)*. Unpublished data: 8 pp.
- Díaz, J. (2007) Dioxines en productes per a l'alimentació humana i animal. Institut Químic de Sarrià. Col·legi Oficial de Veterinaris de Barcelona: 6 pp.
- Dibner, J. (1997) The effect of ingredient texture, form and freshness on gastrointestinal health in young broilers. *American Soybean Association*: 6 pp. www.asasea.com/technical/po30-1997.html

Dibner, J.J., Atwell, C.A., Kitchell, M.L., Shermer, W.D., y Ivey, F.J. (1996) Feeding of oxidized fats to broilers and swine: Effects on enterocyte turnover, hepatocyte proliferation and the gut associated lymphoid tissue. *An. Feed. Sci. Technol.* 62:1-13.

Directiva 2006/13/CE (2006) Directiva del 3 de febrero de 2006 Sobre Dioxinas y PCBs similares a dioxinas. *Com.UE* 32:44-53.

Dunkley, K.D., Dunkley, C.S., Njongmeta, N.L., Callaway, T.R., Hume, M.E., Klubena, L.F., Nisbet, D.J., y Ricke, S.C. (2007) Comparison of in vitro fermentation and molecular microbial profiles of high-fiber feed substrates incubated with chicken cecal inocula. *Poult.Sci.* 86:801-810.

E

Eder, K., Keller, U., Hirche, F., y Brandsch, C. (2003) Thermally oxidized dietary fats increase the susceptibility of rat LDL to lipid peroxidation but not their uptake by macrophages. *J.Nutr.* 133:2830-2837.

Elson, C.E., Benevenga, N.J., Canty, D.J., Grummer, R.H., Lalich, J.J., Porter, J.W., y Johnston, A.E. (1981) The Influence Of Dietary Unsaturated Cis And Trans And Saturated Fatty-Acids On Tissue-Lipids Of Swine. *Atherosclerosis* 40:115-137.

Engberg, R.M. y Borsting, C.F. (1994) Inclusion of Oxidized Fish-Oil in Mink Diets .2. The Influence on Performance and Health Considering Histopathological, Clinical-Chemical, and Hematological Indexes. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition-Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernahrung und Futtermittelkunde* 72:146-157.

Engwall, M., Brunström, B., Näf, C., y Hjelm, K. (1999) Levels of dioxin-like compounds in sewage sludge determined with a bioassay based on erod induction in chicken embryo liver cultures. *Chemosph.* 38:2327-2343.

Ewing, W.N. y Cole, D.J.A. (1994) Micro-flora of the gastro-intestinal tract. In: *The Living Gut: An introduction to Micro-organisms in Nutrition.* Contex ED. Trowbridge-Wilshire UK: 45-65.

F

Fairbrother, A., Smits, J., y Grasman, K.A. (2004) Avian Immunotoxicology. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B* 7:105-137.

Ferreri, C., Angelini, F., Chatgililoglu, C., Dellonte, S., Moschese, V., Rossi, P., y Chini, L. (2005) *Trans* Fatty Acids and Atopic Eczema/Dermatitis Syndrome: The Relationship with a Free Radical *cis-trans* Isometization of Membrane Lipids. *Lipids* 40:661-667.

Francesch i Ollé, M. (2007) Disbiosis intestinal. XLIV Symposium científico de avicultura AECA-WPSA 24-26 Octubre:51-64.

Furuse, M. y Yokota, H. (1985) Effect Of The Gut Microflora On Chick Growth And Utilization Of Protein And Energy At Different Concentrations Of Dietary-Protein. *Br.Poult.Sci.* 26:97-104.

G

- Gallego, M.E., Roy, T.J., Hermoso de Mendoza, M., Hernandez, D., Soler, F., y Pérez, M. (2005) Las Dioxinas en la Producción Animal: Situación Actual. *Prod. Anim.* 212: 19-31.
- Galobart, J. (2000) Mejora de la estabilidad oxidativa de huevos y ovo productos Enriquecidos con Ácidos Grasos Poli Insaturados: α -Tocoferol, Cantaxantina y Extracto de Romání. Universidad Autónoma de Barcelona. PhD Thesis: 220 pp.
- Galobart, J., Barroeta, A.C., Baucells, M.D., Cortinas, L., y Guardiola, F. (2001) Alpha-Tocopherol transfer efficiency and lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with omega 3-polyunsaturated fatty acids. *Poult.Sci.* 80:1496-1505.
- Gatlin, L.A., See, M.T., Larick, D.K., Lin, X., y Odle, J. (2002) Conjugated linoleic acid in combination with supplemental dietary fat alters pork fat quality. *J.Nutr.* 132:3105-3112.
- Geyra, A., Uni Z., y Sklan, D. (2001) Enterocyte Dynamics and Mucosal Development in the Posthatch Chicks. *Poult.Sci.* 80:776-782.
- Giroty, A.W. (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J.Lipid Res.* 39:1529-1542.
- Golapakrishna, A.G. y Prabhakar, J.V. (1986) Effect of water activity on autoxidation of methyl linoleate. *J.Food Sci.Technol.* 23:152-157.
- Gong, J.H., Forster, R.J., Yu, H., Chambers, J.R., Sabour, P.M., Wheatcroft, R., y Chen, S. (2002) Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiol.Lett.* 208:1-7.
- Gorrachategui, M. (2001) Seguridad Alimentaria: Dioxinas. XVII Curso de especialización FEDNA: 24 pp.
- Gradinski-Vrbanac, B., Stojevic, Z., Milinkovic-Tur, S., Balenovic, T., Pirsljin, J., y Zdelar-Tuh, M. (2002) In vitro susceptibility of duck, chicken, and pig erythrocyte lipids to peroxidation. *Vet.Med.(Praha)* 47:303-308.
- Grau, A., Guardiola, F., Grimpa, S., Barroeta, A.C., y Codony, R. (2001) Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: Influence of dietary fat and alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Poult.Sci.* 80:1630-1642.
- Guillen, M.D., Sopelana, P., y Palencia, G. (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbons and olive pomace oil. *J.Agric.Food Chem.* 52:2123-2132.
- Guruge, K.S. y Tanabe, S. (2004) Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like biphenyls in biota from Sri Lankan coast. *Baseline/Marine Pollution Bulletin* 48:986-1008.

H

- Halouzka, R., Ruprich, J., y Piskac, A. (1990) The Effects Of Polychlorinated-Biphenyls On Chick Organisms - Pathological-Changes In The Organs After A Short-Time Or Long-Time Intake Of Delor-103. *Vet.Med.(Praha)*. 35:303-312.
- Hamilton, C.R. y Kirstein, D. (2003) Does rancidity, as measured by peroxide value, affect animal performance? *Darling Int.*: 8 pp.
- Han, S.N., Leka, L.S., Lichtenstein, A.H., Ausman, L.M., Schaefer, E.J., y Meydani, S.N. (2002) Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J.Lipid Res.* 43:445-452.
- Hansen, L.G., Tuinstra, L.G.M.T., Kan, C.A., Strik, J.J.T.W., y Koeman, J.H. (1983) Accumulation of Chlorobiphenyls in Chicken Fat and Liver After Feeding Aroclor 1254 Directly Or Fat from Swine Fed Aroclor 1254. *J.Agric.Food Chem.* 31:254-260.
- Hermier, D. (1997) Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. *J.Nutr.* 127:S805-S808.
- Hernández, N. y Boatella, J. (1986) Formas "cis" y "trans" de los ácidos grasos insaturados. Repercusiones nutricionales. *Cir.Far.* 290:53-64.
- Hilscherova, K., Blankenship, A.L., Nie, M., Coady, K.K., Upham, B.L., Trosko, J.E., y Giesy, J.P. (2003) Oxidative stress in liver and brain of the hatchling chicken (*Gallus domesticus*) following in ovo injection with TCDD. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxic. & Pharmacol.* 136:29-45.
- Hofacre, C., Lee, M., y Lu, J.R. (2007) Normal Intestinal Bacteria Flora and its Impact on Bird Health. *Feedinfo New Service*: 5 pp. www.feedinfo.com
- Höjberg, O., Canibe, N., Poulsen, H.D., Hedemann, M.S., y Jensen, B.B. (2005) Influence of dietary zinc oxid and copper sulphate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. *Appl.Environ.Microbiol.* 71:2267-2277.
- Hume, M.E., Kubena, L.F., Beier, R.C., Hinton, A.Jr, Corrier, D.E., y DeLoach, J.R. (1992) Fermentation of (14C) Lactose in broiler chicks by cecal Anaerobes. *Poult.Sci.* 71:1464-1470.
- Hume, M.E., Kubena, L.F., Edrington, T.S., Donskey, C.J., Moore, R.W., Ricke, S.C., y Nisbet, D.J. (2003) Poultry Digestive Microflora Biodiversity as Indicated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Poult.Sci.* 82:1100-1107.

I

- Iben, C., Bohm, J., Tausch, H., Leibetseder, J., y Luf, W. (2003) Dioxin residues in the edible tissue of broiler chicken. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 87:142-148.

J

- Javadi, M., Geelen, M.J.H., Everts, H., Hovenier, R., Javadi, S., Kappert, H., y Beynen, A.C. (2008) Body composition and heat expenditure in broiler chickens fed diets with or without trans fatty acids. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92:99-104.
- Jorgensen, H., Zhao, X.Q., Bach Knudsen, K.E., y Eggum, B.O. (1996) The influence of dietary fibre source and level on the development of the gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broiler chickens. *Br.J.Nutr.* 75:379-395.
- Józefiak, D., Rutkouski, A., y Martin, S.A. (2004) Carbohydrate fermentation en the avian ceca: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 113:1-15.
- Jozefiak, D., Rutkowski, A., Jensen, B.B., y Engberg, R.M. (2007) Effects of dietary inclusion of triticale, rye and wheat and xylanase supplementation oil growth performance of broiler chickens and fermentation in the gastrointestinal tract. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132:79-93.

K

- Karabulut, I. (2007) Fatty acid composition of frequently consumed foods in Turkey with special emphasis on trans fatty acids. *Int. J. of Food Sci. Nutr.* 58:619-628.
- Kim, M.K., Kim, S.Y., Yun, S.J., Lee, M.H., Cho, B.H., Park, J.M., Son, S.W., y Kim, O.K. (2004) Comparison of seven indicator PCBs and three coplanar PCBs in beef, pork, and chicken fat. *Chemosph.* 54:1533-1538.
- Kitts, C.L. (2001) Terminal Restriction Fragment Patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr.Issues Intest.Microbiol.* 2:17-25.
- Knarreborg, A., Simon, M.A., Engberg, R.M., Jensen, B.B., y Tannock, G.W. (2002) Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Appl.Environ.Microbiol.* 68:5918-5924.
- Koletzko, B. y Decsi, T. (1997) Metabolic aspects of *trans* fatty acids. *Clin.Nutr.* 16:229-237.
- Korver, D.R., Wakenell, P., y Klasing, K.C. (1997) Dietary fish oil or Lofrin, a 5-lipoxygenase inhibitor, decrease the growth-suppressing effects of coccidiosis in broiler chicks. *Poult.Sci.* 76:1355-1363.

L

- Lefevre, M., Lovejoy, J.C., Smith, S.R., Delany, J.P., Champagne, C., Most, M., Denkins, Y., Jonge, L., Rood, J., y Bray, G.A. (2005) Comparison of the acute response to meals enriched with cis- or trans-fatty acids on glucose and lipids in over weight individuals with differing FABP2 genotypes. *Metab-Clin. Exp.* 54:1652-1658.
- Léger, C.L., Razanamahefa, L., y Margaritis, I. (2007) Health risks and benefits of *trans* fatty acids including conjugated fatty acids in food - Synopsis of the AFSSA report ond recommendations. *Eur.J.Lipid Sci.Technol.* 109:887-890.

- Lin, C.F., Asghar, A., Gray, J.I., Buckley, D.J., Booren, A.M., Crackel, R.L., y Flegal, C.J. (1989a) Effects Of Oxidized Dietary Oil And Antioxidant Supplementation On Broiler Growth And Meat Stability. *Br.Poult.Sci.* 30:855-864.
- Lin, C.F., Gray, J.I., Asghar, A., Buckley, D.J., Booren, A.M., y Flegal, C.J. (1989b) Effects Of Dietary Oils And Alpha-Tocopherol Supplementation On Lipid-Composition And Stability Of Broiler Meat. *J. Food Sci.* 54:1457-1468.
- Lindstrom, G., Haug, L.S., Nicolaysen, T., y Dybing, E. (2002) Comparability of world-wide analytical data of PCDDs, PCDFs and non-ortho PCBs in samples of chicken, butter and salmon. *Chemosph.* 47:139-146.
- Liu, J.F. y Huang, C.J. (1996) Dietary oxidized frying oil enhances tissue alpha-tocopherol depletion and radioisotope tracer excretion in vitamin E-deficient rats. *J.Nutr.* 126:2227-2235.
- 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 rapeseed and linseed oils. *Poult.Sci.* 78:356-365.
- Lopezvarela, S., Sánchezmuniz, F.J., y Cuesta, C. (1995) Decreased Food Efficiency Ratio, Growth-Retardation and Changes in Liver Fatty-Acid Composition in Rats Consuming Thermally Oxidized and Polymerized Sunflower Oil Used for Frying. *Food Chem.Toxicol.* 33:181-189.
- Lu, J.R., Hofacre, C., y Lee, M.D. (2006) Emerging Technologies in Microbial Ecology Aid in Understanding the Effect of Monensin in the Diets of broilers in Regard to the Complex Disease Necrotic Enteritis. *J.Appl.Poult.Res.* 15:145-153.
- Lu, J.R., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J.J., y Lee, M.D. (2003) Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl.Environ.Microbiol.* 69:6816-6824.

M

- MacFarlane, G.T. y McBain, A.J. (1999) The Human Colonic Microbiota. In: *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*, (Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B., Ed.), Pp. 1-26.
- Maervoet, J., Chu, S.G., De Vos, S., Covaci, A., Voorspoels, S., De Schrijver, R., y Schepens, P. (2004) Accumulation and tissue distribution of selected polychlorinated biphenyl congeners in chickens. *Chemosph.* 57:61-66.
- Mann, G.V. (1994) Consecuencias metabólicas de los ácidos grasos trans en la dieta. *The Lancet (ED.ESP)* 25:250-254.
- Manteca, X. (1992) Absorción intestinal de los isómeros geométricos del ácido 9-octadecenoico. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis Doctoral: 205 pp.
- Manteca, X. y Noble, R. (1993) C18 *trans* monoinsaturated fatty acid in the diet of the hen and its accumulation in yolk and embryo tissue. *J.Sci.Fd. Agric.* 63:251-255.

- Maraschiello, C., Sagara, C., y Garcia Rugeiro, J.A. (1999) Glutathione peroxidase activity, TBARs, and alpha-tocopherol in meat from chickens fed different diets. *J.Agric.Food Chem.* 47:867-872.
- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., y Gutiérrez, A. (2005) Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquím. Clín. Latinoamer.* 39:27-36.
- Mateus, E.F. (2007) Grasas recicladas en la alimentación de pollos de carne: implicaciones productivas. Universidad Autónoma de Barcelona Tesis maestría: 61 pp.
- Matlova, L., Miroslav, M., Nezveda, K., Granátova, M., y Nevoránkova, Z. (1995) Biochemical screening of highly toxic aromatic contaminants in river sediment and comparison of sensitivity of biological model systems. *Chemosph.* 30:1363-1371.
- Ministry of Agriculture Fisheries and Food-UK (1986) McMaster Technique. *Manual of Veterinary Parasitological laboratory techniques* 3:170-172.
- Montagne, L., Pluske, J.R., y Hampson, D.J. (2003) A review of interations between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108:95-117.
- Morales, R. (2007) Las paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*: un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis doctoral: 262 pp.
- Moreda, W., Rodríguez-Acuña, R., Perez-Camino, M.D.C., y Cert, A. (2004) Determination of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in refined olive pomace and other vegetable oils. *J. of Sci. Food and Agric.* 84:1759-1764.
- Moreira, N.X., Curi, R., Padovese, R., y Mancini-Filho, J. (2001) Incorporation of dietary trans mono-unsaturated fatty acids into-tissues of walker 256 tumor-bearing rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 34:501-508.
- Moreno, J.J. y Mitjavila, M.T. (2003) The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (Review). *J. Nutr. Biochem.* 14:182-195.
- Moret, S., Piani, B., Bortolomeazzi, R., y Contel, L.S. (1997) HPLC determination at polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung A-Food Res. Technol.* 205:116-120.
- Moriguchi, T., Takasugi, N., y Itakura, Y. (2001) The effects of aged garlic extract on lipid peroxidation and the deformability of erythrocytes. *J.Nutr.* 131:1016S-1019S.
- Moser, A.G. y McLachlan, M.S. (1999) A non-absorbable dietary fat substitute enhances elimination of persistent lipophilic contaminants in humans. *Chemosph.* 39:1513-1521.

N

- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2001) Lípidos. In: *Lehninger Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega 3ª ED. Barcelona-España: 363-388.

Nestel, P. (1995) Comment on *trans* fatty acids and coronary heart disease risk. *Am.J.Clin.Nutr.* 62:522-523.

Ngoc Lan, P.T., Sakamoto, M., y Benno, Y. (2004) Effects of two probiotic *Lactobacillus* strain on jejunal and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes. *Microbiol.Immunol.* 48:917-929.

NRC (1994) Nutrient requirements of poultry. National Research Council 10th Revised Ed.

O

Oertel, M.L. y Hartfiel, W. (1982) Wirkung von frischen und oxidierten fetten/ölen sowie von Pro- und Antioxidantien auf das Wachstum von Masthühnerküken (Effect of fresh and oxidized fats/oils and pro- and antioxidants on the growth of broiler chicks). *Archiv für Geflügelkunde* 46:13-19.

P

Palmquist, D.L. (1988) The feeding value of fats. In: *World Animal Science. Disciplinary approach B*, (Orskov, E. R., Ed.). Elsevier Science Publishers. Amsterdam-Holanda: 293-311.

Parmentier, H.K., Awati, A., Nieuwland, M.G.B., Schrama, J.W., y Sijben, J.W.C. (2002) Different sources of dietary n-6 polyunsaturated fatty acids and their effects on antibody responses in chickens. *Br.Poult.Sci.* 43:533-544.

Pedroso, A.A., Menten, J.F.M., y Lambais, M.R. (2005) The Structure of Bacterial Community in the Intestines of Newly Hatched Chicks. *J.Appl.Poult.Res.* 14:232-237.

Pelicano, E.R.L., Souza, P.A., Souza, H.B.A., Fogueiredo, D.F., Boiago, M.M., Carvalho, S.R., y Bordon, V.F. (2005) Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Brazilian J. Poult. Sci.* 7:221-229.

Penumetcha, M., Khan, N., y Parthasarathy, S. (2000) Dietary oxidized fatty acids: an atherogenic risk? *J.Lipid Res.* 41:1473-1480.

Pérez de Rozas A.M., Roca, M., Carabaño, R., de Blas, C., Francesch, M., Brufau, J., Martín-Orué, S., Gasa, J., Campoy, S., Barbé, J., y Badiola, I. (2003) El Estudio de la Diversidad Intestinal por RFLP. XIX Curso de Especialización FEDNA: 31-45.

Pirard, C. y De Pauw, E. (2005) Uptake of polychlorodibenzo-p-dioxins, polychlorodibenzofurans and coplanar polychlorobiphenyls in chickens. *Environ. Int.* 31:585-591.

PNT: CAA/PM/0008-00 (2005) Preparación de muestras para el análisis de ácidos grasos de cadena corta. Universidad Autónoma de Barcelona: 6 pp.

PNT: CAA/TA/0030-00 (2006) Determinació del nivell d'hemòlisi en eritròcits. Universidad Autónoma de Barcelona: 5 pp.

PNT: CAA/TA/0031-00 (2006) Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico TBARs. Universidad Autónoma de Barcelona: 5 pp.

R

Rehman, H., Böhm, J., y Zentek, J. (2007) Effects of differentially fermentable carbohydrates on the microbial fermentation profile of the gastrointestinal tract of broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* Journal compilation: 10pp.

Robey, W. y Shermer, W. (1994) The damaging effects of oxidation. *Feed mix* 2:22-26.

Ruiz, J.A., Perez-Vendrell, A.M., y Esteve-Garcia, E. (1999) Effect of beta-carotene and vitamin E on peroxidative stability in leng meat of broiler fed different supplemental fats. *J.Agric.Food Chem.* 47:454-467.

S

Salanitro, J.P., Blake, I.G., Muirhead, P.A., Maglio, M., y Goodman, J.R. (1978) Bacteria Isolated From Duodenum, Ileum, And Cecum Of Young Chicks. *Appl.Environ.Microbiol.* 35:782-790.

SCF (2002a) Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General Scientific Committee on Food:1-84.

SCF (2002b) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Occurrence in Foods, dietary exposure and health effect: Scientific opinion. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. Scientific Committee on Food:1-195.

Schechter, A., Birnbaum, L., Ryan, J.J., y Constable, J.D. (2006) Dioxins: An overview. *Environ. Res.* 101:419-428.

Schiavone, A., Baucells M.D., y Barroeta, A.C. (2005) Oxidative status of dietary fat influences lipid stability of erythrocytes in chickens. 9th Congress of the european society of veterinary and comparative nutrition 97-97.

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.* 71:53-65.

Sheehy, P.J.A., Morrissey, P.A., y Flynn, A. (1993) Influence Of Heated Vegetable-Oils And Alpha-Tocopheryl Acetate Supplementation On Alpha-Tocopherol, Fatty-Acids And Lipid-Peroxidation In Chicken Muscle. *Br.Poult.Sci.* 34:367-381.

Simon, O., Manner, K., Schafer, K., Sagredos, A., y Eder, K. (2000) Effects of conjugated linoleic acids on protein to fat proportions, fatty acids, and plasma lipids in broilers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102:402-410.

Sklan, D. y Noy, Y. (2003) Functional development and intestinal absorption in the young poult. *Br.Poult.Sci.* 44:651-658.

Staprans, I., Rapp, J.H., Pan, X.M., y Feingold, K.R. (1996a) Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats. *J.Lipid Res.* 37:420-430.

Staprans, I., Rapp, J.H., Pan, X.M., Hardman, D.A., y Feingold, K.R. (1996b) Oxidized lipids in the diet accelerate the development of fatty streaks in cholesterol-fed rabbits. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biol.* 16:533-538.

Stender, S. y Dyerberg, J. (2004) Influence of trans fatty acids on health. *Ann.Nutr.Metab.* 48:61-66.

T

Tard, A., Gallotti, S., Leblanc, J.C., y Volatier, J.L. (2007) Dioxins, furans and dioxins-like PCBs: Occurrence in food and dietary intake in France. *Food Addit. Contam.* 24:1007-1017.

Teitelbaum, J.E. y Walker, W.A. (2001) Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. *J. Nutr. Biochem.* 12:21-32.

Topping, D.L. y Clifton, P.M. (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Reviews* 81:1031-1064.

Torok, V.A., Ophel-Keller, K., Hughes, R.J., Forder, R., Ali, M., y Macalpine, R. (2007) Environment and Age: Impact on Poultry Gut Microflora. *Aust.Poult.Sci.Symp* 149-152.

Turek, J.J., Watkins, B.A., Schoenlein, I.A., Allen, K.G.D., Hayek M.G., y Aldrich, C.G. (2003) Oxidized lipid depresses canine growth, immune function, and bone formation. *J. Nutr. Biochem.* 14:24-31.

U

Udilova, N., Jurek, D., Marian, B., Gille, L., Schulte-HErmann, R., y Nohl, H. (2003) Induction of lipid peroxidation in biomembranes by dietary oil components. *Food Chem.Toxicol.* 41:1481-1489.

Uni, Z., Smirnov, A., y Sklan, D. (2003) Pre-and Posthatch development of Goblett cells in the broiler small intestine: Effect of delayed acces to feed. *Poult.Sci.* 82:320-327.

Uni, Z., R.Platin, y D.Sklan (1998) Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. *J Comp Physiol B* 168:241-247.

V

van der Wielen, P.W.J.J., Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings, B.A.P., y van Knapen, F. (2000) Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Appl.Environ.Microbiol.* 66:2536-2540.

van der Wielen, P.W.J.J., Keuzenkamp, D.A., Lipman, L.J.A., van Knapen, F., y Biesterveld, S. (2002) Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microb.Ecol.* 44:286-293.

vanSchooten, F.J., Moonen, E.J.C., vanderWal, L., Levels, P., y Kleinjans, J.C.S. (1997) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their metabolites in blood, feces, and urine of rats orally exposed to PAH contaminated soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33:317-322.

- Venereo, J.R. (2002) Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev.Cubana Med.Milit.* 31:126-133.
- Villar, M. (2004) Determinación y distribución de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el tratamiento de lodos de edars. Universidad de Sevilla. Tesis Doctoral: 384 pp.
- Villaverde, C. (2005) Interaction between dietary poliunsaturated fatty acids and vitamin E in body lipid composition and α -tocoferol content of broiler chickens. Universidad Autónoma de Barcelona . Doctoral Thesis: 141 pp.
- Villaverde, C., Baucells, M.D., Manzanilla, E.G., y Barroeta, A.C. (2008) High levels of dietary unsaturated fat decrease alpha-tocopherol content of whole body, liver, and plasma of chickens without variations in intestinal apparent absorption. *Poult.Sci.* 87:497-505.
- Villaverde, C., Cortinas, L., Barroeta, A.C., Martin-Orué, S., y Baucells, M.D. (2004) Relationship between dietary unsaturation and vitamin E in poultry. *J.Anim.Physiol. Anim.Nutr.* 88:143-149.

W

- Wahrburg, U., Kratz, M., y Cullen, P. (2002) Mediterranean diet, olive oil and health. *European J. Lipid Sci. Technol.* 104:698-705.
- Wang, S.Y., Bottje, W., Maynard, P., Dibner, J., y Shermer, W. (1997) Effect of santoquin(R) and oxidized fat on liver and intestinal glutathione in broilers. *Poult.Sci.* 76:961-967.
- Williams, B.A., Verstegen, M.W.A., y Tamminga, S. (2001) Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutr. Res. Reviews* 14:207-227.
- Wills, E.D. (1969) Lipid peroxide formation in microsomes. General considerations. *Biochem.J.* 113:315-315.

Y

- Yang, X.J., Guo, Y.M., Wang, Z., y Nie, W. (2006) Fatty acids and coccidiosis: effects of dietary supplementation with different oils on coccidiosis in chickens. *Avian Pathol.* 35:373-378.
- Yin, J.D., Shang, X.G., Li, D.F., Wang, F.L., Guan, Y.F., y Wang, Z.Y. (2008) Effects of dietary conjugated linoleic acid on the fatty acid profile and cholesterol content of egg yolks from different breeds of layers. *Poult.Sci.* 87:284-290.

Z

- Zhu, X.Y. y Joerger, R.D. (2003) Composition of microbiota in content and mucus from caecae of broiler chickens as measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Poult.Sci.* 82:1242-1249.
- Zumbado, M.E., Scheele, C.W., y Kwakernaak, C. (1999) Chemical Composition, Digestibility, and Metabolizable Energy Content of Different Fats and Oil By-products. *J.Appl.Poult.Res.* 8:271-

9. ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 1. Dioxinas y PCBs permitidos por la legislación vigente en ingredientes para la fabricación de los piensos para animales. Directiva 2006/13/CE (2006)

Sustancias indeseables	Productos destinados a la alimentación animal	Contenido máximo en piensos calculado sobre la base de un contenido de humedad del 12 %
(1)	(2)	(3)
27a) Dioxina [suma de policlorodibenzo-para-dioxinas (PCDD) y policlorodibenzofuranos (PCDF)] expresada en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (EQT-OMS), utilizando los factores de equivalencia de toxicidad de la misma organización (FET-OMS, 1997) (*)	a) Materias primas para la alimentación animal de origen vegetal, excepto los aceites vegetales y sus subproductos	0,75 ng EQT PCDD/F OMS/kg (**)(***)
	b) Aceites vegetales y sus subproductos	0,75 ng EQT PCDD/F OMS/kg (**)(***)
	c) Materias primas para la alimentación animal de origen mineral	1,0 ng EQT PCDD/F OMS/kg (**)(***)
	d) Grasa animal, incluida la grasa de leche y la grasa de huevo	2,0 ng EQT PCDD/F OMS/kg (**)(***)
	e) Otros productos de animales terrestres, incluidos la leche y los productos lácteos y los huevos y los ovoproductos	0,75 ng EQT PCDD/F OMS/kg (**)(***)
	f) Aceite de pescado	6,0 ng EQT PCDD/F OMS/kg (**)(***)
	g) Pescados, otros animales acuáticos, sus productos y subproductos, excepto el aceite de pescado y los hidrolisatos de proteínas de pescado que contengan más de un 20 % de grasa (***)	1,25 ng EQT PCDD/F OMS/kg (**)(***)
	h) Hidrolisatos de proteínas de pescado que contengan más de un 20 % de grasa	2,25 ng EQT PCDD/F OMS/kg (**)(***)
	i) Los aditivos, arcillas caolínicas, sulfato de calcio dihidratado, vermiculita, natrolita-fonolita, aluminatos de calcio sintéticos y clinoptilolita de origen sedimentario pertenecientes al grupo de los aglutinantes y antiaglomerantes	0,75 ng EQT PCDD/F OMS/kg (**)(***)
	j) Aditivos pertenecientes al grupo funcional de los compuestos de oligoelementos	1,0 ng EQT PCDD/F OMS/kg (**)(***)
	k) Premezclas	1,0 ng EQT PCDD/F OMS/kg (**)(***)
	l) Piensos compuestos, excepto los piensos para animales de peletería, de compañía y para peces	0,75 ng EQT PCDD/F OMS/kg (**)(***)
	m) Piensos para peces. Alimentos para animales de compañía	2,25 ng EQT PCDD/F OMS/kg (**)(***)
27b) Suma de dioxinas y de PCB similares a las dioxinas [suma de policlorodibenzo-para-dioxinas (PCDD), policlorodibenzofuranos (PCDF) y bifenilos policlorados (PCB)] expresada en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (EQT-OMS), utilizando los factores de equivalencia de toxicidad de la misma organización (FET-OMS, 1997) (*)	a) Materias primas para la alimentación animal de origen vegetal, excepto los aceites vegetales y sus subproductos	1,25 ng EQT PCDD/F-PCB OMS/kg (**)
	b) Aceites vegetales y sus subproductos	1,5 ng EQT PCDD/F-PCB OMS/kg (**)
	c) Materias primas para la alimentación animal de origen mineral	1,5 ng EQT PCDD/F-PCB OMS/kg (**)
	d) Grasa animal, incluida la grasa de leche y la grasa de huevo	3,0 ng EQT PCDD/F-PCB OMS/kg (**)

(1)	(2)	(3)
	e) Otros productos de animales terrestres, incluidos la leche y los productos lácteos y los huevos y los ovoproductos	1,25 ng EQT PCDD/F-PCB OMS/kg (**)
	f) Aceite de pescado	24,0 ng EQT PCDD/F-PCB OMS/kg (**)
	g) Pescados, otros animales acuáticos, sus productos y subproductos, excepto el aceite de pescado y los hidrolisatos de proteínas de pescado que contengan más de un 20 % de grasa (***)	4,5 ng EQT PCDD/F-PCB OMS/kg (**)
	h) Hidrolisatos de proteínas de pescado que contengan más de un 20 % de grasa	11,0 ng EQT PCDD/F-PCB OMS/kg (**)
	i) Aditivos pertenecientes al grupo funcional de los aglutinantes y antiaglomerantes	1,5 ng EQT PCDD/F-PCB OMS/kg (**)
	j) Aditivos pertenecientes al grupo funcional de los compuestos de oligoelementos	1,5 ng EQT PCDD/F-PCB OMS/kg (**)
	k) Premezclas	1,5 ng EQT PCDD/F-PCB OMS/kg (**)
	l) Piensos compuestos, excepto los piensos para animales de peletería, de compañía y para peces	1,5 ng EQT PCDD/F-PCB OMS/kg (**)
	m) Piensos para peces. Alimentos para animales de compañía	7,0 ng EQT PCDD/F-PCB OMS/kg (**)

(*) FET fijados por la OMS a efectos de la evaluación del riesgo para la salud humana, basados en las conclusiones de la reunión de la OMS celebrada en Estocolmo (Suecia) del 15 al 18 de junio de 1997 (Van den Berg y otros, 1998). Factores de equivalencia tóxica (FET) para los PCB, PCDD y PCDF en seres humanos y animales. *Environmental Health Perspectives*, 106(12), 775.

Congéneres	Valor FET	Congéneres	Valor FET
Dibenzo-p-dioxinas (PCDD)		PCB "similares a las dioxinas"	
2,3,7,8-TCDD	1	PCB no-orto + PCB mono-orto	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB no-orto	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,01
OCDD	0,0001		
Dibenzofuranos (PCDF)		PCB mono-orto	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 114	0,0005
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 118	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,0001
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Abreviaturas utilizadas: "T" = tetra; "Pe" = penta; "Hx" = hexa; "Hp" = hepta; "O" = octa; "CDD" = clorodibenzodioxina; "CDF" = clorodibenzofurano; "CB" = clorobifenilo.

(**) Concentraciones del límite superior; las concentraciones del límite superior se calculan dando por sentado que todos los valores de las diferentes sustancias afines que estén por debajo del límite de detección son iguales a este límite.

(***) El contenido máximo específico para las dioxinas (PCDD/F) sigue siendo aplicable durante un período de tiempo determinado. Durante dicho período temporal, los productos destinados a la alimentación animal mencionados en el punto 27 a) deben cumplir los contenidos máximos de dioxinas y los contenidos máximos de la suma de dioxinas y PCB similares a las dioxinas.

(****) El pescado fresco suministrado directamente y utilizado sin tratamiento intermedio para la producción de piensos destinados a animales de peletería no está sujeto al contenido máximo, aunque los contenidos máximos de 4,0 ng EQT PCDD/F OMS/kg de producto y 8,0 ng EQT PCDD/F OMS/kg son aplicables al pescado fresco utilizado para la alimentación directa de los animales de compañía, de zoológicos o de circos. Los productos y las proteínas transformadas que se hayan elaborado a partir de estos animales (de peletería, compañía, zoológicos o circos) no pueden entrar en la cadena alimentaria, y está prohibido utilizarlos en la alimentación de animales de granja mantenidos, cebados o criados para la producción de alimentos.

ANEXO 2

Tabla 2A. Perfil de ácidos grasos de las materias grasas de las 4 pruebas experimentales

Grasas añadidas a piensos experim.		Composición en ácidos grasos expresado en % (ISSO 5508-1990)																			
		C12:0	C14:0	C 14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2 n-6	C18:3 n-3	C20:0	C20:1	C20:4 n-6	C20:4 n-3	C20:5	C22:1	C22:5	C22:6
<i>Trans</i>	High	0,2	1,3			49,58				33,2	15,22			0,43							
	Low		1,3			48,33				4,18	36,77	8,7	0,29	0,29	0,16						
DioxPCBs	High		4,8		0,39	14,75	6,49			3	25,33	6,41	2,06	0,21	5,71	0,66	1,41	7,46	5,45	2,95	10,83
	Low		4,7	0,06	0,78	19,19	6,83	0,84	0,87	4,77	19,71	2,45	0,81	0,031	3,71	1,38	0,69	8,32	2,97	1,72	17,84
PAHs	High					14,58	0,83	0,08	0,08	3,91	68,41	10,51	0,82	0,45	0,33						
	Low					15,97	1,23	0,06	0,1	2,48	69,62	9,16	0,69	0,41	0,29						
Oxidación	High		0,07			10,48	0,65	0,06	0,1	3,2	43,94	40,68	0,25	0,31	0,25						
	Low		0,06			8,76	0,48	0,06	0,08	3,24	38,44	48,19	0,19	0,29	0,21						

Análisis realizado en el Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Barcelona

Tabla 2B. Contenido de ácidos grasos de las materias grasas de los 4 experimentos (Resumen)

Experim	Trat	AGS	AGMI	AGPI	Insat	Sat/insat
<i>Trans</i>	HT	84,8	15,2	0,0	15,2	5,57
	LT	54,1	36,9	9,0	45,9	1,18
Diox-PCBs	HD	23,2	43,0	31,8	74,8	0,31
	LD	30,3	34,2	33,2	67,4	0,45
HAPs	HP	19,0	69,7	11,3	81,0	0,23
	LP	18,9	71,2	9,9	81,1	0,23
Oxidación	HO	14,1	44,9	40,9	85,9	0,16
	LO	12,4	39,2	48,4	87,6	0,14

Análisis realizado en el Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Barcelona

ANEXO 3

Tabla 3. Presencia de compuestos de alteración, colesterol y parámetros de calidad de las materias grasas de las 4 pruebas experimentales

Grasas añadidas a piensos experim.		Trans TOTAL mg/100g (A)	CLA TOTAL mg/100g (A)	Cholesterol ug/g (B)	Humedad % w/w (C)	Acidez mg KOH/g (C)	Monoglicer % w/w (C)	Diglicer % w/w (C)
<i>Trans</i>	High	12398,7	ND	84	0,6	166,9	0,50	1,1
	Low	654,9	ND	53	0,7	182,8	0,90	2,8
DioxPCBs	High	1224,4	79,2	3459	< 0,1	8,9	ND	ND
	Low	902,5	53,4	10397	0,3	17,2	0,20	1,4
PAHs	High	684,9	Traces	tr	1,0	100,4	2,00	8,6
	Low	131,0	Traces	tr	3,8	108,3	1,80	7,3
Oxidación	High	153,2	ND	tr	0,1	1,15	0,13	1,6
	Low	159,8	ND	tr	0,0	0,27	0,10	1,1

A Análisis realizado en el Departamento de Ciencia de los Alimentos, Universidad de Bolonia (Italia); B Swedish University of Agricultural Science, Uppsala (Suecia); C Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Barcelona;

Tabla 4. Parámetros de oxidación lipídica y contenido de antioxidantes naturales (tocoferoles y tocotrienoles) de las materias grasas de los 4 experimentos

Grasas añadidas a piensos experim.		Valor de peróxidos (meq/kg)	Valor p-anisidina	Contenido polimeros % (w/w)	TBARs mg MDA/kg	TOCOFEROLES				TOCOTRIENOLES				Tocof+tocot mg/kg total
						alfa-T, mg/kg	beta-T, mg/kg	gamma-T, mg/kg	delta-T, mg/kg	alfa-T3, mg/kg	beta-T3, mg/kg	gamma-T3, mg/kg	delta-T3, mg/kg	
<i>Trans</i>	High	1,3	12,39	ND		64,72	0,75	1,02	0,72	46,39	14,59	43,87	17,83	189,89
	Low	4,3	77,51	ND		101,77	0,88	1,02	0,65	90,49	12,57	60,56	24,79	292,74
DioxPCBs	High	4,3	8,16	0,21	65	86,72	ND	8,64	ND	0,85	0,75	ND	ND	96,96
	Low	1,7	58,83	2,65	2819	56,55	0,27	1,04	ND	ND	0,92	ND	ND	58,78
PAHs	High	0,6	3,02	ND		248,29	3,60	11,45	1,84	2,36	6,05	4,46	ND	278,07
	Low	1,1	17,19	ND		62,89	1,30	3,27	0,39	ND	1,32	ND	ND	69,17
Oxidación	High	1,7	67,43	6,61		296,58	21,19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	317,78
	Low	5,3	2,74	0,35		460,72	23,08	6,69	ND	ND	11,47	ND	ND	501,96

Análisis realizado en el Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Barcelona

ANEXO 4

Tabla 5. Nivel de alteración o contaminación de los piensos experimentales utilizados en los 4 experimentos

Experimentos	Tratam.*	Nivel de alteración o contaminación de las dietas experimentales
1. Acidos grasos <i>Trans</i> (T)	HT	5.6 % Ácidos grasos <i>trans</i> totales ^A
	LT	0.5 % Ácidos grasos <i>trans</i> totales ^A
2. Dioxinas y PCBs (D)	HD	1.75 pg WHO-TEQ PCDD/Fs + DL-PCBs/g aceite ^B
	LD	0.59 pg WHO-TEQ PCDD/Fs + DL-PCBs/g aceite ^B
3. HAPs (P)	HP	33.97 ng PAHs/g aceite + PBDEs < 2 ng/g aceite ^C
	LP	2.07 ng PAHs/g aceite + PBDEs < 2 ng/g aceite ^C
4. Oxidación lipídica (O)	HO	15.62 valor p-anisidina ^D
	LO	4.32 valor p-anisidina ^D

*H=nivel alto; L=nivel bajo, de los productos de alteración o contaminación estudiados; ^A Análisis realizado en el Departamento de Ciencia de los Alimentos, Universidad de Bolonia (Italia); ^B TEQ=Equivalentes tóxicos; PCDD/Fs= Policloro di benzo dioxinas/furanos; DL-PCBs=Dioxin like-Policloro bifenilos; PBDEs= Difenilo éteres polibromados; Análisis realizado en el Laboratorio de Dioxinas, Departamento de Ecotecnologías, IIQAB-CSIC (España); ^C HAPs=Hidrocarburos aromáticos policíclicos; Análisis realizado en el Laboratorio Físico & Tóxico químico, Universidad de Burdeos (Francia); ^D Análisis realizado en el Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Barcelona (España)

ANEXO 5

Tabla 6. Digestibilidad fecal aparente en el experimento D¹

Balances	Parámetros (%)	Tratamientos			
		LD	HD	RSD	P valor
Primero (14 – 16 días)	DMS	69,1	68,7	1,48	0,680
	DMO	71,6	71,3	1,42	0,637
	DEE	79,8	83,6	0,82	0,0001
Segundo (37 – 39 días)	DMS	70,4	70,3	4,89	0,963
	DMO	74,1	73,2	4,43	0,711
	DEE	81,9	82,2	2,96	0,894

¹ Análisis realizado en el laboratorio de Nutrición y Alimentación Animal del *Departament de Ciència Animal i dels Aliments* de la UAB; DMS: Digestibilidad de la materia seca; DMO: Digestibilidad de la materia orgánica; DEE: Digestibilidad del extracto etéreo; LD: Nivel bajo de dioxinas y PCBs; HD: Nivel alto de dioxinas y PCBs. n=8

Tabla 7. Digestibilidad fecal aparente en el experimento P¹

Balances	Parámetros (%)	Tratamientos			
		LP	HP	RSD	P valor
Primero (14 – 16 días)	DMS	67,4	66,4	2,06	0,426
	DMO	71,1	69,9	1,74	0,227
	DEE	74,9	72,8	1,24	0,005
Segundo (37 – 39 días)	DMS	71,4	70,5	1,72	0,269
	DMO	73,8	72,9	1,73	0,334
	DEE	78,2	76,6	1,48	0,047

¹ Análisis realizado en el laboratorio de Nutrición y Alimentación Animal del *Departament de Ciència Animal i dels Aliments* de la UAB; DMS: Digestibilidad de la materia seca; DMO: Digestibilidad de la materia orgánica; DEE: Digestibilidad del extracto etéreo; LP: Nivel bajo de HAPs; HP: Nivel alto de HAPs. n=8

Tabla 8. Digestibilidad fecal aparente en el experimento O¹

Balances	Parámetros (%)	Tratamientos			
		LO	HO	RSD	P valor
Primero (14 – 16 días)	DMS	69,9	68,8	1,94	0,276
	DMO	72,1	71,4	1,89	0,455
	DEE	78,4	77,9	2,14	0,629
Segundo (37 – 39 días)	DMS	72,9	73,7	1,88	0,466
	DMO	76,5	77,2	2,13	0,430
	DEE	79,3	78,9	1,63	0,104

¹ Análisis realizado en el laboratorio de Nutrición y Alimentación Animal del *Departament de Ciència Animal i dels Aliments* de la UAB; DMS: Digestibilidad de la materia seca; DMO: Digestibilidad de la materia orgánica; DEE: Digestibilidad del extracto etéreo; LO: Nivel bajo de productos de oxidación; HO: Nivel alto de productos de oxidación. n=8