

**Universidad Pública de Navarra**

*Nafarroako Unibertsitate Publikoa*

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN  
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA*

**EFEECTO DE LA UTILIZACIÓN DE LINO EN LA ALIMENTACIÓN  
DE CORDEROS DE CEBO SOBRE EL DESARROLLO Y METABOLISMO  
DEL TEJIDO GRASO**

presentado por

JOANA DIAZ CRESPO(e)k

*aurkeztua*

**INGENIERO AGRONOMO  
NEKAZARITZA INGENIARITZA**

Junio, 2010

José Antonio Mendizabal Aizpuru, Profesor del Área de Producción Animal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Pública de Navarra.

INFORMA: que el Proyecto Fin de Carrera titulado “Efecto de la utilización de lino en la alimentación de corderos de cebo sobre el desarrollo y metabolismo del tejido graso” que presenta la alumna Joana DIAZ CRESPO, ha sido realizado en el Departamento de Producción Agraria bajo mi dirección, cumple las condiciones exigidas y autorizo su presentación.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Pamplona a 11 de Junio de 2010.

Fdo.: José Antonio Mendizabal Aizpuru

## AGRADECIMIENTOS

No puedo terminar este trabajo, sin agradecer el apoyo recibido a todas aquellas personas que de una u otra forma me han ayudado: enseñándome, aconsejándome y, principalmente, escuchándome.

A José Antonio Mendizabal, director de este proyecto, por su constante apoyo y amabilidad; y porque siempre ha tenido tiempo para atenderme.

A Isabel Maquirriain, que siempre ha contestado con una sonrisa a todas mis preguntas, que han sido muchas. A mis jefas, por su comprensión. Y a todas mis compañeras del laboratorio; a Naia que siempre se ha ofrecido a ayudarme.

A mi familia, que “*ha sufrido*” cada uno de mis exámenes, trabajos,... y cómo no proyectos. Especialmente a mis padres, a los que les debo el haber llegado aquí.

A todos mis amigos que han seguido este trabajo y no han dejado de animarme.

A Aitor, por estar ahí.

A los 36 corderos sin los cuales esta experiencia no se hubiera podido llevar a cabo.

A todos ellos, muchas gracias.

# ÍNDICE

# ÍNDICE

Índice.....	i
Abreviaturas.....	iii
Índice de tablas.....	v
Índice de figuras.....	vii
Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
2. Revisión bibliográfica.....	5
2.1. Tejido graso: desarrollo y metabolismo.....	5
2.1.1. Desarrollo del tejido graso.....	6
2.1.2. Factores que afectan al desarrollo del tejido graso.....	9
2.1.3. Metabolismo del tejido graso.....	12
2.2. Ácidos Grasos Poliinsaturados $\omega$ -3.....	16
2.2.1. Materias primas ricas en Ácidos Grasos Poliinsaturados $\omega$ -3.....	19
2.2.2. Alimentos de origen animal enriquecidos en Ácidos Grasos Poliinsaturados $\omega$ -3.....	32
3. Objetivos y planteamiento experimental.....	38
4. Material y métodos.....	39
4.1. Animales y dietas.....	39
4.2. Sacrificio de los corderos y Toma de muestras.....	42
4.3. Cantidad de grasa.....	43
4.4. Medida del tamaño y número de adipocitos.....	44

4.4.1. Método laboratorial.....	44
4.4.2. Tamaño de adipocitos.....	45
4.4.3. Número de adipocitos.....	46
4.5. Medida de la actividad enzimática lipogénica.....	46
4.5.1. Método laboratorial.....	46
4.5.2. Estudio de la actividad enzimática lipogénica.....	47
4.6. Análisis estadístico.....	48
5. Resultados.....	50
5.1. Cantidad de grasa.....	50
5.2. Diámetro de adipocitos.....	51
5.3. Número de adipocitos.....	53
5.4. Actividades enzimáticas lipogénicas.....	53
5.4.1. Glicerol 3 Fosfato Deshidrogenasa (G3PDH).....	53
5.4.2. Sintetasa de ácidos grasos (FAS).....	55
5.4.3. Isocitrato Deshidrogenasa (ICDH).....	57
5.4.4. Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH).....	59
6. Discusión.....	62
6.1. Cantidad de grasa.....	62
6.2. Diámetro y número de adipocitos.....	64
6.3. Actividades enzimáticas lipogénicas.....	66
7. Conclusiones.....	69
8. Referencias bibliográficas.....	70
Anexos.....	80
Anexos I: Reglamento.....	80
Anexos II: Manual medición del diámetro de los adipocitos.....	85
Anexos III: Métodos de trabajo.....	94

**ABREVIATURAS**

ACG	Acilgliceroles
ALA	Ácido $\alpha$ -linolénico
ATP	Adenosín trifosfato
C	Carbono
CLA	Ácido linoleico conjugado
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
D	Depósito
DHA	Ácido docosahexaenoico
EE	Error estándar
EM	Energía metabolizable
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAS	Sintetasa de Ácidos Grasos
FEDNA	Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal
G	Grupo
G6PDH	Glucosa 6 fosfato Deshidrogenasa
G3PDH	Glicerol 3 fosfato Deshidrogenasa
ICDH	Isocitrato Deshidrogenasa
IRTA	Instituto de Investigación y Tecnología Alimentaria
IM	Intramuscular
IN	Intermuscular
L	Lote
LC	Lote Control
L5	Lote Lino 5 %
L10	Lote Lino 10 %
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MARM	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
MD	Malato Deshidrogenasa
MES	Mesentérico

MSPS	Ministerio de Sanidad y Política Social
MUFAs	Ácidos grasos monoinsaturados
nCC	Nota de Condición Corporal
OM	Omental
P	Nivel de significación
PAC	Política Agraria Común
PR	Pélvicorrenal
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
SC	Subcutáneo
TVN	Índice volátil total

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Composición en materias primas de los piensos estudiados (% de material fresca).....	40
<b>Tabla 2.-</b> Composición química de los piensos estudiados (materia fresca).....	41
<b>Tabla 3.-</b> Composición analítica del producto Valomega 160 (% de kg bruto).....	41
<b>Tabla 4.-</b> Peso medio (g) de los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC), intramuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).....	50
<b>Tabla 5.-</b> Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), interacción lote $\times$ depósito (L $\times$ D), y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para el diámetro de los adipocitos.....	51
<b>Tabla 6.-</b> Diámetro medio ( $\mu\text{m}$ ) de los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC), e intramuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).....	52
<b>Tabla 7.-</b> Número de adipocitos ( $\times 10^6$ ) de los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC), e intermuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).....	53
<b>Tabla 8.-</b> Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), interacción lote $\times$ depósito (L $\times$ D), y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para la actividad de la enzima lipogénica Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH).....	54

<b>Tabla 9.-</b> Actividad media de la enzima lipogénica Glicerol-3-Fosfato-Deshidrogenasa (nmol /min/10 <sup>6</sup> adipocitos) en los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC), e intermuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).....	54
<b>Tabla 10.-</b> Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), interacción lote × depósito (L×D), y el coeficiente de determinación (R <sup>2</sup> ) para la actividad de la enzima lipogénica Sintetasa de ácidos grasos (FAS).....	56
<b>Tabla 11.-</b> Actividad media de la enzima lipogénica FAS (nmol /min/10 <sup>6</sup> adipocitos) en los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC), e intramuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).....	56
<b>Tabla 12.-</b> Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), interacción lote × depósito (L×D), y el coeficiente de determinación (R <sup>2</sup> ) para la actividad de la enzima lipogénica Isocitrato deshidrogenasa (ICDH).....	58
<b>Tabla 13.-</b> Actividad media de la enzima lipogénica Isocitrato Deshidrogenasa (nmol /min/10 <sup>6</sup> adipocitos) en los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC), e intramuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).....	58
<b>Tabla 14.-</b> Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), interacción lote × depósito (L×D), y el coeficiente de determinación (R <sup>2</sup> ) para la actividad de la enzima lipogénica Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH).....	60
<b>Tabla 15.-</b> Actividad media de la enzima lipogénica Glucosa-6-Fosfato-Deshidrogenasa (nmol /min/10 <sup>6</sup> adipocitos) en los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC), e intramuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Tipos de tejido adiposo.....	5
<b>Figura 2.-</b> Esquema del proceso de diferenciación de los adipocitos.....	6
<b>Figura 3.-</b> Morfología de un adipocito.....	7
<b>Figura 4.-</b> Esquema de los procesos de hiperplasia e hipertrofia.....	7
<b>Figura 5.-</b> Principales vías metabólicas implicadas en la lipogénesis del tejido graso de los rumiantes .....	12
<b>Figura 6.-</b> Esquema del aparato digestivo de los rumiantes.....	13
<b>Figura 7.-</b> Proceso de biohidrogenación ruminal.....	14
<b>Figura 8.-</b> Biosíntesis de los ácidos grasos.....	18
<b>Figura 9.-</b> Plantas y semillas de lino.....	20
<b>Figura 10.-</b> Algas Sargassum (Sargassaceae).....	23
<b>Figura 11.-</b> Árbol, frutos y semillas de argán.....	24
<b>Figura 12.-</b> Plantas y semillas de chía.....	25
<b>Figura 13.-</b> Plantas de colza durante la floración y semillas.....	26
<b>Figura 14.-</b> Harina de pescado.....	28
<b>Figura 15.-</b> Plantas y habas de soja.....	30
<b>Figura 16.-</b> Finca experimental “El Serrón” en Valtierra.....	39
<b>Figura 17.-</b> Corderos de raza Navarra del lote lino 10 %.....	42
<b>Figura 18.-</b> Toma de muestras de los distintos depósitos.....	43
<b>Figura 19.-</b> Picado de las muestras.....	44
<b>Figura 20.-</b> Muestras almacenadas en estufa.....	44
<b>Figura 21.-</b> Analizador de imágenes.....	45
<b>Figura 22.-</b> Imágenes microscópicas (x 300).....	45
<b>Figura 23.-</b> Espectrofotómetro.....	47
<b>Figura 24.-</b> Representación gráfica de los diámetros medios ( $\mu\text{m}$ ) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).....	52

<b>Figura 25.-</b> Representación gráfica de la actividad media de la enzima lipogénica Glicerol-3-Fosfato-Deshidrogenasa (nmol /min/10 <sup>6</sup> adipocitos) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).....	55
<b>Figura 26.-</b> Representación gráfica de la actividad media de la enzima lipogénica Sintetasa de ácidos grasos (nmol /min/10 <sup>6</sup> adipocitos) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).....	57
<b>Figura 27.-</b> Representación gráfica de la actividad media de la enzima lipogénica Sintetasa de ácidos grasos (nmol /min/10 <sup>6</sup> adipocitos) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).....	59
<b>Figura 28.-</b> Representación gráfica de la actividad media de la enzima lipogénica Glucosa-6-Fosfato-Deshidrogenasa (nmol /min/10 <sup>6</sup> adipocitos) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).....	61

# RESUMEN

## RESUMEN

Título del trabajo: “Efecto de la utilización de lino en la alimentación de corderos de cebo sobre el desarrollo y metabolismo del tejido graso”.

Tutor: José Antonio Mendizabal Aizpuru

### RESUMEN

Los malos hábitos de vida (mala alimentación, sedentarismo, estrés,...), han favorecido la aparición de enfermedades cardiovasculares, obesidad,... Todo ello ha ocasionado que, en la actualidad, el consumidor ya no se preocupe únicamente de la calidad organoléptica de los alimentos, sino que el cuidado de la alimentación haya tomado tal importancia que el comprador se preocupe asimismo de su composición, principalmente de la composición de su grasa.

En este sentido, los productores de alimentos, como los ganaderos, han de adaptarse a las preferencias de los consumidores. Por ello, es cada vez más frecuente la utilización de materias primas, con una composición rica en ácidos grasos tipo omega 3, como es el caso del lino, para obtener carnes con una composición grasa adecuada.

El presente trabajo se engloba dentro de un proyecto de investigación en el que se pretende estudiar el efecto de la utilización de lino en la alimentación de corderos de cebo sobre las características de crecimiento y de la canal, sobre el desarrollo y metabolismo del tejido graso y la composición en ácidos grasos de dicha grasa. Concretamente en este Trabajo Fin de Carrera se ha estudiado el efecto de la utilización de lino en las dietas de corderos sobre el desarrollo y metabolismo del tejido graso.

Para ello se han utilizado 36 corderos machos de raza Navarra repartidos de forma homogénea en tres lotes (n=12), en función de la cantidad de lino aportado en su dieta:

- a) LOTE 1: lote control (sin lino)
- b) LOTE 2: 5% de lino
- c) LOTE 3: 10% de lino

Los corderos fueron sacrificados con  $26,45 \pm 0,95$  Kg de peso vivo y  $93,7 \pm 8,86$  días de edad, siguiendo el manejo típico de los corderos de tipo ternasco. Tras el sacrificio, se extrajo y se pesó la cantidad de grasa pélvicorrenal (PR), se realizó la disección de la 10ª costilla para analizar la cantidad de grasa subcutánea (SC) de la misma y en el *Longissimus dorsi* se determinó mediante análisis de imagen la cantidad de grasa intramuscular (IM). Así mismo, en estos 3 depósitos grasos, se determinó el tamaño y número de adipocitos mediante el método de la colagenasa. Por último, se cuantificó la actividad de las enzimas lipogénicas Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH), Sintetasa de ácidos grasos (FAS), Isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

Los resultados obtenidos muestran que no hubo efecto de la inclusión del lino en las raciones de los corderos sobre el engrasamiento de los corderos. Únicamente en el depósito PR se encontró una tendencia a la significación estadística a que los corderos que consumieron lino mostraran un mayor engrasamiento ( $P=0,07$ ). Tampoco hubo diferencias entre lotes en el tamaño y número de adipocitos ni en la actividad de las enzimas lipogénicas. Solamente, se encontraron diferencias significativas al comparar la actividad de las enzimas lipogénicas en los diferentes depósitos grasos de manera que, en general, la mayor actividad enzimática se produjo en el depósito intramuscular y la menor en el pélvicorrenal. Ello podría estar relacionado con el orden de precocidad de los depósitos grasos, de manera que cuando se sacrificaron estos corderos (3 meses) el depósito PR (precoz) podría haber superado ya su momento de máxima intensidad de desarrollo mientras que en el depósito IM (tardío) ello podría estar ocurriendo en ese momento.

En definitiva, se puede afirmar que la utilización de lino (en proporciones del 5-10 %) en las raciones de corderos de tipo ternasco con objeto de obtener carnes enriquecidas en ácidos grasos omega 3 no conlleva cambios ni en el desarrollo ni en el metabolismo del tejido graso.

# INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

El sector ovino y caprino representa, en términos de renta final, el 11,5% de la producción ganadera en 2007, con una reducción del -2,8% respecto al ejercicio interior, y del -8,6% con respecto al ejercicio 2005. Esta reducción es debida tanto a razones coyunturales (la aparición de lengua azul durante 2007 en determinadas zonas del país y el encarecimiento de los precios de las materias primas para alimentación animal) como estructurales (reducción de censos tras la aplicación de la Reforma de la PAC) (MARM) (Fernández, 2008).

En los últimos tiempos, la población española en general ha ido abandonando los hábitos alimentarios propios de la dieta mediterránea con el consiguiente perjuicio para su salud (MSPS) (Bondia, 2007). Prueba de ello es el creciente problema de la obesidad. Al mismo tiempo, en el mercado han ido apareciendo productos con un valor añadido, alimentos que han sido enriquecidos mediante el manejo de la dieta del animal o mediante la adición de nutrientes de otras fuentes naturales.

A nivel mundial, los consumidores cada vez se interesan más por una dieta saludable y sensorialmente atractiva. En este sentido, la preocupación por el contenido y tipo de grasas de los productos cárnicos es creciente (Echenique *et al.*, 2009). Además, varios organismos han recomendado no sólo reducir la ingesta de grasa y colesterol, sino mejorar la composición de esta fracción grasa aumentando los ácidos grasos poliinsaturados, principalmente los de la familia  $\omega$ -3, y reduciendo los ácidos grasos saturados (American Herat Association, 2001; Food and Nutrition Board, 2005 en Tres, 2009). Ello está conduciendo a la búsqueda de estrategias para mejorar la composición lipídica de muchos alimentos, entre ellos las carnes.

La carne de los rumiantes es rechazada por algunos grupos de consumidores debido a su alto contenido en ácidos grasos saturados y bajo en ácidos grasos  $\omega$ -3. Una vía para reducir la relación  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 es a través de la alimentación. Los aceites vegetales como el de lino, las harinas y aceites de pescado y las microalgas han sido utilizados en la dieta de los rumiantes para obtener niveles elevados de ácidos grasos  $\omega$ -3 en sus tejidos (Cañeque *et al.*, 2009).

En este contexto, el presente trabajo fin de carrera está incluido en un proyecto de investigación del Área de Producción Animal, titulado **“Enriquecimiento en ácidos grasos saludables (poliinsaturados y  $\omega$ -3) de la carne de cordero de Raza Navarra mediante la utilización de fuentes alimenticias (semilla de lino, algas marinas, chía)”**, que estudiará el posible efecto que tiene una alimentación enriquecida en ácidos grasos poliinsaturados ricos en  $\omega$ -3 durante el crecimiento y cebo de los corderos. En este Trabajo Fin de Carrera se estudiará la inclusión en la dieta de corderos de diferentes proporciones de lino, una de las materias primas utilizadas en alimentación animal más ricas en ácidos grasos  $\omega$ -3. Más concretamente, se estudiará el efecto que la ingestión de lino puede tener sobre el desarrollo y metabolismo del tejido graso, quedando el estudio del efecto de su ingestión sobre los índices productivos y sobre la composición en ácidos grasos como tema de otros dos Trabajos Fin de Carrera.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

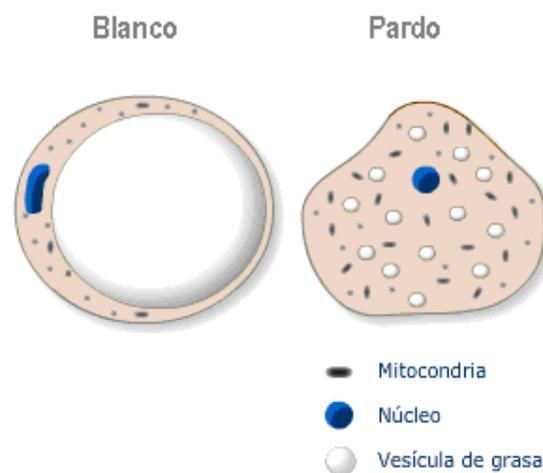
## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. TEJIDO GRASO: DESARROLLO Y METABOLISMO

El tejido adiposo es la mayor reserva energética en los animales, se utiliza como reservorio de triglicéridos en periodos durante los cuales existe un exceso de energía y se moviliza durante periodos de privación de ésta (González *et al.*, 2008).

Existen dos grandes tipos de tejido adiposo: el tejido adiposo blanco (es la forma predominante en animales adultos) y el tejido adiposo pardo (sólo aparece en animales hibernantes). Ambos tienen capacidad de metabolizar y almacenar lípidos; sin embargo, presentan diferencias no sólo en cuanto a su coloración y localización, sino también en cuanto a su morfología, distribución, genética y función.

Figura 1.- Tipos de tejido adiposo



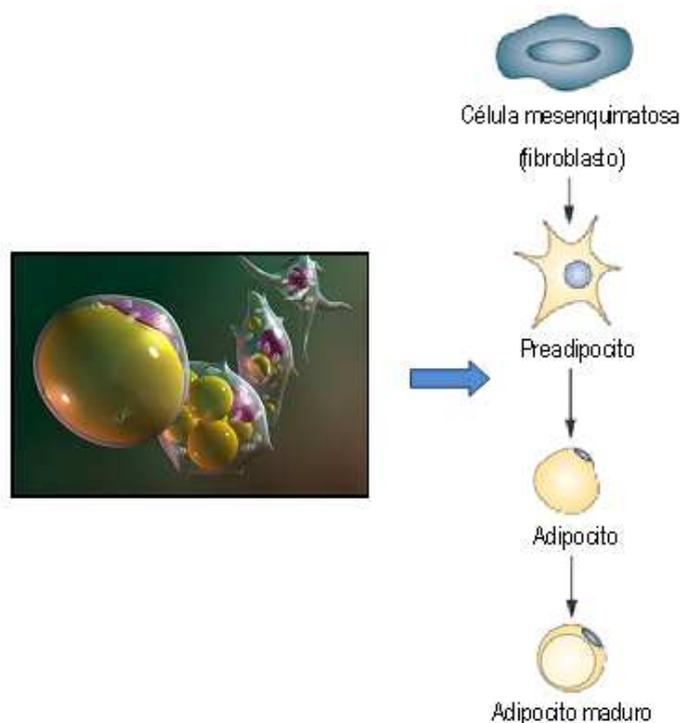
Entre una y dos terceras partes del tejido adiposo está formado por adipocitos, el resto son preadipocitos, fibroblastos y otros tipos celulares como pericitos, células endoteliales y sanguíneas (González *et al.*, 2008).

En los apartados siguientes se describe el proceso de desarrollo y el metabolismo de este tejido tan importante por su papel de reservorio energético y por su influencia sobre las características organolépticas de la carne.

### 2.1.1. Desarrollo del tejido graso

Los adipocitos se forman a partir de una célula madre multipotencial que da lugar a un adipoblasto unipotencial. De los adipoblastos, algunos se diferencian y se dotan de enzimas lipogénicas y lipolíticas, aumentan su sensibilidad a la insulina y catecolaminas, etc. Así, se convierten en preadipocitos que almacenan lípidos en su citoplasma. En el momento en el que las gotas lipídicas se fusionan con la vacuola lipídica, se consideran adipocitos (Vernon, 1986).

Figura 2.- Esquema del proceso de diferenciación de los adipocitos



Los adipocitos maduros son células esféricas, muy grandes (en rumiantes pueden alcanzar un volumen de 2-3 nanolitros) (Vernon, 1986). Poseen una gran vacuola lipídica central

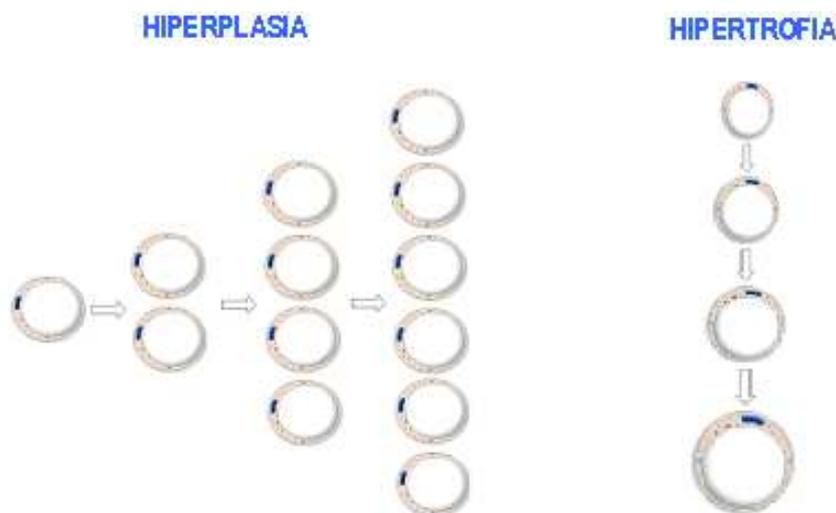
característica rodeada por una fina capa de citoplasma. El núcleo es aplanado y está desplazado a la periferia de la célula. En el citoplasma destacan pequeñas mitocondrias, un pequeño complejo de Golgi y canales tortuosos del retículo endoplasmático liso (Paniagua *et al.*, 1993).

Figura 3.- Morfología de un adipocito



El crecimiento del tejido adiposo se produce por la combinación de dos procesos: la hiperplasia o aumento del número de los adipocitos y la hipertrofia o aumento de su tamaño (véase Fig. 4). La hiperplasia ocurre por proliferación de los preadipocitos y su posterior diferenciación (González *et al.*, 2008); la hipertrofia se debe a la acumulación de lípidos, en forma de triglicéridos (resultado de la esterificación entre el glicerol-3-fosfato y los ácidos grasos), en su citoplasma.

Figura 4.- Esquema de los procesos de hiperplasia e hipertrofia



Ambos procesos tienen lugar durante las primeras etapas de crecimiento de los animales; sin embargo, en animales adultos predomina la hipertrofia de los adipocitos (Mendizabal *et al.*, 1997).

En la especie ovina, tras el nacimiento, se da un desarrollo intenso del tejido graso puesto que los corderos se alimentan de forma casi exclusiva con leche materna (con elevado contenido graso y energético) (Vernon, 1986).

El destete supone un cambio muy brusco, tanto en la alimentación del animal como en su medio, que implica una ralentización del crecimiento y una pérdida de reservas lipídicas llegando a estimarse que las pérdidas de grasa producidas en esta etapa en corderos pueden ser de 0,5 kg (Mendizabal *et al.*, 1997).

Durante el período del cebo, se produce una deposición rápida y continuada de tejido graso, debido al aumento de la actividad lipogénica de las células grasas (Hood y Thornton, 1980).

Al estudiar el tejido graso durante el crecimiento y engorde de corderos, Haugebak *et al.* (1974) concluyeron que el proceso de hipertrofia se daba en los tejidos subcutáneo y pélvicorrenal a lo largo de toda la fase de acabado; mientras que, en el tejido intramuscular sólo se daba al inicio. La hiperplasia ocurría durante la fase de acabado en los tejidos subcutáneo e intramuscular de corderos alimentados con una dieta de mantenimiento. En el tejido pélvicorrenal, también se observó en corderos alimentados "*ad libitum*". Nougues y Vézinhel (1977) también comprobaron que el grado de hipertrofia e hiperplasia variaba en función del depósito.

Purroy *et al.* (1995) estudiaron la variación del tamaño y del número de los adipocitos durante el crecimiento de corderos de raza Rasa Aragonesa. Para ello, compararon los adipocitos de la grasa acumulada en corderos agrupados en tres lotes que diferían en el peso y la edad al sacrificio. Así, el G12 era sacrificado en el momento del destete (a los  $32 \pm 5$  días de edad y un peso vivo de  $11,7 \pm 0,67$  Kg); el G24, una vez alcanzados los  $24,5 \pm 0,57$  kg (a los  $89 \pm 8$  días de edad) y, finalmente; el G36 se sacrificaba cuando alcanzaba un peso vivo de  $35,8 \pm 1,74$  kg (con una edad de  $123 \pm 8$  días). Como resultado encontraron que a medida que aumentaba el

peso vivo del sacrificio, existía un incremento significativo en la cantidad de grasa acumulada en los depósitos grasos. Del mismo modo ocurría con el tamaño de los adipocitos; esto se explicó ya que la hipertrofia era mayor entre los 24 y 36 kg que entre los 12 y 24 kg. Sin embargo, esto no se daba en el depósito intermuscular en el que las diferencias significativas se encontraban entre los pesos límites. El número de los adipocitos de los depósitos omental y mesentérico aumentaban significativamente durante el periodo estudiado; no obstante, este aumento no se daba ni en el depósito pélvicorrenal ni en la grasa subcutánea o de cobertura. Resultados semejantes fueron obtenidos por Purroy *et al.* (1997) al estudiar corderos de la raza Latxa.

### 2.1.2. Factores que afectan al desarrollo del tejido graso

En el desarrollo de los diferentes depósitos grasos, los procesos de hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos no tienen lugar al mismo tiempo ni con la misma intensidad dependiendo de factores como la raza, el sexo, la alimentación o la localización anatómica del depósito graso considerado (Hood 1982), además del entorno medioambiental (Kempster, 1981b). Su distribución varía entre especies; además, en los animales productores de carne la determinación de la calidad de la canal y de la carne depende de la distribución y cantidad de la grasa.

Las diferencias entre razas se manifiestan tanto en la cantidad de grasa acumulada como en su distribución en los diversos depósitos (Alzón *et al.*, 2003).

Purroy *et al.* (1997) estudiaron el crecimiento de corderos de raza Latxa y comprobaron como el engrasamiento era más rápido entre los 24 y los 36 kg que entre los 12 y los 24 kg. Resultados semejantes fueron obtenidos en corderos de raza Rasa Aragonesa (Purroy *et al.*, 1995).

Soret *et al.* (1998) compararon el contenido graso en corderos de las razas Latxa y Rasa Aragonesa comprobando como ésta última mostraba mayor cantidad de grasa en todos los pesos estudiados; sin embargo, sólo en los corderos de 12 kg de peso vivo se debía a un mayor número de adipocitos (o lo que es lo mismo a una intensa hiperplasia), mientras que a los 24 y 36 kg se correspondía a un tamaño mayor de éstos.

En ganado vacuno, al comparar las diferentes razas cárnicas españolas, también se encontraron diferencias significativas entre razas, de manera que a igual peso de sacrificio las más mejoradas (Asturiana, Rubia Gallega y Pirenaica) mostraban un menor engrasamiento con un menor tamaño de sus adipocitos (Alzón *et al.*, 2007).

Al tener en cuenta el factor sexo, se encuentran diferencias en la cantidad de grasa total y en su distribución. Lo que tiene su explicación en el comportamiento diferente sobre el metabolismo de machos y de hembras. Así, las hembras engrasan antes que los machos castrados, siendo los más tardíos los machos enteros (Alzón *et al.*, 2003). Ha quedado demostrado en varios experimentos que las hembras tienen un desarrollo del tejido graso más precoz que los machos. Esto queda reflejado en el mayor porcentaje de grasa, y menor de hueso y músculo, que presentan las hembras para un mismo peso canal (Mendizabal *et al.*, 1997).

En cuanto al tipo de depósito graso, se considera al depósito intermuscular como al más precoz, seguido del PR, y éste del OM, siendo el más tardío el SC. El tamaño y el número de los adipocitos varían entre los diversos depósitos. Incluso dentro de un mismo depósito, se pueden encontrar diferencias en el grado de hipertrofia según la localización de los adipocitos (Mendizabal *et al.*, 1997).

Mendizabal *et al.* (2002) al estudiar la acumulación de las reservas grasas en ganado ovino comprobaron que el depósito con mayor capacidad de almacenar o movilizar grasa era el subcutáneo, siendo el intermuscular (cuya función es estructural o de protección) el depósito con menor capacidad de almacenamiento/movilización de tejido graso.

Otro factor clave es el de la alimentación, siendo importante tener en cuenta la composición y la cantidad de alimento ingerido. Ésta influye en el desarrollo y metabolismo del tejido graso porque afecta directamente al crecimiento y a la composición corporal del animal. Además, la dieta influye de manera más notable en los animales de maduración más temprana o más predispuestos al engrasamiento (Alzón *et al.*, 2003).

En una experiencia realizado por Arana *et al.* (2005), que analizaba el posible efecto del empleo de jabones cálcicos de ácidos grasos de aceite de oliva en el pienso de corderos de

cebo de raza Rasa Aragonesa, se comprobó que los corderos a los que se les había incluido en su dieta un 5% de ácidos ricos en oleico (pienso con mayor contenido en lípidos) presentaban mayor contenido de grasa en los depósitos omental y pélvicorrenal.

Sin embargo, en un estudio llevado a cabo con 48 corderos de la raza Ripollesa, cuyo objetivo era estudiar el resultado de la suplementación de una mezcla de isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA) en la dieta suministrada durante el engorde, se observó que todos los tratamientos (pienso suplementado con 0, 0,25 y 1 % de CLA) presentaban el mismo nivel de grasa intramuscular (Terré *et al.*, 2009).

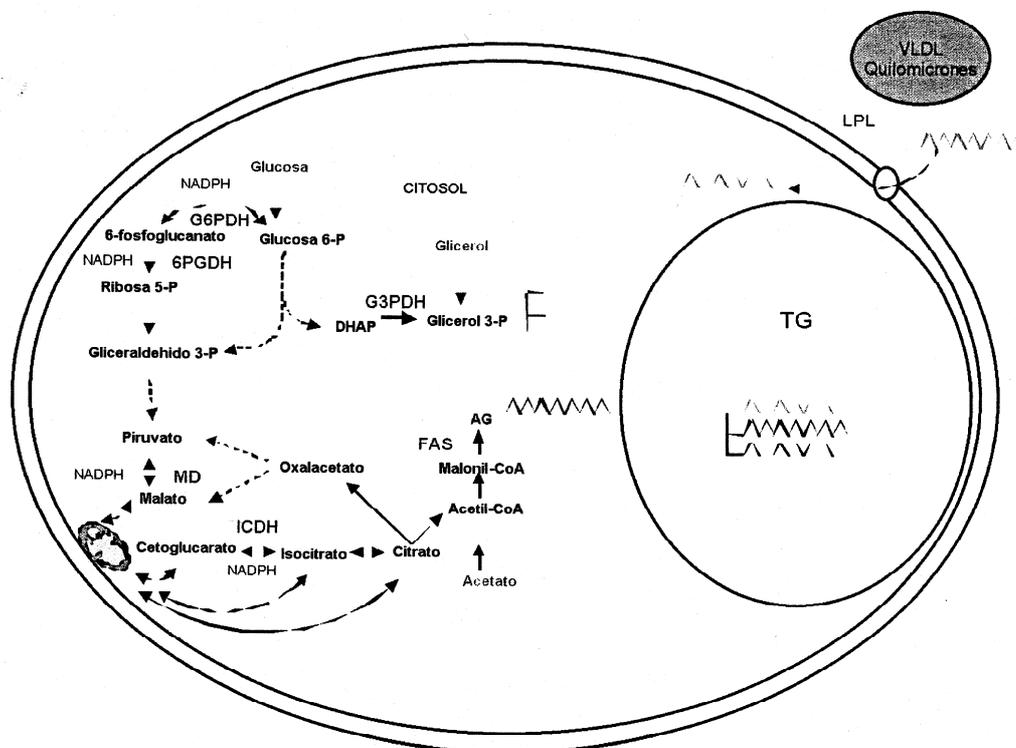
En ganado bovino, Sayed *et al.* (2007) estudiaron el efecto existente en el crecimiento, engrasamiento y en las características de la carne de terneros alimentados con raciones enriquecidas con lino y vitamina E. Para llevar a cabo dicha experiencia, se emplearon 23 terneros machos de la raza Pirenaica distribuidos en tres lotes, según el tipo de alimentación recibida. Así, el lote control se alimentaba con un pienso concentrado convencional, el lote lino recibía, además, un aporte de un 5 % de lino y al lote lino + vitamina E le correspondía una dieta suplementada con un 5 % de lino y 200 mg/kg de vitamina E. Los resultados no revelaron variaciones en el engrasamiento de la canal ni en la cantidad de grasa pélvicorrenal de los diversos lotes. Tampoco hubo diferencias en el tamaño de los adipocitos de los distintos lotes, estos sólo variaban entre depósitos, siendo los de mayor tamaño los correspondientes al depósito PR y los menores los del IM.

En ganado porcino, Echenique *et al.* (2009) no encontraron diferencias significativas en el contenido de grasa subcutánea e intramuscular, al evaluar la utilización de pasto en cerdos machos enteros y castrados criados al aire libre. Esto no concordaba con otros estudios anteriores en los que se afirmaba que el volumen del pasto actuaba como factor limitante de energía en la dieta, lo que se traducía en una reducción de la grasa intramuscular y, especialmente, de la de cobertura.

### 2.1.3. Metabolismo del tejido graso

El crecimiento de los adipocitos conlleva la acumulación de triglicéridos; los cuales son producto de la esterificación entre el glicerol 3 fosfato y los ácidos grasos. El glicerol 3 fosfato se sintetiza a partir de glucosa por la acción de la enzima glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH). La enzima sintetasa de ácidos grasos (FAS) es la encargada de la síntesis de ácidos grasos *de novo* en el interior de los adipocitos; ésta enzima demanda una fuente de carbono que, en el caso de los rumiantes, es fundamentalmente el acetato y otra de hidrógeno (cuyo origen puede estar en diversas vías metabólicas en las que principalmente intervienen la enzima mállica (MD) y la glucosa 6 fosfato deshidrogenada (G6PDH)). En el caso de los rumiantes, la energía empleada en la síntesis de los ácidos grasos se obtiene a través de la vía de las pentosas, en la que interviene la enzima NAD-isocitrato deshidrogenasa (ICDH) (Soret *et al.*, 1998).

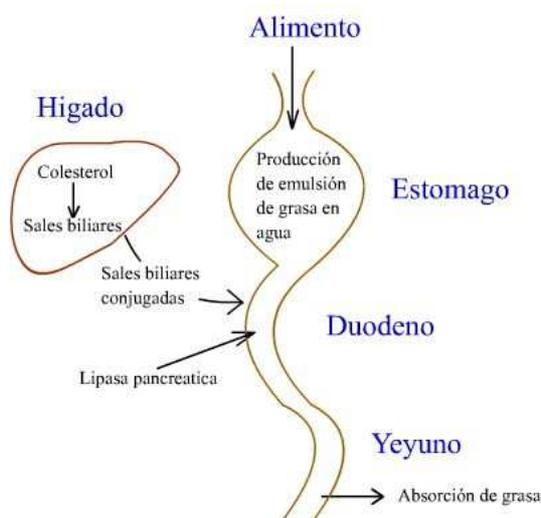
Figura 5.- Principales vías metabólicas implicadas en la lipogénesis del tejido graso de los rumiantes (Soret *et al.*, 2008)



Los triglicéridos constituyen la forma más importante de almacenamiento de energía en los animales. Este tipo de almacenamiento presenta sus ventajas ya que producen más ATP que cualquier otra forma de carbono al oxidarse el carbono de los ácidos grasos; además, los lípidos están menos hidratados que los polisacáridos, por lo que ocupan menos espacio (Vernon, 1981).

Durante la digestión, los ácidos grasos forman micelas en el duodeno y llegan al intestino delgado donde posteriormente son absorbidas. Estas micelas tienen la característica de integrar en ellas otras sustancias, tales como vitaminas y carotenos, que no podrían ser absorbidas por el organismo por otras vías. Los ácidos grasos saturados consienten mucha menor cantidad de sales biliares en sus micelas. Los insaturados también permiten la integración en sus micelas de otros ácidos grasos saturados, facilitando así su asimilación por parte del organismo (Relling y Mattioli, 2003).

Figura 6.- Esquema simplificado de la digestión de lípidos

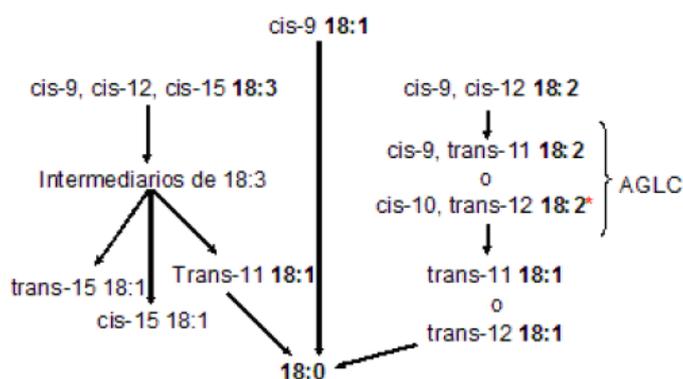


A nivel ruminal, los lípidos procedentes del alimento sufren cuatro procesos: hidrólisis, biohidrogenación, síntesis y saponificación de ácidos grasos. La síntesis de grasas a este nivel depende de la cantidad de ácidos grasos consumidos. Los otros tres procesos ocurren siempre y de forma sucesiva (Relling y Mattioli, 2003).

La digestión de las grasas en el rumen se inicia con la hidrólisis llevada a cabo por lipasas bacterianas (galactosidasas y fosfolipasas producidas por bacterias y protozoos que viven en simbiosis en el aparato digestivo de los rumiantes). Como principales productos se obtienen ácidos grasos y glicerol (éste se metaboliza y transforma en ACG).

Tras esto, aproximadamente un 80 % de los ácidos grasos insaturados sufre un proceso de biohidrogenación (Fig. 7). El resto (suficiente como para cubrir las necesidades del animal como ácidos grasos esenciales) pasa a través del rumen, absorbiéndose y depositándose en el tejido adiposo del animal. Este paso (biohidrogenación), dirigido por las bacterias del rumen, reduce el número de dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados del alimento o los transforma en saturados (De Blas, 2004).

Figura 7.- Proceso de biohidrogenación ruminal



AGLC: ácido graso linoleico conjugado. 18:3 ácido graso linolénico. 18:2 ácido linoleico.

Trans -11 18:1 ácido vacínico. Cis 18:1 ácido oleico. 18:0 ácido esteárico

La hidrogenación de los ácidos grasos generados explica que las grasas incorporadas en los tejidos de los rumiantes sean en general más saturadas que las de los monogástricos (De Blas, 2004). De cualquier forma, la alimentación tanto de monogástricos como de rumiantes suele ser rica en insaturados, lo que no implica necesariamente que el animal después tenga estas grasas en su organismo. Algunos ingredientes, como el almidón, disminuyen considerablemente la tasa de lipólisis, y por consiguiente la biohidrogenación. Este mismo efecto causa el empleo de antibióticos (especialmente de ionóforos) (Woods *et al.*, 2005).

Para aumentar la eficacia de la incorporación de los ácidos grasos  $\omega$ -3 en los tejidos se están estudiando nuevos métodos que protejan las grasas de la dieta de la fermentación ruminal. Actualmente, la técnica más efectiva es el empleo de formaldehído. No obstante, este procedimiento no se ha implantado a nivel comercial puesto que no está contemplado por la normativa de numerosos países.

Hoy por hoy, para disminuir el efecto biohidrogenizador del rumen, se incluyen en la dieta ácidos grasos insaturados o poliinsaturados protegidos de forma natural mediante el empleo de semillas de lino, colza, aceites de pescado o, de forma química, encapsulándolos en proteínas protegidas por formaldehído o por jabones cálcicos de ácidos grasos (Arana *et al.*, 2005).

Como alternativas, además del empleo de semillas intactas, se está investigando el uso de tratamientos térmicos o químicos de las semillas o la incorporación de los aceites en cápsulas proteicas en la dieta.

Finalmente ocurre la saponificación, en la que por el pH ácido del rumen, los lípidos se saponifican formando jabones insolubles de calcio y magnesio y así abandonan el rumen.

Al estudiar el efecto que el crecimiento compensatorio tiene sobre la lipogénesis del tejido adiposo en ganado ovino, Hood *et al.* (1980) observaron como las ovejas en continuo crecimiento aumentaban la lipogénesis del tejido adiposo subcutáneo al incrementar su peso vivo; sin embargo, después de un periodo de ayuno, ésta no se producía. Si los animales volvían a su dieta normal (*ad libitum*) los niveles de actividad lipogénica alcanzados eran superiores a los de los corderos que no sufrían ningún tipo de restricción en su dieta.

Al comparar la actividad lipogénica de los distintos depósitos en cabras de raza Blanca Celtibérica según su estado corporal, se observó que la actividad no estaba influenciada por la nCC. Los resultados mostraron que el orden de los depósitos de mayor a menor actividad era subcutáneo, omental, pélvicorrenal, mesentérico e intermuscular. Además, se vio que el tamaño de los adipocitos variaba de manera proporcional a la cantidad de grasa acumulada (Mendizabal *et al.*, 2007).

Eguinoa *et al.* (2003) al estudiar la actividad enzimática de diferentes depósitos, en bovinos de diversas razas y sexo observaron que, la actividad de la enzima G3PDH estaba influenciada por las otras variables estudiadas (genotipo y sexo). Sin embargo, en la actividad de la FAS y de la MD se observaba la interacción del depósito graso con el sexo del animal (siendo menor en los machos); la G6PDH y la ICDH, mostraban una interacción entre el sexo y la raza (siendo la actividad mayor en la raza Pirenaica).

## 2.2. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS $\omega$ -3

En los años 70, se observó la baja mortalidad causada por enfermedades coronarias en la población esquimal de Groenlandia. Al estudiar el caso se notó el elevado consumo de alimentos de origen marino ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3: eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA). Desde entonces, se han realizado numerosos estudios sobre sus efectos en la reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y cáncer, además de sobre su influencia en los procesos inflamatorios, la respuesta inmune y el desarrollo de los tejidos nerviosos (Castro, 2002).

Así, los ácidos grasos saturados de cadena media (C12:0 - C16:0) aumentan la concentración total de colesterol en plasma y la del LDL (lipoproteínas de baja densidad). Éstos están presentes en la grasa de la leche de rumiantes y en otros productos como el aceite de coco y de palma.

Los ácidos grasos insaturados son aquellos que poseen dobles enlaces en su configuración molecular, son fácilmente identificables, puesto que estos dobles enlaces en sus cadenas de carbono, hacen que su punto de fusión sea menor que el del resto de las grasas, por lo que se presentan como líquidos, denominados aceites.

Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) disminuyen el nivel de LDL en plasma y se encuentran en las grasas de monogástricos y en algunos aceites vegetales (por ejemplo, oliva, colza,...).

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) presentan un efecto hipocolesterolémico. Su eficacia ha sido probada en la prevención de enfermedades cardiovasculares, en la reducción del crecimiento de tumores, además de sus efectos antiinflamatorios y en el desarrollo del cerebro y de las funciones mentales (Nasiff y Meriño, 2003).

Las grasas poliinsaturadas de cadena larga juegan un importante papel en la salud animal. En los tejidos más importantes, suponen el 6% de todos los ácidos grasos presentes. Algunos de éstos, como el linoléico, linolénico y araquidónico son esenciales, es decir, los animales son incapaces de sintetizarlos pero los necesitan para desarrollar ciertas funciones fisiológicas; por ello, es necesario que sean incluidos en la dieta (Cobos, 1993).

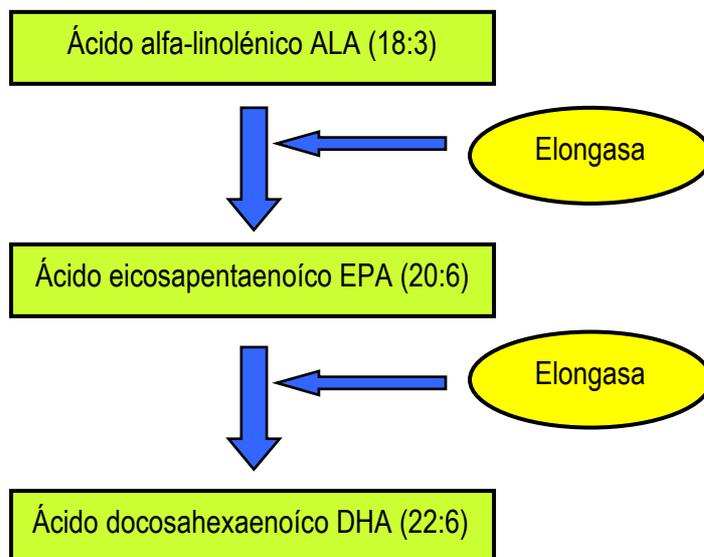
Los ácidos grasos esenciales se encuentran representados en dos familias:

- ✓  $\omega$ -6: representada por el ácido linoleico (18:2) y el ácido araquidónico (20:4)
- ✓  $\omega$ -3: constituida por el ácido alfa-linolénico (ALA, 18:3), el ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6).

En humanos, hay que guardar cierta proporción entre ambos tipos ( $\omega$ -6/ $\omega$ -3). Relaciones en torno a 10:1 pueden tener consecuencias negativas para la salud; sin embargo, si ésta disminuye a valores de 5:1 se obtienen ventajas en personas asmáticas y llegando a 4:1 se previenen enfermedades cardiovasculares (Nasiff y Meriño, 2003).

El ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), precursor de los  $\omega$ -3, contiene 18 átomos de carbono y tres dobles enlaces (18:3). El eicosapentanoico (EPA, 20:5) y docosahexaenoico (DHA, 22:6) pueden sintetizarse por el organismo a partir del ALA de la dieta pero normalmente en una cantidad insuficiente (Carrero *et al.*, 2005).

Figura 8.- Biosíntesis de los ácidos grasos



La primera fuente de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 son las plantas (tanto en ecosistemas terrestres como en marinos). El término  $\omega$ -3 identifica a ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que tienen uno de sus dobles enlaces entre los átomos de carbono 3 y 4 de la cadena; esta posición de su doble enlace permite que los ácidos grasos de este tipo jueguen un papel importante en el metabolismo de los lípidos.

Normalmente los ácidos grasos DHA y EPA se acumulan en la grasa intramuscular. En los monogástricos se puede aumentar su proporción a través de la alimentación, puesto que éstos incorporan a su tejido adiposo las grasas que consumen. Pero esto se complica en rumiantes que, al tener un sistema digestivo diferente, exigen un estudio de las combinaciones de alimentos. El tejido graso de rumiantes contiene mayor proporción de ácidos grasos saturados y una menor de insaturados debido a la hidrogenación de los ácidos grasos que realizan las bacterias del rumen que reducen el número de dobles enlaces o los transforman en saturados (Arana *et al.*, 2005). No obstante, el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados puede verse alterado cuando varía la composición de los ácidos grasos de la dieta (Sala *et al.*, 2007).

La verdadera importancia de los ácidos  $\omega$ -3 en su papel cardiovascular no se debe a su capacidad para la reducción de los triglicéridos circulantes en sangre, sino a que una dieta rica

en ácidos  $\omega$ -3, inhibe la síntesis de ácido araquidónico, que actúa como un agregante plaquetario, aumentando el riesgo de trombosis. Por ello, las dietas ricas en  $\omega$ -3, disminuyen la agregación plaquetaria, incrementan el tiempo de hemorragia y disminuyen la viscosidad y la presión sanguínea, a la vez que disminuyen la incidencia de arritmias cardíacas. En cualquier caso la adicción a la dieta de ácidos grasos insaturados, debe ir acompañada por la adición de Vitamina E, que se comporta como un antioxidante y reduce la degradación y enranciamiento de las grasas (Nasiff y Meriño, 2003; Demirel *et al.*, 2004).

### 2.2.1. Materias primas ricas en ácidos grasos poliinsaturados $\omega$ -3

La alimentación de los animales es uno de los factores más influyentes en la composición en ácidos grasos de la grasa de la carne.

Las fuentes conocidas de alimentos ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 son muy escasas. Un incremento en la proporción de ese ácido graso esencial es muy favorable desde el punto de vista nutricional, ya que es precursor de la serie metabólica  $\omega$ -3.

Los forrajes que sirven de alimento al ganado tienen una composición lipídica rica en glicolípidos y fosfolípidos, siendo el ácido linolénico y el linoleico los ácidos grasos más abundantes. Sin embargo, las semillas oleaginosas empleadas como concentrado en sistemas intensivos son ricas principalmente en triglicéridos formados esencialmente por el ácido linoleico; a excepción de las de lino cuyo ácido predominante es el linolénico.

Los ácidos grasos  $\omega$ -3 están presentes de forma natural en los aceites de soja y colza y, sobre todo, en los de pescado, algas y linaza.

Al calcular la dosis para suplementar el pienso de los animales con ácidos grasos  $\omega$ -3, hay que tener en cuenta que existe un factor limitante, puesto que la cantidad empleada afecta a la calidad sensorial de los alimentos obtenidos. Normalmente, se encuentran diferencias significativas (con respecto al lote control) en los grupos suplementados con niveles de aceite de pescado o de linaza superiores a 1,5 %. Aunque, la percepción de características

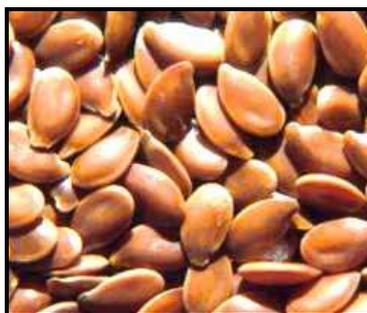
organolépticas indeseables varía de unos consumidores a otros, llegando a haber diferencias entre países diferentes (FEDNA, 2004).

A continuación, se exponen las características de las principales materias primas ricas en ácidos grasos  $\omega$ -3.

### Lino

El consumo tanto de la semilla de lino como de las harinas obtenidas tras el proceso de extracción del aceite, está aumentando en países desarrollados debido a su riqueza en ácidos grasos de tipo  $\omega$ -3 (especialmente el ácido  $\alpha$ -linolénico).

Figura 9.- Plantas y semillas de lino



Su valor energético, levemente menor al de la harina de colza, hace que la harina de linaza sea un ingrediente especialmente indicado para la alimentación de los rumiantes.

Sin embargo, el lino posee factores antinutricionales, cabiendo destacar:

- 1) presencia de ácido fítico y fitoestrógenos
- 2) presencia de glúcidos cianogénicos: la linamarina (puede producir ácido cianhídrico) y la linatina (factor antipiridoxina). Éstos se destruyen parcialmente con el calor, por lo que crean mayores problemas en la semilla que en las harinas.

Estos factores junto con su alto contenido en fibra soluble, limitan su uso en monogástricos, principalmente en aves. No obstante, puede favorecer el tránsito intestinal en cerdas gestantes y équidos porque la solubilidad de sus mucílagos (3 – 8 %) hace que afecten más a la absorción de nutrientes a nivel intestinal que a la digestión a nivel del estómago (De Blas *et al.*, 2003).

Hasta un 30 % del peso de la semilla corresponde a compuestos hidrocarbonatos. Estos contienen, aparte de los mucílagos anteriormente nombrados, un 4-6 % de azúcares solubles (entre los que destaca la sacarosa) y un alto nivel (12-14 %) en polisacáridos no celulósicos solubles (como la xilosa la arabinosa). Sin embargo, la cantidad de almidón que tiene es baja (<2 %) (De Blas, 1999).

Dependiendo del tratamiento que se le dé, la calidad de su proteína tiene un nivel más aceptable que la de otras oleaginosas; no obstante, se complementa bien con las leguminosas porque aunque sea pobre en lisina y en treonina, su contenido en metionina y en triptófano es algo más que aceptable.

En monogástricos (fundamentalmente en aves) su degradabilidad es muy baja. En rumiantes, sin embargo, la degradabilidad de la proteína de la semilla es alta, en torno al 80 %, aunque este valor disminuye hasta convertirse en un 55-65 %, dependiendo de los tratamientos térmicos que sufran las harinas durante la extracción del aceite.

La fracción grasa de la linaza es muy insaturada, hasta un 85 % de los ácidos grasos son insaturados (C18), con una relación saturados:insaturados similar a la de la colza. Además, posee un contenido elevado en ácido  $\alpha$ -linolénico (51 %), lo que la diferencia de otras oleaginosas. Esta riqueza en C18:3 ha aumentado su precio de mercado por su empleo en la obtención de productos con un valor añadido como es el caso de huevo u otros productos ganaderos enriquecidos en ácidos grasos  $\omega$ -3. Aunque, si se usa en exceso puede otorgar al producto características organolépticas indeseadas (Woods *et al.*, 2005).

Otra característica muy apreciada de la linaza es que proporciona un pelo brillante y lustroso a perros, équidos y terneros.

## Algas

Las algas tienen un gran número de aplicaciones, habiendo sido tradicionalmente utilizadas como alimento para ganado. Actualmente este uso se ha vuelto a popularizar en varios países europeos gracias al “pienso de algas” que simplemente es el alga seca y molida convertida a un polvo muy fino. Este pienso de algas presenta niveles muy importantes de diversos minerales y oligoelementos (Woods *et al.*, 2005).

Su procesado consiste en someter a las algas a diversos lavados (en frío y caliente) seguidos de un proceso de extracción que permite aumentar su contenido proteico. Hasta la fecha, la desventaja fundamental de las algas extraídas consistía en su elevada humedad que hacía inviable su comercialización. De este modo, mediante su secado en condiciones controladas y un control de calidad para garantizar su uso, se ha podido obtener una excelente materia prima para alimentación animal cuyas características más destacables son:

- 1) Origen 100% vegetal, con muy bajos niveles de impurezas gracias a los diversos pasos de purificación que experimenta el material.
- 2) Alto contenido en proteína, con valores medios superiores al 30% que permiten compararlo con las harinas de soja.
- 3) Elevados niveles de fibra que lo hacen especialmente recomendable para rumiantes.
- 4) Contenidos importantes en diversos iones tales como calcio, sodio, cloro, hierro, zinc y manganeso.

Su eficacia ha sido probada en la alimentación de vacas y ovejas puesto que mejora la producción láctea y de lana. Y en gallinas ponedoras, al suplementar la dieta con harina de *Sargassum* se obtenían huevos con menor contenido en colesterol y mejor calidad (Casas *et al.*, 2006).

Figura 10.- Algas *Sargassum* (Sargassaceae)

Marín *et al.* (2003) evaluaron el comportamiento de ovinos alimentados con dietas que incluían un 25 % de algas (*Sargassum*). En este estudio, el consumo de agua se veía incrementado en el grupo de ovejas alimentadas con algas (probablemente por el alto consumo de sales); sin embargo, no se obtuvieron diferencias en cuanto al consumo de pienso de los distintos tratamientos (lote control y lote 25% algas). Esto concuerda con otros experimentos con ovejas, en los que se ha comprobado que la inclusión de hasta un 30 % de estas algas no afecta al consumo alimenticio. Los datos productivos (ganancia media diaria y factor de conversión) tampoco mostraron diferencias estadísticas (siendo los resultados aceptables). Con todo esto, concluyeron que la inclusión de este tipo de algas, en cantidades que no afectaran al comportamiento de los animales, no conllevaba efectos negativos, por lo que es viable el suplemento de las dietas para aprovechar su contenido en ácidos grasos  $\omega$ -3 (que pueden ser depositados en el músculo del animal).

### Argán

El argán (*Argania spinosa*), conocido también como acebuche espinoso pertenece a la familia de las sapotáceas. Es la única especie del género *Argania*.

Se encuentra en Marruecos, en toda la franja que va hasta Tarourudant y Tiznit, en el límite sahariano. También se encuentra en ciertas zonas de México y en Andalucía (unos pocos ejemplares). Crecen en zonas de altitud no superior a 800 metros, en clima seco.

El argán crece hasta los 8-10 metros de altura y vive unos 150-200 años. Es espinoso con el tronco rugoso. Tiene pequeñas hojas (2-4 cm de longitud) ovales con el ápice redondeado. Las flores son pequeñas, con cinco pétalos amarillo-verdosos. El fruto es de 2-4 cm de longitud y 1,5-3 cm de ancho, con piel espesa y gruesa que rodea la cáscara amarga con dulce olor; ésta rodea a los frutos que contienen 2-3 semillas que son ricas en aceite. Florece en abril y el fruto tarda en madurar un año (hasta junio-julio del siguiente año).

Figura 11.- Árbol, frutos y semillas de argán



Los análisis químicos indican que el aceite de argán es rico en ácidos grasos insaturados (80 %), de los cuales el 37 % son poliinsaturados. Un 36 % corresponde a ácidos grasos esenciales (fundamentalmente el ácido linoleico). Además, es rico en tocoferoles (69 %), esenciales para la actividad biológica celular; especialmente en vitamina E. Contiene una combinación de constituyentes fenólicos única: el escotenol y el espinasterol (un tipo de esteroides inusuales entre los aceites vegetales, en estudio por sus posibles propiedades antitumorales).

Sus aplicaciones son muy variadas, así puede ser usado como: alimento (aceite), cosmético (jabones, cremas, lociones,...), petróleo, madera y alimento del ganado (el fruto).

Se considera un alimento cardiosaludable puesto que es capaz de disminuir el colesterol perjudicial (LDL) y tratar la hipertensión arterial, es decir, que disminuye algunos factores de riesgo cardiovascular. Además, gracias a sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias, se usa en enfermedades de la epidermis como la neurodermatitis o la psoriasis.

Sus efectos contra las enfermedades cardiovasculares y cancerígenas han sido estudiados en ratas por Berrougui *et al.* (2003).

## Chía

La chía, salvia nativa o salvia hispánica es una planta oleaginosa de la familia de las *Labiatae* que tuvo su auge en la época precolombiana puesto que formaba parte de los alimentos más básicos de Mayas y Aztecas. Aunque estuvo a punto de desaparecer, ha vuelto a tomar importancia debido a su altísimo contenido en nutrientes.

Figura 12.- Plantas y semillas de chía



La semilla de chía posee de un 32 a un 39 % de aceites en su composición. De este porcentaje, un 82 % son ácidos grasos esenciales como el ácido  $\alpha$ -linolénico ( $\omega$ -3) y el ácido linoleico ( $\omega$ -6); la relación entre estos dos tipos de ácidos grasos es adecuada. Además, contiene hasta un 64 % de ácido graso  $\alpha$ -linolénico, siendo este el mayor nivel conocido (Ayerza *et al.*, 2005).

Un 5 % del total de la fibra dietética (38 %) es soluble. Esto conlleva, entre otras ventajas, una mejora del tránsito intestinal y un buen desarrollo de la flora bacteriana.

La chía tiene una elevada cantidad de antioxidantes, entre los que destacan el ácido clorogénico, el cafeico, el quercetín y el Kaempferol.

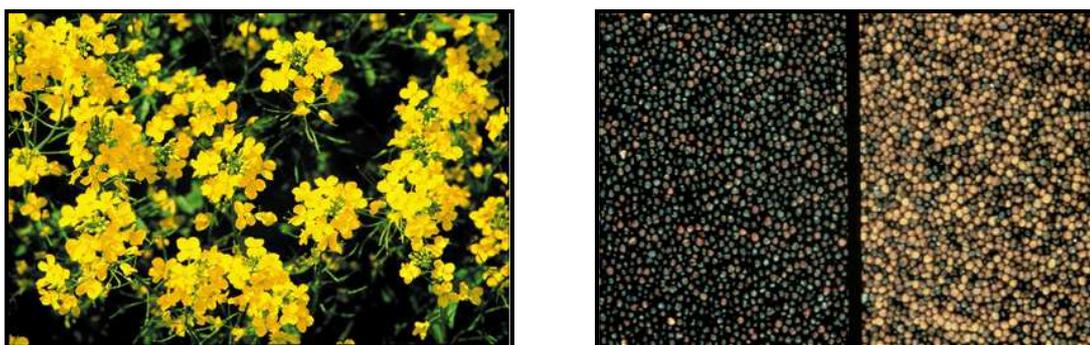
Su semilla posee alrededor de un 20 % de proteínas que carecen de gluten y proporcionan todos los aminoácidos esenciales. Es una gran fuente de vitamina A y de vitaminas del complejo B (niacina, tiamina y ácido fólico). Contiene macroelementos como el calcio, el fósforo o el magnesio. Y su contenido en sodio es muy bajo.

En un experimento llevado a cabo por Coates *et al.* (2009) en el que incorporaban, respectivamente, un 0, 10 y 20 % de semillas de chía en la dieta de acabado de 3 lotes de 6 cerdos, se comprobó que el contenido de  $\alpha$ -linolénico en su carne aumentaba sin afectar negativamente ni a la producción de los animales ni al sabor de la carne.

### Colza

Los productos empleados en alimentación animal obtenidos de la colza, provienen de las variedades conocidas como doble cero (*Brassica napus* y *campestres*) con bajo contenido tanto en ácido erúico (<1 % de la fracción grasa) como en glucosinolatos (<20  $\mu$ moles/g). Su contenido proteico varía desde un 35 hasta un 38 % dependiendo de su origen (Woods *et al.*, 2005).

Figura 13.- Plantas de colza durante la floración y semillas



La colza posee los siguientes factores antinutritivos:

- 1) presencia de ácido erúico: este ácido graso monoinsaturado de cadena larga (22 átomos de carbono) resulta difícilmente oxidable por lo que causa en el animal problemas cardiovasculares (por su deposición en el músculo cardíaco).

- 2) presencia de glucosinolatos: cuya hidrólisis por parte de las enzimas del propio grano (mirosinasa) o de enzimas de los microorganismos del rumen da lugar a productos con efecto goitrogénico, lo que se traduce en una disminución del consumo.
- 3) contenido en sinapina (0,6-1,8 %): puede producir sabor a pescado.

En monogástricos, su uso está limitado por su contenido en fibra, lignina y taninos.

Su concentración en almidón es muy pobre; sin embargo, hasta un 15 % puede llegar a ser de fibra digestible, fundamentalmente de pectinas.

La semilla entera posee alto contenido (40 %) en grasa rica en ácidos oleico y linoleico. Estos niveles junto con su contenido en proteína y en grasa digestible, hace que sea un ingrediente apropiado en la dieta de vacas de alta producción, ya que aumenta la concentración en la leche de los ácidos de cadena larga y la reduce en los de cadena corta y media (De Blas, 1999).

En rumiantes, su uso está limitado por el efecto negativo que tiene la grasa en la digestión de la fibra. Por ello, la semilla sufre un procesado mínimo que facilita la digestión de los granos en el ganado vacuno. Además, el tratamiento térmico reduce la degradabilidad de la proteína.

También, inactiva la mirosinasa, lo que reduce los efectos tóxicos de los glucosinolatos y aumenta hasta un 12 % la digestibilidad de la energía (dependiendo del tipo de tratamiento).

La extrusión mejora la liberación del aceite y aumentando su interacción con la digestión microbiana. Para protegerle de la acción de los microorganismos del rumen, se puede realizar un tratamiento con vapor a 95 °C de modo que el aceite queda encapsulado dentro de la proteína.

## Pescado

El aceite de pescado se obtiene del procesamiento y prensado de pescados enteros y subproductos de la industria conservera. Las oleínas resultan del refinado y deodorizado del aceite. Contienen altos porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga responsables de su inestabilidad ante la oxidación y de la comunicación de sabores anómalos a los productos finales de los animales que los consumen. En general, son ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 pero pobres en  $\omega$ -6. Así, su contenido en ácido linoleico es bajo (<2%). La composición en ácidos grasos de los distintos aceites comerciales varía en función de la temporada del año, del método de procesado y de las especies predominantes en la captura (Mateos *et al.*, 1996). El aceite de pescado procedente de los pescados azules tipo sardina o anchoveta, suele ser más ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 (EPA Y DHA) que los aceites de pescado.

El componente nutritivo más valioso de la harina de pescado es la proteína. Tiene una proporción ideal de aminoácidos esenciales altamente digestibles, que varía relativamente poco con el origen de la harina. Además, la proteína tiene una escasa antigenicidad, por lo que resulta muy adecuada en piensos de animales jóvenes. La harina de pescado se considera una buena fuente de proteína, lisina y metionina by-pass en rumiantes, aunque por su baja palatabilidad (si no está bien procesada) su uso debe limitarse a 0,5 kg/d en vacas de leche. La degradabilidad media de la proteína está en torno a un 40%, pero es altamente variable (CV= 26 %), dependiendo del grado de deterioro durante el almacenamiento y de la cantidad de solubles reciclados (Nasiff y Meriño, 2003).

Figura 14.- Harina de pescado



El aceite de pescado es altamente digestible. Destaca por su aporte de ácidos grasos esenciales de cadena larga (>18 C) de la serie  $\omega$ -3, que suponen alrededor de 1/3 de la grasa total. Por el contrario, su riesgo de enranciamiento es elevado y a niveles altos de incorporación puede dar lugar a problemas de grasa líquida y transmitir sabor a los productos ganaderos.

La harina de pescado aporta cantidades elevadas de fósforo altamente disponible, microminerales (Se, Zn, Cu, Fe y Zn) y vitaminas del grupo B (especialmente colina, biotina, riboflavina y B12). Su elevado contenido en P puede plantear problemas de contaminación por algas en acuicultura y ambientales en zonas de alta densidad animal donde la polución por fósforo esté penalizada.

En la actualidad, el uso de esta materia prima sólo está permitido en la alimentación de animales distintos de los rumiantes en industrias que no fabriquen piensos para rumiantes. La selección de proveedores y la tipificación del producto son esenciales para este ingrediente, dada su elevada variabilidad. Los parámetros más importantes a determinar en el control de calidad son los relacionados con la frescura de la materia prima y la calidad de su procesado (TVN (índice volátil total), aminas biogénicas, digestibilidad y solubilidad de la proteína, enranciamiento y bacteriología).

## Soja

El haba de soja (ver Fig. 15) constituye una excelente fuente de energía y proteína, especialmente lisina, además contiene disponibles altas proporciones de nutrientes esenciales como el ácido linoleico y la colina.

En España, se utiliza harina con un 44 % de proteína obtenida tras un proceso de extracción de la grasa por disolvente, y con un 47 % elaborada a partir del descascarillado parcial de esta última.

Figura 15.- Plantas y habas de soja



A pesar de su elevado valor nutritivo, el haba de soja cruda contiene numerosos factores antinutritivos:

- 1) factores antitripsicos, ureasa y lectinas: son termolábiles, por lo que sus valores tras el procesado por calor son aceptables (<2,5 ppm, <0,3 ud DpH y 0,5 mmoles/g respectivamente).
- 2) factores antigénicos (glicina y  $\beta$ -conglucina): responsables de diarreas en animales jóvenes (terneros y lechones), daños en la mucosa intestinal y de la respuesta inmunológica.

Estos factores son parcialmente digeridos (e inactivados) en el rumen; esto hace que, los rumiantes sean menos sensibles a sus consecuencias. Sin embargo, la fracción no digerida puede llegar a ser considerable en animales de alto nivel de producción (De Blas, 1999).

Al igual que otras leguminosas tiene un alto contenido en oligosacáridos (5-6 %), lo que reduce su uso en lechones pero no supone problemas para los rumiantes.

No obstante, los factores antigénicos y los oligosacáridos pueden ser extraídos con agua y etanol, obteniendo un producto más concentrado, de especial interés en la alimentación de animales jóvenes (como leches artificiales y piensos de arranque) por su alto contenido en proteína (alrededor del 70 %) que recibe el nombre de concentrado de proteína de soja (Mateos *et al.*, 2009).

Otro producto comercializado es el aislado de proteína de soja en el que se extraen también los glúcidos no solubles tras tratamiento alcalino y precipitación ácida. Es un proceso caro por lo que su uso está limitado a lactoreemplazantes y al consumo humano.

La fracción hidrocarbonada de la soja contiene, además de los oligosacáridos, un 6-8% de azúcares solubles (principalmente sacarosa) y alrededor de un 12% de pared celular poco lignificada. Aunque su contenido en almidón es muy bajo (<1%), la calidad energética de esta fracción es elevada en rumiantes, intermedia en porcino y conejos y más reducida en aves.

El haba de soja entera contiene un 18-20% de grasa altamente insaturada (54% de linoleico y 8% de linolénico). Como consecuencia, la semilla entera debe usarse con precaución en piensos de animales monogástricos en cebo por sus repercusiones en la calidad de la canal. Para facilitar la liberación del aceite y así aumentar su digestión en el intestino delgado, el haba de soja se puede moler o extrusionar. Por ello, el valor energético del haba extrusionada es de un 2 a un 5 % mayor al del haba tostada (Mateos *et al.*, 2009).

En rumiantes, a pesar de la hidrogenación parcial del aceite en el rumen, este reacciona negativamente sobre la digestión de la fibra. Estos procesos se reducen tanto en animales de elevado nivel de producción y consumo como en el empleo del haba entera (en estas especies, el haba tostada entera).

EL contenido en proteína de la soja es muy variable dependiendo. Si la semilla está entera es de un 38 % pero este valor aumenta hasta llegar a un 90 % en el aislado de proteína. Tiene alto contenido en lisina y bajo en metionina y triptófano. Al igual que otras leguminosas, su proteína tiene un alto porcentaje en lisina y escaso en metionina y triptófano. Al aplicar un procesado térmico (para disminuir los factores antinutricionales), se reduce su disponibilidad de aminoácidos esenciales como la lisina (De Blas, 1999).

El manejo en granja de los productos obtenidos de la soja resulta fácil y cómodo; aunque si el tiempo de almacenamiento se alarga, existe el riesgo de la grasa del haba entera se oxide.

### 2.2.2. Alimentos enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados

El pescado azul es muy rico en ácidos  $\omega$ -3, pero el rechazo de gran parte de la población hacia este alimento, ha hecho plantearse la inclusión de estos ácidos grasos  $\omega$ -3 en nutrientes tales como carne, huevos o leche.

Partiendo del conocimiento de los efectos de la dieta sobre la cantidad de ácidos grasos  $\omega$ -3 en los productos animales, muchos investigadores experimentan con la alimentación animal para incrementar su contenido en este tipo de ácidos.

Existen estudios previos que informan de que los perfiles de ácidos grasos de los tejidos de rumiantes y monogástricos (músculo y los depósitos grasos) pueden ser modificados por la nutrición o sistemas de alimentación de los animales (Ponnampalam *et al.*, 2009).

Los alimentos de origen animal enriquecidos con algas, harinas o aceites de pescado incrementan las concentraciones de EPA y DHA en los tejidos (por ejemplo en el músculo) y en la yema del huevo. Al alimentar animales con dietas ricas en lino o aceite de lino, que son buenas fuentes de ALA, se obtiene como resultado un incremento de éste ácido graso en los huevos, leche, carnes de cerdo, pollo y vacuno.

El consumo de estos productos como fuente de ácidos grasos de tipo  $\omega$ -3 (ácido alfa-linolénico) está aumentando en los países desarrollados, debido a sus posibles efectos beneficiosos sobre los procesos de inmunidad y salud cardiovascular en humanos.

Los mayores obstáculos para esta tecnología es la tendencia de los ácidos grasos a oxidarse, produciendo sabores desagradables en los productos, así como el gasto de añadir fuentes de  $\omega$ -3 y antioxidantes (Kris-Etherton *et al.*, 2002). De hecho, se han publicado trabajos, que afirman que el 90% de los huevos en Inglaterra están afectados por estos sabores. Y se han llegado a fijar límites en las composiciones de huevos y carne, para que sus propiedades organolépticas no se vean afectadas, 0,3 g de EPA y DHA por 100 g para carne, y 0,48 para huevos (De Blas *et al.*, 2005).

En animales alimentados con semilla o aceite de lino (ricos en ácido linolénico), aumenta el contenido de ácidos  $\omega$ -3 y disminuye la relación  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 (Gago *et al.*, 2007).

Existen muchos productos en el mercado (alimentos funcionales) que han sido enriquecidos con ácidos grasos  $\omega$ -3. Tal es el caso de huevo, aceites, productos de panadería, leche, fórmulas infantiles, mayonesas, margarinas y aderezos, carne y productos avícolas, pescados cultivados...

Debido a la importancia de la Directiva que trata los ácidos grasos, el reglamento se adjunta en el anexo I.

## Huevo

De los productos animales enriquecidos con ácidos grasos  $\omega$ -3, los huevos son los más comúnmente disponibles en el mercado. De acuerdo con los resultados de varios trabajos, existe la posibilidad de enriquecer los huevos con ácidos grasos  $\omega$ -3, utilizando materias primas normales en formulación (p. ej.: semilla de lino, aceites de pescado y semilla de colza). Existen diferencias en la composición en ácidos grasos  $\omega$ -3 de los huevos obtenidos de ponedoras alimentadas con fuentes de origen vegetal o marino (pescado), consiguiendo mejores resultados con estos últimos.

Sin embargo, los huevos enriquecidos en ácidos grasos  $\omega$ -3 deben tener una calidad sensorial aceptable. Siendo las materias primas vegetales menos propensas a transferir características organolépticas indeseables.

Hay que tener en cuenta, las limitaciones que presenta el uso de la semilla de lino en la dieta de las aves: baja digestibilidad, presencia de glucósidos cianogénicos y factores antagónicos de la vitamina B6.

En una experiencia dirigida por Betancourt *et al.* (2009) en la que se evaluaba la posibilidad de enriquecer con ácidos grasos  $\omega$ -3 los huevos de gallinas ponedoras alimentadas con dietas suplementadas con semilla de lino, se observó como el contenido de ácido  $\alpha$ -

linolénico aumentaba hasta 44 veces en la yema del huevo. Estos datos corroboraban los resultados de estudios previos realizados por otros autores (González-Esquerra R. *et al.*, 2001). En el estudio, los datos productivos permanecieron invariables. Sin embargo, aunque no se dieron cambios ni en el sabor, ni en el peso, ni en la textura; la inclusión de un 15 % de linaza reducía la pigmentación del huevo (lo que obliga a aumentar el contenido de pigmentantes y antioxidantes para mantener el color en la escala óptima). Además, el coste de producción aumentaba un 12 %.

Los huevos enriquecidos con  $\omega$ -3 recibieron el Premio al Producto más Innovador de Europa en el año 1997.

## Leche

La grasa de la leche y de sus derivados contiene, de forma natural, elementos bioactivos como es el caso del butirato y de los ácidos grasos ramificados y poliinsaturados  $\omega$ -3. De estos últimos, destaca el ácido linoleico conjugado (CLA) por sus beneficios. No obstante, su concentración depende de factores genéticos, fisiológicos y, fundamentalmente, nutricionales.

Hervás *et al.* (2007) no encontraron diferencias significativas en la producción de leche al ensayar con 24 ovejas de raza Assaf el posible efecto de la suplementación de su dieta con aceite de soja. No obstante, en el tratamiento con un 6 % de aceite de soja, aumentaba la cantidad de ácidos grasos insaturados y se reducían los ácidos grasos de 16 y los de menos de 14 (hasta 4) átomos de carbono. Por tanto, se obtenía una leche más saludable.

Sin embargo, investigadores de la unidad de rumiantes del IRTA y del CSIC, obtuvieron leche enriquecida (hasta cinco veces) en ácidos grasos  $\omega$ -3 de ovejas alimentadas con una dieta suplementada con semilla de lino y harina de girasol. Además, aumentaron la producción sin modificar la composición de la leche.

Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Toral *et al.* (2009) en una experiencia que evaluaba los efectos de la inclusión de diferentes aceites vegetales (girasol y soja) en la alimentación de ovejas lecheras. En él, se observaba como una dieta rica en

alimentos concentrados con un 6 % de aceite de girasol aumentaba el contenido de ácidos insaturados (como el vacénico y el ruménico) en la grasa láctea de manera más efectiva que la misma dosis que el aceite de soja. Además, el contenido graso de la leche de las ovejas alimentadas con aceite de girasol, aumentaba en un 10 % (sin verse reducido el rendimiento productivo).

Paralelamente, estos autores (Torralba *et al.*, 2009) estudiaron en 32 ovejas de raza Assaf, distribuidas en cuatro grupos según su nivel productivo, peso vivo, días posparto y número de lactaciones, el efecto de una dieta suplementada con aceite de girasol (2 %) y pescado (1 %). El tratamiento que incluía ambos aceites afectó a la composición de la leche y redujo su contenido graso un 0,7 %. El porcentaje de ácido ruménico se cuadruplicó. Además la relación  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 disminuía considerablemente (de 6,5 a 2,7), lo que es aconsejable para la prevención de enfermedades cardiovasculares. Esta dieta supuso una reducción de la ingesta de alimento, así como de la producción lechera.

Otros productos lácteos que han sido enriquecidos también con ácidos grasos  $\omega$ -3 son los diferentes tipos de quesos (Innocente *et al.*, 2000; Gómez-Cortés *et al.*, 2009).

### **Carnes y productos cárnicos**

Es conocido que la composición de ácidos grasos en los tejidos de los no rumiantes, especialmente tejido adiposo, tiende a reflejar la composición de su dieta, mientras que la composición de ácidos grasos de los tejidos de los rumiantes está menos afectada por los lípidos de la dieta. En los rumiantes la acción microbiana del rumen determina en gran proporción el tipo de ácidos grasos disponibles para el animal (Cobos *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1994; Araujo de Vizcarrondo *et al.*, 1998; Duckett *et al.*, 1998).

Al estudiar el efecto de diversas raciones (ración 1: pulpa del fruto del argán suplementado con un concentrado; ración 2: pulpa del fruto del argán; ración 3: cebadas exclusivamente con una dieta concentrada) en la composición de los ácidos grasos en el músculo y tejido graso de cabras, Bas *et al.* (2005), comprobaron que los cabritos que habían sido criados con árboles de Argán en bosques marroquíes producían canales más magras con

menor nivel de colesterol y menor proporción ácidos grasos poco saludables como el ácido palmítico y mayor cantidad de ácidos grasos beneficiosos para la salud como los ácidos grasos poliinsaturados, mejorando así la relación  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3.

Berthelot *et al.* (2010), realizaron una experiencia en la que se comparó el efecto de diversos cereales (lino, soja, colza, trigo y maíz) en la composición de los ácidos grasos en la carne ovina. Como conclusión, obtuvieron que la alimentación con linaza extrusionada incrementa la proporción de ALA y de ácidos grasos poliinsaturados de tipo  $\omega$ -3 en el músculo y en el tejido graso de ovejas criadas de forma intensiva.

Al alimentar corderos con una dieta suplementada con diversas cantidades de linaza (0 %, 3 %, 6 % y 9 %), Bas *et al.* (2007) observaron un aumento de ácidos grasos poliinsaturados tanto en tejido adiposo como en músculo y una relación  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 inferior a 4.

La adición en la ración de semilla de lino aumenta el contenido en ácido linolénico en la grasa intramuscular de corderos y terneros (Martínez, 2007).

En ganado bovino, Bach *et al.* (2007) llevaron a cabo un proyecto con 54 machos Frisones alimentados durante sus cuatro últimos meses de vida con pienso enriquecido en  $\omega$ -3, obtenido exclusivamente de elementos vegetales como semillas de linaza o cártamo con el objetivo de enriquecer la grasa de la carne de ternera con este grupo de ácidos grasos. En el estudio se concluyó que, sin repercutir en ninguno de los parámetros productivos, ni en el rendimiento, ni en la calidad de la canal, se podía llegar a: aumentar el contenido de  $\omega$ -3 hasta 4 veces (de 30 a 120 mg/100g), lo que conlleva una mejora de la relación  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 (de 29 a 6), además el contenido de ácido linoleico conjugado mejoraba un 15%. Todo esto, teniendo en cuenta que el coste de obtención de la carne era económicamente factible.

Diferentes autores, han estudiado el empleo de linaza, debido a su alto contenido en ácido  $\alpha$ -linolénico en la dieta de conejos para aumentar el contenido de ácidos grasos  $\omega$ -3 y reducir la relación  $\omega$ -6/ $\omega$ -3. También se ha demostrado su efecto sinérgico con la adición de vitamina E. En todas estas experiencias se ha observado el incremento en la carne de este tipo de ácidos grasos, sin que ello alterara ni la calidad sensorial ni la estabilidad oxidativa de la carne.

En conejos, Tres *et al.* (2008) diferenciaron los efectos de diversos aceites vegetales ricos en ácidos grasos poliinsaturados, como el aceite de linaza ( $\omega$ -3) y de girasol ( $\omega$ -6). Para ello, emplearon dosis de 0, 1,5 y 3 % y observaron que tanto la cantidad como la fuente influían en la composición lipídica de la carne. La carne de los conejos alimentados con aceite de linaza era la más favorable desde un punto de vista nutricional.

En ganado porcino, al añadir a la dieta de cerdos aceite de bacalao (50 ml), aumentaba entre 1,3 y 1,7 la concentración de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3, tanto en la grasa como en el músculo; además, la relación  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 disminuía en todos los tejidos. Esto coincide con otros estudios en los que se ha comprobado como cerdos alimentados con una dieta suplementada con aceite de colza (2 %) y aceite de pescado (1 %), presentaban concentraciones en ácidos grasos  $\omega$ -3 superiores en el *Longissimus dorsi* y en el tejido adiposo (Piquer, 1997).

Recientemente, se ha comprobado como la carne broiler puede ser enriquecida en ácidos grasos  $\omega$ -3 mediante la ingesta de dietas suplementadas con aceite de lino (12 %) (Jia *et al.*, 2010).

# OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

### 3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Este trabajo tiene por objetivo estudiar, en corderos, si la utilización de fuentes ricas en ácidos grasos poliinsaturados del tipo  $\omega - 3$ , en este caso lino, tiene efecto sobre el desarrollo de los diferentes depósitos grasos en los factores relativos a la hiperplasia y a la hipertrofia de los adipocitos y a la actividad de las enzimas lipogénicas relacionadas con el engrasamiento.

Las condiciones experimentales a lo largo del estudio serán las mismas para todos los animales excepto que las dietas estarán suplementadas con diferentes concentraciones de lino. Así, se emplearán tres tipos de alimentación:

- 1) ración 1: dieta control (pienso comercial sin lino)
- 2) ración 2: pienso comercial + 5% de lino
- 3) ración 3: pienso comercial + 10% de lino

Cada lote estará formado por 12 corderos machos de la raza Navarra. El sacrificio se llevará a cabo una vez alcanzados los 26 Kg (tipo ternasco; aproximadamente a 85 días de edad).

El estudio del tejido graso se realizará midiendo la cantidad de grasa acumulada, el tamaño y el número de los adipocitos y la actividad de las enzimas lipogénicas implicadas en la síntesis de los triglicéridos (Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y Sintetasa de ácidos grasos (FAS)) y en la obtención del poder reductor demandado en este proceso (Isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH)).

El estudio de los parámetros anteriormente descritos, se realizará en los depósitos grasos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC) e intramuscular (IM).

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. ANIMALES Y DIETAS

Para la realización de la experiencia se utilizaron un total de 36 corderos de la raza Navarra procedentes de la finca experimental “El Serrón” de Valtierra, propiedad del Instituto Técnico de Gestión Ganadero de Navarra (Sayés Sánchez, J.J., 2006).

Figura 16.- Finca experimental “El Serrón” en Valtierra (Navarra Agraria, 2006)



Con el fin de minimizar las variables con efectos diversos, sólo se emplearon corderos machos. Con un peso medio aproximado al nacer de 4,5 Kg., ganaron  $0,187 \pm 0,022$  kg/d durante de lactación (periodo que duró una media de 57 días).

En el momento del destete (9/04/08), los corderos con un peso medio de 15,2 Kg. se distribuyeron en tres lotes homogéneos según la alimentación que iban a recibir. El período de adaptación al nuevo pienso se realizó sustituyendo gradualmente el pienso de arranque (pienso comercial) por el respectivo pienso concentrado utilizado en la experiencia.

El 16 de abril de 2008, cada lote de corderos comenzó a recibir su dieta correspondiente:

- a) LOTE 1: lote control (sin lino)
- b) LOTE 2: 5% de lino
- c) LOTE 3: 10% de lino

En las tablas 1 y 2, se observan los distintos porcentajes de las materias primas integrantes de los diferentes piensos y su composición química:

Tabla 1.- Composición en materias primas de los piensos estudiados (% de materia fresca).

Materia Prima	Lote Control	Lote 5%	Lote 10%
Cebada	81,17	75,87	70,51
Soja 44	15,23	13,05	10,88
Valomega 160*	0,00	7,48	15,01
Carbonato cálcico	1,76	1,76	1,76
Bicarbonato sódico	1,00	1,00	1,00
Sal	0,50	0,50	0,50
Micromix corderos*	0,30	0,30	0,30
Tastex + 638*	0,04	0,04	0,04

Valomega 160\*: mezcla extrusionada de granos de lino (70%) y segundas de trigo (30%).

Micromix corderos\*: complejo vitamínico mineral compuesto por: vitaminas A, D<sub>3</sub>, E, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> y Mn, I, Co, Zn, Fe, Se, Mo, S, Mg y Antioxidante.

Tastex + 638\*: aromatizante y saborizante.

Tabla 2.- Composición química de los piensos estudiados (materia fresca).

Materia Prima	Lote Control	Lote 5%	Lote 10%
E. M. (Mcal/kg)	2,70	2,75	2,82
Proteína bruta (%)	14,56	14,35	14,48
Fibra bruta (%)	4,64	4,83	5,08
Materia grasa (%)	2,11	4,50	6,32
Cenizas (%)	5,52	5,94	6,02
Vitamina A (U.I./Kg)	9.799	9.799	9.799
Vitamina D3 (U.I./Kg)	1.960	1.960	1.960
Vitamina E (U.I./Kg)	23,3	23,3	23,3

El lino aportado está en forma extrusionado y procede del producto Valomega 160, de la empresa francesa Valorex. Es un producto fabricado a base de semillas de lino (70 % del total), seleccionadas por su alto contenido en  $\omega$ -3, molturadas y con un soporte a base de tercerillas de trigo (30 %). Se presenta en forma de harina, de color marrón oscuro. Su composición analítica se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 3.- Composición analítica del producto Valomega 160 (% de kg bruto).

Constituyentes analíticos	%
Humedad	6,80
Proteína bruta	20,43
Fibra bruta	12,07
Materia grasa bruta	28,38
Cenizas	4,76
Ác. Linolénico ( $\omega$ -3)	15,70
Ác. Linoleico ( $\omega$ -6)	4,70

El alimento fue suministrado “*ad libitum*”. Así mismo, los corderos tuvieron paja a libre disposición. El cebo de los corderos tuvo lugar hasta que estos alcanzaron un peso vivo de 26 Kg.

Figura 17.-Corderos de raza Navarra del lote lino 10 %



## 4.2. SACRIFICIO DE LOS CORDEROS Y TOMA DE MUESTRAS

El sacrificio y faenado de los corderos fue llevado a cabo en el matadero comercial “La Protectora” (Pamplona). Una vez terminada la evisceración, se procedió a la toma de muestras de los depósitos grasos pelvicorrenal (PR: zona cefálica del riñón izquierdo), subcutáneo (SC: base de la cola) e intramuscular (IM: en el *Longissimus Dorsi*, a la altura de la última costilla).

Figura 18.- Toma de muestras de los distintos depósitos



Depósito pelviorrenal (PR)

Depósito subcutáneo (SC)

Depósito intramuscular (IM)

De las muestras tomadas, una pequeña parte (0,5 g), destinada al estudio de los adipocitos, se guardó en tubos con 10 mL de solución Tirode (0,15 M NaCl; 6 mM KCl; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 6 mM Glucosa; 2 mM NaHCO<sub>3</sub>), ajustado a un pH de 7,62, en termos con agua a 39°C (temperatura fisiológica en ganado ovino para evitar la lisis de los adipocitos); el resto (5 g), reservada para el análisis de la actividad enzimática, se congeló en nitrógeno líquido (-196°C).

### 4.3. CANTIDAD DE GRASA

La cantidad de grasa se obtuvo tras la extracción de la misma de los distintos depósitos y su posterior pesaje. En el depósito PR se consideró la cantidad de grasa total del depósito. Para los depósitos SC e IM se trabajó con la 10ª costilla ya que se considera que la composición tisular de esta porción es representativa de la composición tisular de la canal entera (Geay y Beranger, 1969). Por ello, los valores obtenidos de cantidad de grasa SC e IM corresponden a la 10ª costilla.

## 4.4. MEDIDA DEL TAMAÑO Y NÚMERO DE ADIPOCITOS

### 4.4.1. Método laboratorial

La técnica que se empleó para el estudio del tamaño y número de los adipocitos fue la digestión de las muestras con colagenasa descrita por Robdell (1964). Por efecto de la colagenasa la matriz del tejido conjuntivo que rodea a los adipocitos es digerida, quedando éstos libres y listos para ser observados al microscopio.

Fue necesario preparar previamente la solución (5 mL medio 199 comercial – ref.: 31150-022 – 200 mg seroalbúmina bovina; 5 mg colagenasa tipo II – para el depósito IM 10 mg colagenasa tipo II-; ajustándola a un pH entre 7,00 y 7,4) empleada en la digestión del tejido graso y calentarla a 39°C en la estufa.

En la figura 19 se observa como se desmenuzaron las muestras y se añadieron a la solución de colagenasa. Seguidamente se guardaron en la estufa durante 90 minutos (figura 20).

Figura 19.- Picado de las muestras



Figura 20.- Muestras almacenadas en estufa



#### 4.4.2. Tamaño de adipocitos

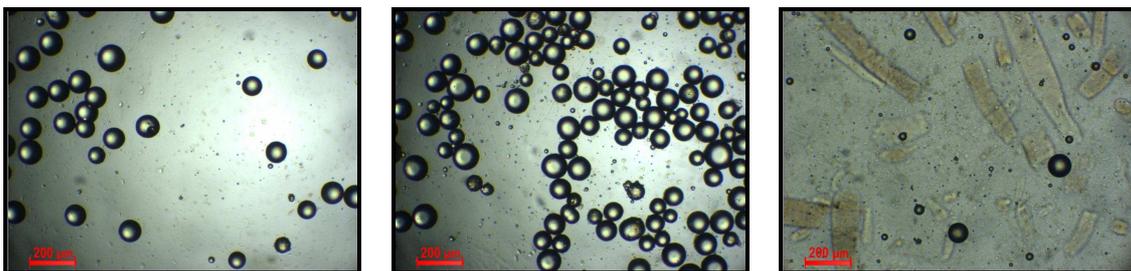
Pasado ese tiempo, se realizaron las preparaciones microscópicas y se digitalizaron las imágenes seleccionadas en el microscopio (como puede observarse en la figura 21) para el posterior estudio de su diámetro mediante la técnica de Análisis de Imagen (Arana *et al.*, 2005).

Figura 21.- Analizador de imágenes



En la figura 22 se aprecian las imágenes microscópicas (x 300) de adipocitos en los distintos depósitos estudiados:

Figura 22.- Imágenes microscópicas (x 300)



Depósito pelvico renal (PR)

Depósito subcutáneo (SC)

Depósito intramuscular (IM)

Utilizando el programa informático Image-Pro Plus 5.1 se obtuvieron los diámetros, de al menos 200 adipocitos por depósito y animal. A partir de estos diámetros, se calculó el volumen

de los adipocitos, considerando que éstos tenían forma circular. El proceso detallado de medida del diámetro de los adipocitos se recoge en el Anexo II.

#### 4.4.3. Número de adipocitos

El número de adipocitos de los diferentes depósitos grasos estudiados fue calculado usando los valores medios del volumen de los adipocitos, la riqueza en lípidos de la grasa (Soxhlet) y la densidad lipídica ( $d=0,915$  g/ml) (Soret *et al.*, 1997). Asumiendo que los adipocitos eran esféricos, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de adipocitos} = \frac{\text{Peso del depósito} \times \text{Soxhlet (\%)}}{\text{Volumen medio adipocitos} \times \text{densidad lipídica}}$$

Dado que la cantidad de grasa almacenada se determinó únicamente en el depósito pélvicorrenal, el número total de adipocitos fue estimado sólo para este depósito. Para los depósitos subcutáneo e intramuscular se estimó el número de adipocitos que había en la 10ª costilla.

## 4.5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LIPOGÉNICA

### 4.5.1. Método laboratorial

La determinación de enzimas exige la homogeneización previa de los depósitos grasos. Este proceso, que debe realizarse en hielo (para evitar la desnaturalización de las enzimas), consiste en añadir entre 0,7 y 0,8 g de grasa desmenuzada en 4 mL de tampón STEG (0,3 M Sacarosa; 30 mM Trizma base; 1 mM EDTA; 1 mM Glutación forma reducida). Tras la homogeneización a 24.000 rpm, se filtró con tela de red. El filtrado se centrifugó a 6.000 rpm

durante 10 minutos a 4°C. El infiltrado se centrifugó una segunda vez a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Finalmente se empleó papel de filtro Whatman de tamaño de poro 0,45 µm para eliminar lípidos residuales y resto de tejido conectivo. El extracto obtenido se guardó en eppendorf de 1,5 mL a -80°C hasta su posterior análisis. El procedimiento detallado se muestra en el anexo III.

Se estudiaron las siguientes enzimas lipogénicas: Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH; EC 1.1.1.8) Sintetasa de Ácidos Grasos (FAS; EC 2.3.1.85), Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49) y NADP-Isocitrato deshidrogenasa (ICDH; EC 1.1.1.50). La actividad enzimática se cuantificó por espectrofotometría, tal y como describen Soret *et al.* (1998).

Figura 23.- Espectrofotómetro



#### 4.5.2. Estudio de la actividad enzimática lipogénica

La actividad fue expresada en forma de nmol /min/10<sup>6</sup> adipocitos. Por ello, para calcular la actividad enzimática por millón de adipocitos, se calculó el número de adipocitos por gramo de tejido adiposo usando el promedio del volumen de los adipocitos, el contenido graso de los

tejidos (85% en el depósito pélvico renal, 60% en el subcutáneo y 2,2% en el tejido intramuscular) y la densidad de los lípidos (0,915 g/mL) (Eguinoa *et al.* 2003):

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{(\text{actividad} / \text{g}) \times 1.000}{n^{\circ} \text{ adipocitos} / \text{g}} \times 10^6 \quad (\text{nmol} / 10^6 \text{ adipocitos} / \text{min})$$

## 4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio estadístico de la cantidad de grasa y del número de adipocitos se realizó un análisis de varianza donde el factor de variación considerado fue el lote de corderos, en función de la alimentación que recibieron (control, 5 % de lino, 10% de lino). Así por cada uno de los depósitos grasos estudiados se aplicó el siguiente modelo:

$$X_{ij} = \mu + L_i + e_{ij}$$

donde:

$x_{ij}$ : valores para cada individuo de la cantidad de grasa y número de adipocitos del depósito PR y de la cantidad de grasa y número de adipocitos de los depósitos SC e IM obtenidos en la disección de la 10ª costilla.

$\mu$ : media de la población considerada

L: efecto fijo debido al tipo de lote (i=1 control, i=2 lino 5%, i=3 lino 10%)

$e_{ijk}$ : error residual aleatorio

No se incluyó el efecto depósito graso en el modelo porque se consideró que no tenía sentido compara la cantidad de grasa o el número de adipocitos entre depósitos, dado que en el caso del PR se consideraba el depósito en su totalidad, mientras que en el SC e IM únicamente se consideraban la grasa y el número de adipocitos correspondientes a la 10ª costilla.

En el estudio del diámetro de los adipocitos, así como de las actividades de las enzimas lipogénicas G3PDH, FAS, ICDH y G6PDH, se incluyó el efecto depósito graso, siguiendo el siguiente modelo estadístico de análisis de varianza:

$$X_{ijk} = \mu + L_i + D_j + (L \times D)_{ij} + e_{ijk}$$

donde:

$x_{ijk}$ : valores para cada individuo del tamaño y número de adipocitos y de la actividad de las enzimas lipogénicas

$\mu$ : media de la población considerada

L: efecto fijo debido al tipo de lote (i=1 control, i=2 lino 5%, i=3 lino 10%)

D: efecto fijo debido al tipo de depósito graso (j=1 PR, j=2 SC, j=3 IM)

(L×D)<sub>ij</sub>: efecto de la interacción Lote × Depósito Graso

$e_{ijk}$ : error residual aleatorio

El programa informático empleado para los análisis estadísticos fue SPSS Statistics

17.0.

# RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CANTIDAD DE GRASA

En la tabla 4 se muestran los pesos, en gramos, de los distintos depósitos grasos estudiados.

Tabla 4.- Peso medio (g) de los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC) e intramuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).

DEPÓSITO (g)	LOTES			SIGNIFICACIÓN	
	CONTROL	LINO 5 %	LINO 10 %	E.E.	P
PR	182,1	220,4	208,2	19,54	0,07
SC <sup>1</sup>	9,8	11,7	11,5	1,04	0,27
IM <sup>2</sup>	0,4	0,3	0,4	0,04	0,46

<sup>1</sup> Obtenido por disección de la costilla 10<sup>a</sup>.

<sup>2</sup> Obtenido por la técnica de análisis de imagen, corresponde al músculo *Longissimus dorsi* de la 10<sup>a</sup> costilla.

Al comparar las medias y observar el nivel de significación estadístico, se comprueba que no existen diferencias significativas en cuanto a la cantidad de grasa acumulada en los animales en función de la proporción de lino de la ración. Únicamente en el depósito PR se da una tendencia a la significación (P=0,07) de manera que la cantidad de grasa pélvicorrenal de los corderos que consumieron lino tendería a ser mayor que en los corderos que consumieron el pienso control.

## 5.2. DIÁMETRO DE LOS ADIPOCITOS

En la tabla 5 se muestran los niveles de significación estadística de los efectos de lote (L), depósito graso (D) y su interacción (L×D) en el diámetro de los adipocitos.

Tabla 5.- Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), interacción lote × depósito (L×D), y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para el diámetro de los adipocitos.

L	D	L×D	$R^2$
NS	***	NS	0,81

(NS:  $P>0,05$ ; \*\*\*:  $P<0,001$ )

Se puede observar como únicamente el efecto depósito es estadísticamente significativo ( $P<0,001$ ). Sin embargo, ni el efecto lote ni su interacción con el efecto depósito muestran diferencias significativas. Por tanto, no ha existido efecto de la alimentación sobre el tamaño de los adipocitos. Únicamente, se han manifestado diferencias significativas en el tamaño de los adipocitos al comparar los depósitos grasos entre sí.

La tabla 6 recoge los diámetros medios ( $\mu\text{m}$ ) de los adipocitos por lotes de corderos según el tipo de ración ingerida y según el tipo de depósito graso.

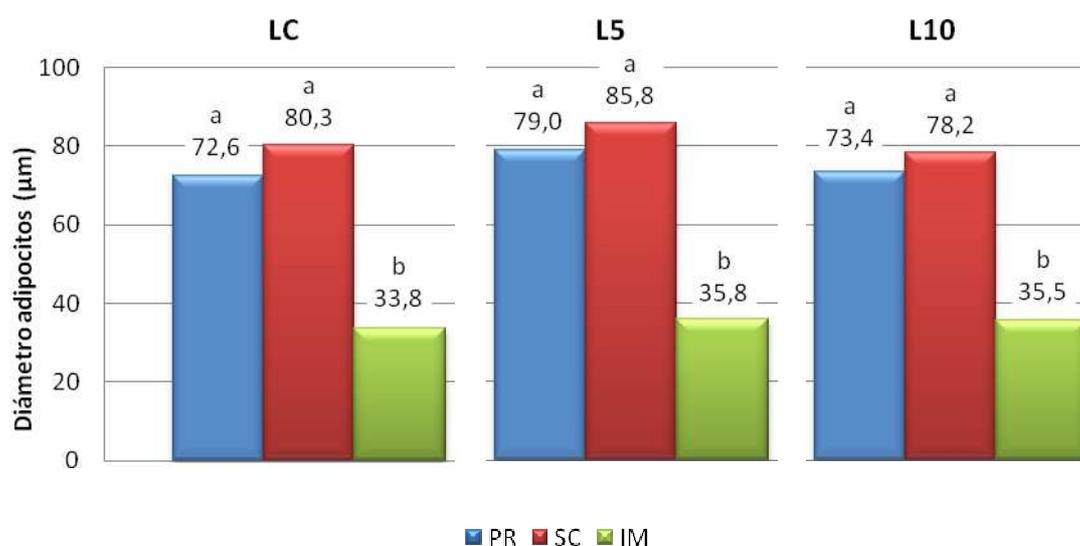
Tabla 6.- Diámetro medio ( $\mu\text{m}$ ) de los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC), e intramuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).

DEPÓSITO	LOTES			SIGNIFICACIÓN	
	CONTROL	LINO 5 %	LINO 10 %	E.E.	P
PR	72,6	78,9	75,6	3,17	0,38
SC <sup>1</sup>	80,1	85,7	79,3	3,50	0,46
IM <sup>2</sup>	33,5	35,7	35,8	0,23	0,62

Los resultados obtenidos muestran que no hubo diferencias significativas en el diámetro de los adipocitos de los corderos debido a la diferente composición de las raciones.

La figura 24 muestra los diámetros medios de los adipocitos de los depósitos grasos PR, SC e IM de los corderos del lote control, lote L5 y lote L10, respectivamente. En los tres grupos de corderos se aprecia que los adipocitos del depósito IM fueron más pequeños que los de los depósitos SC y PR, no habiendo diferencias significativas en el tamaño de los adipocitos de estos dos últimos depósitos.

Figura 24.- Representación gráfica de los diámetros medios ( $\mu\text{m}$ ) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).



### 5.3. NÚMERO DE ADIPOCITOS

La tabla 7 muestra los resultados obtenidos para el número de adipocitos en los diferentes depósitos grasos de tejido graso (véase material y métodos).

Tabla 7.- Número de adipocitos ( $\times 10^6$ ) de los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC), e intramuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).

DEPÓSITO	LOTES			SIGNIFICACIÓN	
	CONTROL	LINO 5 %	LINO 10 %	E.E.	P
PR	870,5	843,3	1.016,6	93,19	0,32
SC <sup>1</sup>	25,8	25,3	31,9	3,65	0,29
IM <sup>2</sup>	23,5	33,4	31,3	5,20	0,54

<sup>1</sup> Corresponde a la grasa de la 10<sup>a</sup> costilla.

<sup>2</sup> Corresponde a la grasa del músculo *longissimus dorsi* de la 10<sup>a</sup> costilla.

Los valores de significación estadística, indican que las diferencias encontradas no son significativas; es decir, el aporte de lino no influye en el número de adipocitos del tejido graso.

### 5.4. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS LIPOGÉNICAS

#### 5.4.1. Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PGH)

La tabla 8 presenta los niveles de significación referentes a la actividad de la enzima G3PDH considerando los efectos lote (L), depósito graso (D) y su interacción (L $\times$ D).

Tabla 8.- Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito grasa (D), interacción lote  $\times$  depósito (L $\times$ D), y el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) para la actividad de la enzima lipogénica Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH).

L	D	L $\times$ D	R <sup>2</sup>
NS	***	NS	0,45

(NS: P>0,05; \*\*\*: P<0,001)

En ella se observa que ni el efecto del lote ni el de su interacción con el efecto depósito fueron significativos. No ocurre así con el efecto depósito, que presenta un nivel de significación inferior al 0,1 % (P<0,001).

Los resultados referentes a la actividad enzimática de la Glicerol 3 Fosfato Deshidrogenasa se exponen en la siguiente tabla:

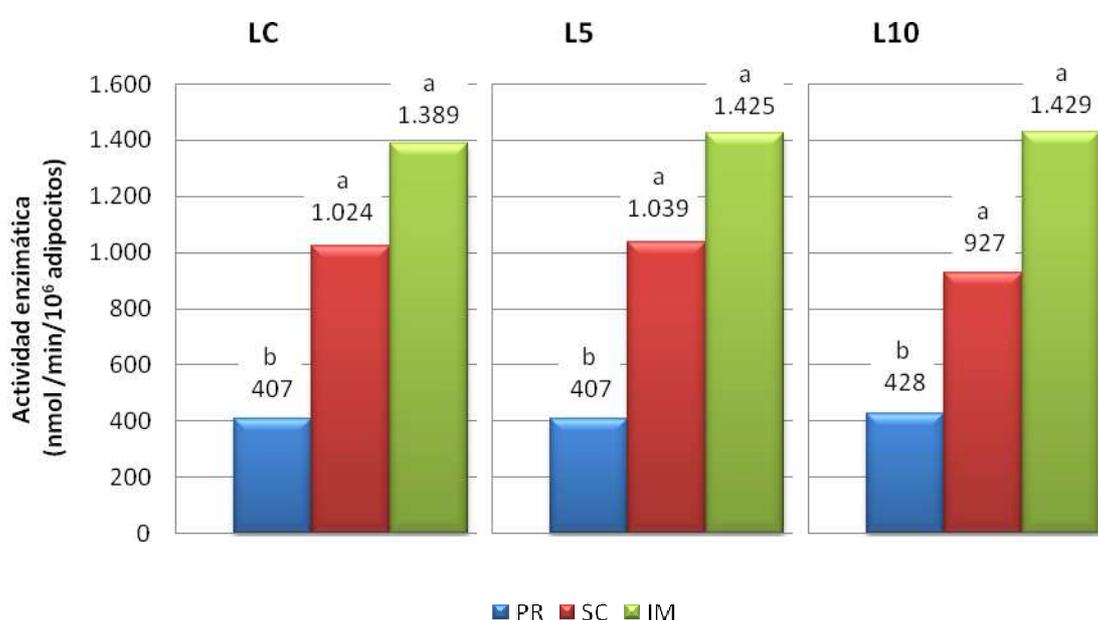
Tabla 9.- Actividad media de la enzima lipogénica Glicerol-3-Fosfato-Deshidrogenasa (nmol /min/10<sup>6</sup> adipocitos) en los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC), e intramuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).

DEPÓSITO	LOTES			SIGNIFICACIÓN	
	CONTROL	LINO 5 %	LINO 10 %	E.E.	P
PR	406,5	406,8	427,9	12,28	0,95
SC	1.024,0	1.039,0	927,0	60,80	0,82
IM	1.389,4	1.424,7	1.428,8	21,70	0,99

Los niveles de significación estadística muestran que el diferente aporte de lino en la dieta de los corderos no conlleva un efecto en la actividad de la enzima lipogénica G3PDH.

La figura 25 muestra la actividad media de la enzima lipogénica G3PDH de los depósitos grasos PR, SC e IM de los corderos del lote control, lote L5 y lote L10, respectivamente. En los tres grupos de corderos se aprecia que el PR presenta menor actividad de la enzima G3PDH que el SC e IM, no habiendo diferencias significativas entre estos dos últimos depósitos.

Figura 25.- Representación gráfica de la actividad media de la enzima lipogénica Glicerol-3-Fosfato-Deshidrogenasa (nmol /min/10<sup>6</sup> adipocitos) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).



#### 5.4.2. Sintetasa de ácidos grasos (FAS)

En la tabla 10 se presentan los niveles de significación estadística para la actividad de la enzima lipogénica FAS al analizar los efectos lote (L), depósito graso (D) y la interacción entre ambos (L×D).

Tabla 10.- Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), interacción lote × depósito (L×D), y el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) para la actividad de la enzima lipogénica Sintetasa de ácidos grasos (FAS).

L	D	L×D	R <sup>2</sup>
NS	***	NS	0,30

(NS: P>0,05; \*\*\*: P<0,001)

Como se observa en la tabla anterior, sólo existen diferencias significativas para el efecto depósito (P<0,001). El efecto lote y la interacción de éste con los diversos depósitos no muestran niveles de significación superiores al 5 %.

A continuación, se muestran los datos pertenecientes a la actividad enzimática de la FAS.

Tabla 11.- Actividad media de la enzima lipogénica FAS (nmol /min/10<sup>6</sup> adipocitos) en los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC), e intramuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).

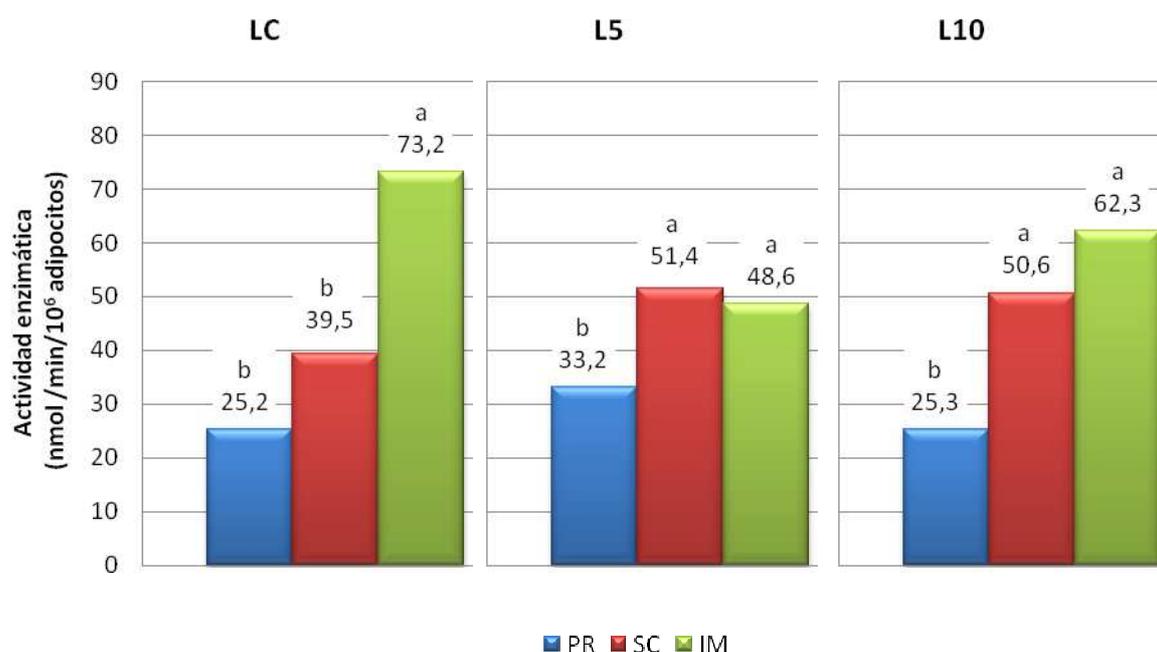
DEPÓSITO	LOTES			SIGNIFICACIÓN	
	CONTROL	LINO 5 %	LINO 10 %	E.E.	P
PR	25,2	33,2	25,3	4,57	0,36
SC	39,5	51,4	50,6	6,67	0,55
IM	73,2	88,9	62,3	13,3	0,40

No existen diferencias significativas en la actividad enzimática lipogénica de la FAS entre los lotes de corderos alimentados con raciones suplementadas con diferentes concentraciones de lino (0, 5 y 10 %).

La figura 26 muestra la actividad media de la enzima lipogénica FAS de los depósitos grasos PR, SC e IM de los corderos del lote control, lote L5 y lote L10, respectivamente. Se

observa como la actividad de la enzima FAS es menor en el depósito PR con respecto al SC e IM.

Figura 26.- Representación gráfica de la actividad media de la enzima lipogénica Sintetasa de ácidos grasos (nmol /min/10<sup>6</sup> adipocitos) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).



### 5.4.3. Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)

En la tabla 12 se presentan los niveles de significación en función de los efectos lote (L), depósito graso (D), interacción lote × depósito (L×D), para la actividad de la enzima lipogénica ICDH.

Tabla 12.- Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), interacción lote × depósito (L×D), y el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) para la actividad de la enzima lipogénica Isocitrato deshidrogenasa (ICDH).

L	D	L×D	R <sup>2</sup>
NS	***	NS	0,51

(NS: P>0,05; \*\*\*: P<0,001)

En la tabla se expresan los resultados de la actividad de la enzima Isocitrato deshidrogenasa.

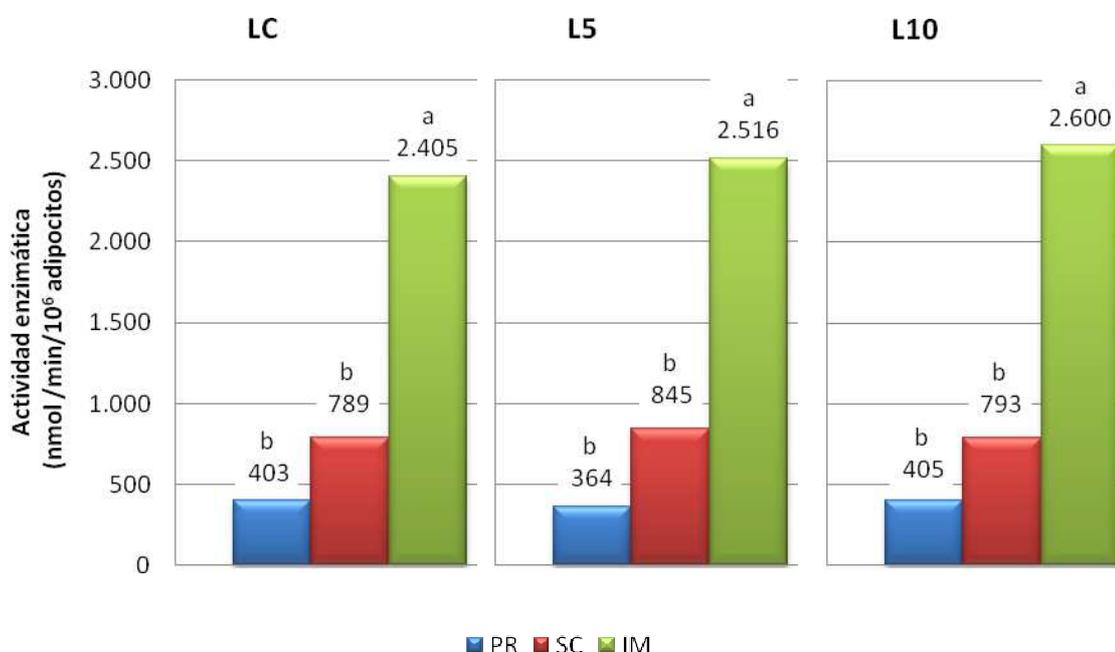
Tabla 13.- Actividad media de la enzima lipogénica Isocitrato Deshidrogenasa (nmol /min/10<sup>6</sup> adipocitos) en los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC), e intramuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).

DEPÓSITO	LOTES			SIGNIFICACIÓN	
	CONTROL	LINO 5 %	LINO 10 %	E.E.	P
PR	402,8	363,9	405,4	23,29	0,84
SC	788,6	845,0	793,2	31,31	0,93
IM	2.405,0	2.516,0	2.600,3	97,98	0,95

No se encontraron diferencias significativas para la actividad de la enzima lipogénica ICDH, es decir, la actividad de esta enzima no se ve afectada por las diversas concentraciones de lino empleadas en las dietas de los tres lotes.

La figura 27 muestra la actividad media de la enzima lipogénica ICDH de los depósitos grasos PR, SC e IM de los corderos del lote control, lote L5 y lote L10, respectivamente. Se observa la gran diferencia existente entre depósitos, siendo el depósito IM el que mayor actividad de la enzima ICDH presenta y el PR y el SC los de menor.

Figura 27.- Representación gráfica de la actividad media de la enzima lipogénica Sintetasa de ácidos grasos (nmol /min/10<sup>6</sup> adipocitos) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).



#### 5.4.4. Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

La tabla 14 refleja los niveles de significación obtenidos para la actividad enzimática lipogénica de la G6PDH, al considerar los efectos lote (L), depósito graso (D), interacción lote  $\times$  depósito (L $\times$ D).

Tabla 14.- Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), interacción lote  $\times$  depósito (L $\times$ D), y el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) para la actividad de la enzima lipogénica Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

L	D	L×D	R <sup>2</sup>
NS	NS	NS	0,10

(NS: P>0,05)

En la siguiente tabla se muestran los resultados correspondientes a la actividad de la enzima lipogénica glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

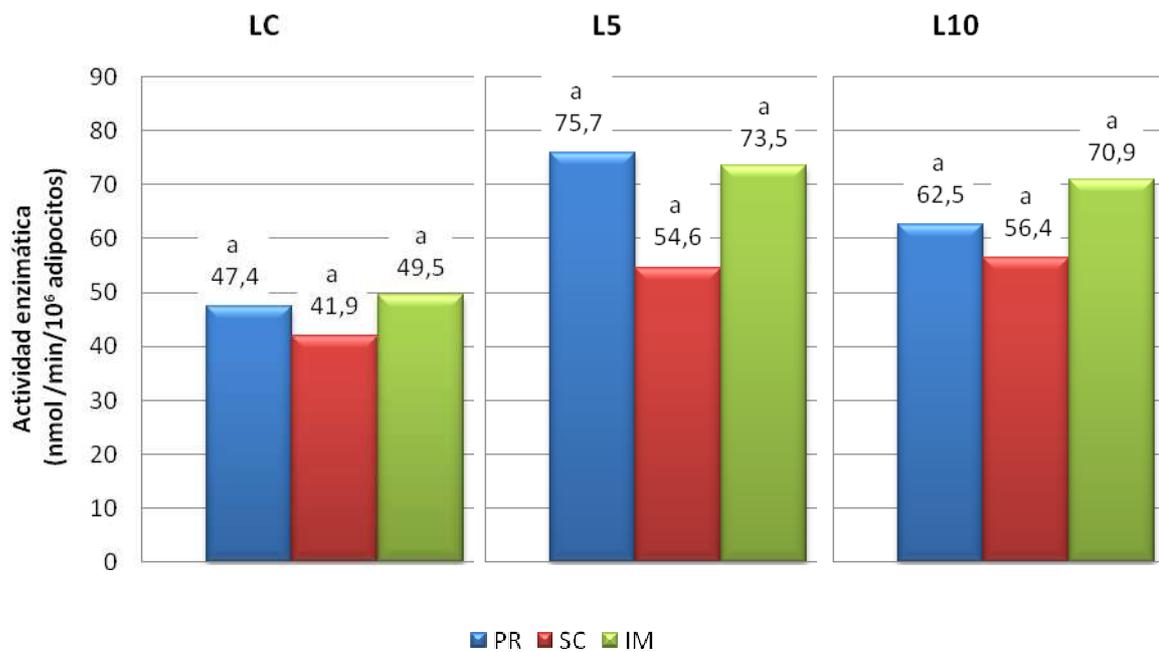
Tabla 15.- Actividad media de la enzima lipogénica Glucosa-6-Fosfato-Deshidrogenasa (nmol /min/10<sup>6</sup> adipocitos) en los depósitos pélvicorrenal (PR), subcutáneo (SC), e intramuscular (IM) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).

DEPÓSITO	LOTES			SIGNIFICACIÓN	
	CONTROL	LINO 5 %	LINO 10 %	E.E.	P
PR	47,4	75,8	62,5	14,18	0,19
SC	41,9	54,6	56,4	7,92	0,52
IM	49,5	73,5	70,9	13,18	0,21

Al observar el nivel de significación estadística se comprueba que no existen cambios en la actividad enzimática lipogénica de la enzima G6PDH al suministrar a los corderos dietas enriquecidas con lino.

La figura 28 muestra la actividad media de la enzima lipogénica G6PDH de los depósitos grasos PR, SC e IM de los corderos del lote control, lote L5 y lote L10, respectivamente. Se observa que en ninguno de los 3 lotes de corderos hay diferencias entre depósitos grasos en cuanto a la actividad de la enzima G6PDH.

Figura 28.- Representación gráfica de la actividad media de la enzima lipogénica Glucosa-6-Fosfato-Deshidrogenasa (nmol /min/10<sup>6</sup> adipocitos) de los 3 lotes de corderos estudiados (LC: lote control; L5: lote con 5 % de lino en la ración; L10: lote con 10 % de lino en la ración).



# DISCUSIÓN

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. CANTIDAD DE GRASA

La distribución del tejido graso en la canal está influenciada por los cambios en las proporciones respectivas que presentan los principales depósitos adiposos durante la fase del crecimiento de los corderos. Su estudio es fundamental puesto que marca el valor comercial de las canales. En el momento del nacimiento el porcentaje de grasa corporal es pequeño; sin embargo, a medida que los animales crecen, aumenta la deposición (por los procesos de hiperplasia e hipertrofia) y con ella la proporción de grasa de la canal de los corderos.

Los corderos jóvenes, como son los del presente trabajo, tienden a acumular más tejido adiposo en los depósitos abdominales internos (omental (OM) y pélvicorrenal (PR)) que en los externos (subcutáneo (SC)). Ello tiene lugar fundamentalmente por la hipertrofia de los adipocitos (Arana *et al.*, 2005) y puede que esté relacionado con el orden de precocidad en el desarrollo de los diferentes depósitos. Así, se considera que el depósito intermuscular (IN) es el más precoz, seguido del PR, OM y el SC (Wood *et al.*, 1980).

De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 4), no existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos lotes en ninguno de los depósitos estudiados. Aunque es importante señalar que, en el PR, los corderos que ingirieron lino tendieron a presentar mayor engrasamiento respecto al lote control ( $p=0,07$ ). El hecho de que los piensos que ingirieron los corderos de los lotes L5 y L10 fueran algo más energéticos que los del lote control (2,70 y 2,75 vs 2,82 Mcal EM/kg, respectivamente) pudo influir en ello.

En este sentido, Arana *et al.* (2005), encontraron que corderos de cebo de raza Rasa Aragonesa alimentados con raciones enriquecidas (2,8 Mcal EM/kg) con un 5 % de jabones cálcicos de ácidos grasos de aceite de oliva presentaban mayor contenido graso en el depósito PR ( $p<0,001$ ) y en el OM ( $p<0,05$ ) con respecto a los corderos que se alimentaban con una dieta

control (2,7 Mcal EM/kg), es decir, en estos depósitos la energía ingerida sobrante se acumulaba en forma de grasa.

Respecto al hecho de que las diferencias tiendan a manifestarse en el depósito PR y no en los demás depósitos podría ser debido al orden de precocidad de los adipocitos grasos de manera que a estas edades de los corderos (aproximadamente 3 meses) los depósitos que mayor acumulación de grasa estarían manifestando serían los depósitos internos. En el trabajo anteriormente citado de Arana *et al.* (2005) las diferencias en el engrasamiento entre lotes de corderos se mostraron así mismo en los depósitos internos (PR y OM), sin que ni en el SC y ni en el IN (intermuscular) se apreciaran diferencias.

Terré *et al.* (2009), en una experiencia llevada a cabo con corderos de raza Ripollesa alimentados con dietas suplementadas con una mezcla de isómeros del ácido linoleico conjugado con 0, 0,25 y 1 %, tampoco encontraron diferencias significativas entre lotes en el depósito IM. Todo ello corroboraría la influencia del orden de precocidad de los diferentes depósitos en el engrasamiento de las canales de corderos jóvenes.

En terneros en crecimiento, así mismo, los resultados obtenidos por diferentes autores parecen indicar que no existe un efecto de la ingestión de lino sobre el engrasamiento cuando los piensos utilizados son isoenergéticos. Así Sayed *et al.* (2007), en terneros de raza Pirenaica alimentados con un 5 % de semilla de lino en la ración no encontraron diferencias en el engrasamiento con respecto a los terneros del lote control que no consumieron lino. De igual modo Bach *et al.*, (2007) con terneros frisonos alimentados con pienso enriquecido en  $\omega$ -3 con materias primas de origen vegetal como el lino o el cártamo durante su fase de acabado (cuatro últimos meses de vida), tampoco encontraron diferencias en el engrasamiento de los terneros que habían recibido el suplemento con respecto a los alimentados con el pienso control.

El objetivo buscado en este trabajo de obtener canales con perfiles lipídicos más beneficiosos para la salud humana, no conlleva cambios en el contenido de los depósitos grasos. Lo que también ha quedado justificado por otros autores en distintas especies como porcino (Echenique *et al.*, 2009), vacuno (Sayed *et al.*, 2007; Bach *et al.*, 2007; Mach *et al.*, 2006), aves (Jia *et al.*, 2010) o conejos: (Tres *et al.*, 2008).

## 6.2. DIÁMETRO Y NÚMERO DE ADIPOCITOS

El hecho de que no haya diferencias significativas en el tamaño de los adipocitos de los diversos lotes estudiados consolida los resultados obtenidos para la cantidad de grasa. Aunque, también en este caso, los lotes suplementados con lino muestran cierta tendencia a presentar adipocitos con diámetros superiores a los del lote control en el depósito PR (Tabla 6).

Parece claro que, la cantidad de alimento ingerido y fundamentalmente la concentración energética del mismo, van a tener una influencia sobre la deposición de grasa que tiene lugar por la hipertrofia e hiperplasia de sus adipocitos.

Daniel *et al.* (2004), en corderos obtenidos del cruce Mule × Charolais distribuidos en lotes según la dieta suministrada (*ad limitum* o racionada), encontraron que los corderos que recibían una dieta que cumplía, en exceso, con sus necesidades presentaban unos depósitos grasos internos (SC, PR y OM) con adipocitos de mayor diámetro que aquellos corderos que habían sufrido restricción en su alimentación.

Sin embargo, en terneros de raza Pirenaica alimentados con dietas suplementadas con lino, Sayed *et al.*, (2007), observaron que los diámetros de los adipocitos de los terneros alimentados con una dieta rica en lino (5 %) no mostraban diferencias respecto a los diámetros de los terneros alimentados con una dieta control, es decir, el diámetro de los adipocitos de los depósitos analizados (PR, SC e IM) de estos terneros no se veía influenciado por la composición de alimentación recibida.

Otro factor influyente en el tamaño de los adipocitos es la edad del animal ya que en las edades más avanzadas predomina el proceso de hipertrofia. Así, Purroy *et al.* (1997) en corderos de raza Latxa observaron que, a pesar de que entre los 12 y los 24 kg el diámetro de los adipocitos permanecía constante, entre los 24 y los 36 kg existía un incremento significativo en los depósitos PR y SC. Es decir, se diferenciaban dos fases en el crecimiento de los adipocitos, una primera en la que predomina más la hiperplasia para a continuación producirse fundamentalmente la hipertrofia de los adipocitos. De modo similar ocurría en corderos de la Rasa Aragonesa (Arana *et al.*, 1998). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por

Haugebak *et al.* (1974), en los que se concluyó que en corderos cruzados de diferentes razas cárnicas alimentados *ad libitum* el fenómeno de la hiperplasia se daba hasta los 24 kg, mientras a partir de este peso hasta los 36 kg el engrasamiento se debía a la hipertrofia de los adipocitos. En este sentido, Smith *et al.* (1987), al estudiar el metabolismo del tejido adiposo durante el crecimiento de corderos de raza Columbia, demostraron que desde los 4 hasta los 6 meses de edad el incremento del diámetro de los adipocitos subcutáneos era considerable, y comprobaron que a esta edad (6 meses) los adipocitos alcanzaban su diámetro máximo.

Así mismo, en cabras adultas de raza Blanca Celtibérica Mendizabal *et al.* (2007), la hipertrofia de los adipocitos fue la responsable del incremento de la cantidad de grasa con el aumento de la nota de condición corporal (nCC), puesto que se observó un aumento del volumen de los adipocitos en todos los depósitos (OM, MES, PR, SC, Intermuscular) al aumentar la nCC. Únicamente, en el depósito SC se obtuvo también una relación positiva y significativa ( $r=0,40$ ;  $P<0,05$ ) entre la cantidad de grasa y el número de adipocitos lo que podría estar indicando una hiperplasia tardía en este depósito.

En terneros de siete de las principales razas autóctonas (Asturiana, Avileña, Morucha, Parda Alpina, Pirenaica, Retinta y Rubia Gallega) con pesos en el momento del sacrificio de 320 y 540 kg, Alzón *et al.* (2007) comprobaron que existía una relación significativa ( $P<0,001$ ) entre el tamaño de los adipocitos del depósito PR y el peso de los animales, lo que se explica por una intensa hipertrofia de los adipocitos en el proceso de engrasamiento. Sin embargo, tanto en el depósito SC como en el intermuscular (IN) este aumento sólo se daba en alguna de las razas estudiadas, por lo que parece que el depósito PR se desarrolla fundamentalmente por hipertrofia mientras que en el SC e intermuscular podría haber también hiperplasia.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que el aporte de lino en la dieta de los corderos no tuvo influencia en el proceso de hiperplasia (o aumento del número de los adipocitos) (Tabla 7).

No se observa una tendencia de los corderos alimentados con lino a presentar mayor o menor número de células adiposas en el depósito PR. Por tanto, la tendencia a una mayor acumulación de grasa en este depósito ( $P=0,07$ ) en los corderos que consumieron lino se debería a un proceso de hipertrofia más acusado y no a la intensificación de la hiperplasia.

Aunque el lino no ha mostrado tener influencia sobre la hiperplasia de los adipocitos sí se han descrito casos de suplementos que modifican la intensidad de los procesos de hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos. Así, Arana *et al.* (2008) en una experiencia llevada a cabo con corderos de la raza Rasa Aragonesa comprobaron como los corderos alimentados con una dieta suplementada con vitamina A presentaban mayor número de adipocitos con diámetros menores que los corderos que no habían recibido suplementos en su dieta, lo que se tradujo en un engrasamiento similar; es decir, la vitamina A influía en los procesos de desarrollo del tejido graso.

En definitiva, parece claro que es fundamentalmente la hipertrofia de los adipocitos la que contribuye al desarrollo de los depósitos grasos, produciéndose la hiperplasia mayoritariamente en las primeras etapas de vida y solo excepcionalmente en etapas avanzadas de crecimiento. No obstante, el aporte de lino a la dieta de los corderos no ha tenido ninguna influencia sobre la hipertrofia ni sobre la hiperplasia de los adipocitos.

### 6.3. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS LIPOGÉNICAS

Cada depósito graso constituye un estado dinámico que supone un papel importante y continuo en el metabolismo energético (Díaz, 2001).

En ninguna de las enzimas objeto de estudio: Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (Tabla 9), Sintetasa de Ácidos Grasos (FAS) (Tabla 11), Isocitrato Deshidrogenasa (ICDH) (Tabla 13) y Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Tabla 15) se observan diferencias significativas entre lotes; es decir, la inclusión del lino en la dieta de los corderos no muestra una influencia en la actividad de estas cuatro enzimas lipogénicas.

Por tanto, al igual que ocurría con la hiperplasia y la hipertrofia de los adipocitos, tampoco ha habido influencia de la inclusión de lino sobre la actividad de las enzimas lipogénicas. Sin embargo, al observar el efecto depósito se comprueba que éste influye en la

actividad de las enzimas G3PDH, FAS e ICDH; siendo la enzima G6PDH, la única en no mostrar variaciones entre depósitos.

La actividad de la enzima G3PDH (Tabla 9), que interviene en la esterificación de los ácidos grasos, por tanto al final del proceso de síntesis lipídica, podría ser un buen indicador de la intensidad de síntesis lipídica que tiene lugar en un momento dado. En este sentido, el depósito PR presentó baja actividad de la G3PDH, lo que podría estar indicando que la lipogénesis es menos intensa en este depósito. Sin embargo, esta enzima muestra una actividad muy elevada en el resto de depósitos estudiados (SC e IM). Estas diferencias podrían estar relacionadas con la precocidad de los distintos depósitos. Así, el depósito PR, que como se ha indicado es más precoz que el SC e IM podría estar próximo a completar su desarrollo y, por tanto, la actividad de la enzima G3PDH estaría disminuyendo, mientras que en los depósitos SC e IM la intensidad del desarrollo estaría aumentando y con ello la actividad de la enzima G3PDH.

En cuanto a la actividad de la enzima FAS, indicadora de la síntesis *de novo* de ácidos en el interior del adipocito, tampoco se vio influida por la inclusión de lino en la ración de los corderos (Tabla 11). También en el caso de esta enzima, las diferencias se reflejaron entre los distintos depósitos grasos, manifestando el depósito PR menor actividad que el SC e IM, a semejanza de lo que había ocurrido con la enzima G3PDH. Esta correspondencia entre la actividad de la G3PDH y la FAS ya había sido descrita por Arana *et al.* (1998) y Purroy *et al.* (1997), respectivamente y en terneros de raza Pirenaica y Frisona (Eguinoa *et al.*, 2003).

Finalmente, con respecto a las enzimas ICDH y G6PDH que aportan al poder reductor necesario por la síntesis *de novo* de ácidos grasos, el hecho de que no hubiera diferencias entre lotes de corderos según la dieta recibida estaría en consonancia con los resultados obtenidos para la actividad de la enzima FAS, que es la que utiliza el poder reductor que generan estos dos enzimas deshidrogenasas.

Al comparar entre depósitos grasos la actividad de la ICDH y G6PDH se observa que mientras para la G6PDH no hay diferencias entre depósitos la actividad de la ICDH vuelva a mostrar los valores menores en el depósito PR, y los mayores en el IM a semejanza de lo que ocurría con la G3PDH y la FAS. Este hecho nos llevaría concluir que es la ICDH la que juega un

papel más determinante en el proceso de generación de poder reductor para la síntesis *de novo* de los ácidos grasos. Esta conclusión viene a confirmar los resultados encontrados previamente en terneros por Alzón *et al.* (2003) que demuestran la relación positiva y significativa existente entre la actividad de las enzimas FAS e ICDH.

En definitiva, los resultados evidencian que la inclusión de lino en la dieta de corderos de cebo de raza Navarra no modifica ni el desarrollo ni el metabolismo del tejido graso.

# CONCLUSIONES

## 7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Carrera se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- La inclusión de lino en la dieta de corderos de raza Navarra no ejerce influencia en la cantidad de grasa acumulada en los depósitos subcutáneo (SC) e intramuscular (IM). Sin embargo, la ingestión de lino pudieran tener cierta influencia tendente a un mayor engrasamiento del depósito pélvicorrenal (PR).

2.- La utilización de lino en la dieta de corderos de raza Navarra no afecta a los procesos de hipertrofia e hiperplasia de las células adiposas de los depósitos grasos estudiados en este trabajo. La tendencia a un mayor engrasamiento en el depósito PR de los corderos que ingirieron lino se correspondió con unos valores algo superiores del tamaño y número de adipocitos en este depósito, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

3.- El lino no afecta en la actividad enzimática lipogénica de ninguna de las enzimas estudiadas: Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH), Sintetasa de Ácidos Grasos (FAS), Isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

4.- La actividad de las enzimas G3PDH, FAS e ICDH varía significativamente entre depósitos grasos. Ello podría tener relación con el orden de precocidad de los diferentes depósitos grasos de forma que en el momento del sacrificio de estos corderos, el depósito PR (que presenta los menores valores de actividades) podría haber manifestado ya su momento de máximo desarrollo y los depósitos SC e IM (que presentaban mayores valores de actividad) lo estarían manifestando en este momento.

5.- El análisis de la composición en ácidos grasos de la grasa (riqueza en ácidos grasos poliinsaturados de tipo  $\omega$ -3) de estos corderos será el que determine en última instancia el interés de la utilización de lino en el cebo de corderos.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-  Alzón M., Eguinoa P., Mendizabal J.A., Arana A., Purroy A., (2003). El proceso de engrasamiento en rumiantes. *Albéitar* 65: 44-46.
-  Alzón M., Mendizabal J.A., Arana A., Albertí P., Purroy A., (2007). Adipocyte cellularity in different adipose depots in Bulls of seven Spanish breeds slaughtered at two body weights. *Animal* 1: 261-267.
-  Arana A., Mendizabal J.A., Alzón M., Soret B., Purroy A., (2008). The effect of vitamin A supplementation on postnatal adipose tissue development of lambs. *Journal of Animal Science* 86: 3.393-3.400.
-  Arana A., Purroy A., Beriain M.J., Mendizabal J.A., Alzón M., Indurain G., (2005). Effect of feeding lambs oleic acid calcium soaps on growth, adipose tissue development and composition. *Small Ruminant Research* 63: 75-83.
-  Arana A., Soret B., Medizabal J.A., Corroza M., Eguinoa P., Purroy A. (1998). Changes in adipose tissue accumulation in "Rasa Aragonesa" breed lambs during growth and fattening. *Animal Science* 66: 409-413.
-  Arana A., Soret B., Mendizabal J.A., Purroy A., (2005). Medida del tamaño y número de adipocitos y de la actividad enzimática lipogénica. *Monografías INIA: Serie Ganadera* 3: 381-393.
-  Araujo de Vizcarrondo C., Carrillo P.F., Martín E., (1998). Fatty acid composition of beef, pork and poultry fresh cuts and some of their processed products. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 48: 354-358.

- 📖 Ayerza R., Coates W., (2005). Chía: Redescubriendo un olvidado alimento de los aztecas. Editorial Del Nuevo Extremo.
- 📖 Bach A., Isla E., (2007). Omega 3 en la alimentación. EurVacum: 2º Congreso de ganado bovino.
- 📖 Bas P., Berthelot V., Pottier E., Normand J., (2007). Effect of level linseed on fatty acid composition of muscles and adipose tissues of lambs with emphasis on trans fatty acids. *Meat Science* 77: 678-688.
- 📖 Bas P., Dahbi E., El Aich A., Morand-Fehr P., Araba A., (2005). Effect of feeding on fatty acid composition of muscles and adipose tissues in young goats raised in the Argan tree forest of Morocco. *Meat Science* 71: 317-326.
- 📖 Berrougui H., Ettaib A., Herrera M.D., Alvarez de Sotomayor M., Bennani-Kabchi N., Hmamouchi M., (2003). Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats. *Journal of Ethnopharmacology* 89 (1): 15-18.
- 📖 Berthelot V., Bas P., Schmidely P., (2010). Utilization of extruded linseed to modify fatty composition of intensively-reared lamb meat: Effect of associated cereals (wheat vs. corn) and linoleic acid content of the diet. *Meat Science* 84: 114-124.
- 📖 Betancourt M.L., Díaz G., (2009). Enriquecimiento de huevos con ácidos grasos omega- 3 mediante la suplementación con semilla de lino (*Linum usitatissimum*) en la dieta. *MVZ Córdoba* 14 (1):1.602-1.610.
- 📖 Bondia Pons I., (2007). Estudio del perfil de ácidos grasos en la evaluación de la Dieta Mediterránea como patrón de la dieta saludable en poblaciones europeas. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Dpto. de Nutrición y Bromatología.
- 📖 Carrero J.J., Martín-Bautista E., Baró L., Fonollá J., Jiménez J., Boza J.J., López-Hueras E., (2005). Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos  $\omega$ -3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutrición Hospitalaria*, 1: 63-69.

- 📖 Casas M., Hernández H., Marín A., Aguila R.N., Hernández C.J., Sánchez I., Carrillo S., (2006). El alga marina *Sargassum* (Sargassaceae): una alternativa tropical para la alimentación de ganado caprino. *Revista de Biología Tropical*, 54 (1): 83-92.
- 📖 Castro González M. I., (2002). Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. *Interciencia* 27, (003): 128-136.
- 📖 Cañeque V., Lauzurica S., Pérez C., Díaz M.T., Sánchez C.I., Fernández C., Álvarez I., De la Fuente J., (2009). Incremento de los ácidos grasos  $\omega$ -3 en la carne de cordero mediante diversos sistemas de alimentación intensiva. *AIDA, XIII Jornadas sobre Producción Animal*, Tomo II: 637-639.
- 📖 Coates W., Ayerza R., (2009). Chia (*Salvia hispanica* L.) seed as an n-3 fatty acid source for finishing pigs: Effects on fatty acid composition and fat stability of the meat and internal fat, growth performance, and meat sensory characteristics. *Journal Animal Science* 87: 3.798-3.804.
- 📖 Cobos A. (1993). Influencia de la dieta en la composición lipídica de la carne de conejo. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria.
- 📖 Cobos A., De la Hoz L., Cambrero M.I., Ordoñez J.A., (1994). Revisión: Influencia de la dieta animal en los ácidos grasos de los lípidos de la carne. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 34: 35-51.
- 📖 Daniel Z.C.T.R., Wynn R.J., Salter A.M., Buttery P.J., (2004). Differing effects of forage and concentrate diets on the oleic acid and conjugated linoleic acid content of sheep tissues: The role of stearyl-CoA desaturase. *Journal Animal Science* 82: 747-758.
- 📖 De Blas C., (2004). Cambios en el perfil de ácidos grasos en productos animales en relación con la alimentación animal y humana. XX Curso de Especialización FEDNA. Barcelona, 22-23 Noviembre: 79-100.

-  De Blas C., Álvarez C., Cachaldora P., Rebollar P.G., Méndez J., (2005). Calidad sensorial de huevos y carne enriquecidos con ácidos grasos omega – 3 y ácido linoleico conjugado. XXI Curso de Especialización FEDNA.
-  De Blas C., Mateos G.G., Rebollar P.G<sup>a</sup>, (1999). Normas FEDNA para la formulación de piensos compuestos.
-  De Blas C., Mateos G.G., Rebollar P.G<sup>a</sup>, (2003). Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos (2<sup>a</sup> edición).
-  Demirel G., Wachira A.M., Sinclair L.A., Wilkinson R.G., Wood J.D., Enser M., (2004). Effects of dietary  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids, breeds and dietary vitamin E on the fatty acids of lamb muscle, liver and adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, 91: 551-565.
-  Diario Oficial de la Unión Europea (2010). Reglamento (UE) n° 116/2010 de la Comisión, de 9 de febrero de 2010, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales. <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:037:0016:0018:ES:PDF>>. [Consulta: 7 abril 2010].
-  Díaz Díaz-Chirón M.T., (2001). Características de la canal y de la carne de corderos lechales manchegos. Correlaciones y ecuaciones de predicción. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
-  Duckett S.K., Wagner D.G., (1998). Effect of cooking on the fatty acid composition of beef intramuscular lipid. *Journal of food composition and analysis* 11: 357-362.
-  Echenique A., Capra G., Pardo G., Grompone M.A., Urruzola N., (2009). Efecto de las pasturas sobre la composición química de la grasa intramuscular de cerdos machos enteros y castrados producidos al aire libre en Uruguay. AIDA, XIII Jornadas sobre Producción Animal, Tomo II: 622-624.

- 📖 Eguinoa P., (1999). Adipose tissue metabolism in Pirenaica and Friesian bulls and heifers. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra.
- 📖 Eguinoa P., Brocklehurst S., Arana A., Mendizabal J.A., Vernon R.G., Purroy A., (2003). Lipogenic enzyme activities in different adipose depots of Pirenaican and Holstein bulls and heifers taking into account adipocyte size. *Journal of Animal Science* 81: 432-440.
- 📖 Fernández y García de Vinuesa A., (2008). El sector ovino y caprino: Situación y acciones en marcha en el marco del plan integral del sector. *Cuaderno de la Tierra (MARM)*.
- 📖 Gago L., García E., Benito J., (2007). Informe de vigilancia tecnológica sobre optimización de la presencia de compuestos funcionales en carne de bovino mediante estrategias basadas en la alimentación. *Circulo de Innovación en Biotecnología*.
- 📖 Geay Y, Béranger C., (1969). Estimation de la composition de la carcasse de jeunes bovins à partir de la composition d'un morceau monocostal au niveau de la 11<sup>e</sup> côte. *Annales de Zootechnie* 18 (1): 65-77.
- 📖 Gómez-Cortés P., Bach A., Luna P., Juárez M., De la Fuente M.A., (2009). Effects of extruded linseed supplementation on n-3 fatty acids and conjugated linoleic acid in milk and cheese from ewes. *Journal of Dairy Science* 92: 4.122-4.134.
- 📖 González-Esquerria R., Leeson S., (2001). Alternatives for enrichment of eggs and chicken meat with omega-3 fatty acids. *Canadian Journal of Animal Science* 81: 295-305.
- 📖 González A., Varela-Echevarría A., Shimada A., Mora O., (2008). Diferenciación in vitro de preadipocitos de tejido adiposo bovino. *Revista Técnica Pecuaria en México* 46 (2):195-204.
- 📖 Gutiérrez Portugal A.M., (2004). Efecto del genotipo sobre la actividad enzimática lipogénica del tejido graso de terneros cruzados (Raza rústica × Raza mejorada). Trabajo Fin de Carrera. Universidad Pública de Navarra.

- 📖 Haugebak C.D., Hendirck H.B., Asplund J.M. (1974). Adipose tissue accumulation and cellularity in growing and fattening lambs. *Journal of Animal Science* 39: 1.016-1.025.
- 📖 Hervás G., Gómez-Cortés P., Frutos P., Juárez M., Mantecón A.R., de la Fuente M.A., (2007). Efecto de la suplementación de la dieta de ovejas lecheras con aceite de soja sobre el rendimiento productivo de los animales y el perfil de ácidos grasos y la composición de CLA de la leche. XXXVIII Jornadas de Estudio AIDA (XII Jornadas sobre Producción Animal), Sección 3: Nutrición y Alimentación, PAII-1.
- 📖 Hood R.L., Thornton R.F., (1980). The effect of compensatory growth on lipogenesis in ovine carcass adipose tissue. *Australian Journal of Agricultural Research*, 31: 155-161.
- 📖 Hood R.L., (1982). Relationships along growth adipose cell size and lipid metabolism in ruminant adipose tissue. *Federation Proc*, 41: 2555-2561.
- 📖 Huang Q.C., Xu Z.R., Han X.Y., Li W.F., (2008). Effect of dietary betaine supplementatioy on lipogenic enzyme activities and fatty acid synthase mRNA expression in finishing pigs. *Animal Feed Science and Technology* 140: 365-375.
- 📖 Innocente N.,Moret S., Corradini C., Conte L.S., (2000). A rapid method for the quantitative determination of short-chain free volatile fatty acids from cheese. *Journal of agricultural and food chemistry* 48 (8): 3.321-3.323.
- 📖 Jia W., Rogiewicz A., Bruce H.L., Slominski B.A., (2010). Feeding flaxseed enhances deposition of omega-3 fatty acids in broiler meat portions in different manner. *Canadian Journal of Animal Science* 90: 203-206.
- 📖 Kempster A.J. (1981b). Fat partition and distribution in the carcass of cattle, sheep and pigs: A review. *Meat Science* 5: 83-98.
- 📖 Kris-Etherton P.M., Harris W.S., Appel L.J., (2002). Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation* 106: 2.747-2.757.

- 📖 Mach N., Devant M., Oliver M. A., Bach A., Font-Furnols M., Diaz I., Garcia J. A., (2006). Increasing the amount of n-3 fatty acid in meat from young Holstein bulls through nutrition. *Journal of Animal Science*, 84: 3.039-3.048.
- 📖 Marín A., Casas M., Carrillo S., Hernández H., Monroy A., (2003). Comportamiento de ovinos alimentados con raciones que incluyen el alga marina *Sargassum* spp. *Revista cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 37: N° 2.
- 📖 Martínez Marín A.L., (2007). Influencia de la nutrición sobre el contenido y tipo de ácidos grasos en la carne de los rumiantes. *Archivos de Zootecnia*, 56: 45-66.
- 📖 Mateos G.G., Hermida M., Serrano M.P., Lázaro R., (2009). Evaluación de la calidad de harinas de soja disponibles en el mercado europeo. Universidad Politécnica de Madrid y Laboratorio de Mouriscade. FEDNA
- 📖 Mateos G.G., Rebollar P.G., Medel P., (1996). Utilización de grasas y productos lipídicos en alimentación animal: grasas puras y mezclas. FEDNA.
- 📖 Mendizabal J.A., Alberti P., Eguinoa P., Arana A., Soret B., Purroy A., (1999). Adipocyte size and lipogenic enzyme activities in different adipose tissue depots in steers of local Spanish breeds. *Animal Science*, 69: 115-121.
- 📖 Mendizabal J.A., Delfa R., Arana A., Eguinoa P., Purroy A., (2007). Lipogenic activity in goats (Blanca Celtibérica) with different body condition scores. *Small Ruminant Research* 67: 285-290.
- 📖 Mendizabal J.A., Delfa R., Eguinoa P., Arana A., González C., Alzón M., Purroy A., (2002). Acumulación/Movilización de reservas grasas: especie caprina vs especie ovina. XXVII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Valencia. Libro de Actas, 180-185.
- 📖 Mendizabal J.A., Soret B., (1997). Desarrollo del tejido graso en corderos en crecimiento. *Ovis* 50: 59-74.

- 📖 Nasiff A. y Meriño E. (2003). Ácidos grasos omega-3: pescados de carne azul y concentrados de aceite de pescado. *Revista Cubana Médica* 42 (2).
- 📖 Nougues J., Vézinhel, A., (1977). Postnatal development of adipose tissue cellularity in the growing rabbit and lamb. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 17: 851.
- 📖 Paniagua R., Nistal M., Sesma P., Alvarez-Uria M., Fraile B., (1993). Tejido conjuntivo y adiposo. En "citología e histología vegetal y animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales". Ed: Interamericana McGraw-Hill. 400 - 428.
- 📖 Park P.W., Goins R.E., (1994). In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science* 59: 1.262-1.266.
- 📖 Piquer F. J. (1997). Avances en la alimentación del ganado porcino (I). Crecimiento y cebo. FEDNA.
- 📖 Ponnampalam E.N., Hopkins D.L., Butler K.L., Dunshea F.R., Sinclair A.J., Warner R.D., (2009). Polyunsaturated fats in meat from Merino, first- and second-cross sheep slaughtered as yearlings. *Meat Science* 83: 314-319.
- 📖 Purroy A., Mendizabal J.A., Soret B., Arana A., Mendizabal F.J., (1997). Changes in cell number and size and in lipogenic enzyme activity in adipose tissue during growth and fattening of Latxa (Manech) lambs. *Ann Zootech* 46: 309-319.
- 📖 Purroy A., Mendizabal J.A., Soret B., Horcada A., Lizaso G., Mendizabal F.J., Arana A., (1995). Size and number variation of adipocytes during the growth of Rasa Aragonesa lambs. *Options Mediterraneennes, Serie Séminaires* 27: 179-184.
- 📖 Relling A.E., Mattioli G.A., (2003). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.
- 📖 Robdell M., (1964). Metabolism of isolated fat cells: Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *The Journal of Biological Chemistry* 239: 375-386.

-  Sala R., Reguera G., Pérez B., García P., (2007). Influencia de la nutrición y alimentación del verraco sobre la producción espermática. *Albéitar*, N° 109: 54-59.
-  Sayed S., Abadía S., Mendizabal J.A., Arana A., Soret B., Alberti P., Purroy A. (2007). Efecto de la alimentación con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados sobre el desarrollo del tejido graso de terneros. XXXVIII Jornadas de Estudio AIDA (XII Jornadas sobre Producción Animal), Sección 3: Nutrición y Alimentación.
-  Sayés Sánchez, J.J., (2006). Finca experimental “El Serrón” de Valtierra. *Agricultura y ganadería compatibles en los secanos semiáridos*. Navarra agraria N° 154.
-  Smith S. B., Jenkins T., Prior R.L., (1987). Carcass Composition and Adipose Tissue Metabolism in Growing Sheep. *Journal of Animal Science*, 65: 1.525-1.530.
-  Soret B., Mendizabal J.A., Arana A., Purroy A., Eguinoa P., (1998). Breed effects on cellularity and lipogenic enzyme activity in Latxa and Rasa Aragonesa lambs during growth. *Small Ruminant Research* 29: 103-112.
-  Terré M., Nudda A., Boe F., Gaias G., Bach A., (2009). Efecto de la suplementación de CLA sobre el sistema inmunitario y el perfil de ácidos grasos de la carne de corderos de la raza Ripollesa. *AIDA, XIII Jornadas sobre Producción Animal, Tomo II*: 616-618.
-  Tres Oliver A., (2009). Incorporación de aceites poliinsaturados, alfa-tocoferol y minerales en pienso: efectos sobre la composición y oxidación lipídica de plasma, hígado y carne de conejo. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
-  Tres A., Bou R., Codony R., Guardiola F., (2008). Influence of dietary doses of n-3- or n-6rich vegetable fats and  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation on raw and cooked rabbit meat composition and oxidative stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 7.243-7.253.

-  Toral P.G., Frutos P., Hervás G., (2009). Leche de oveja con más CLAs. Suplementación de la dieta de ovejas lecheras con distintas fuentes lipídicas. Revista Técnica Ganadera Agosto – Septiembre: 46-51.
-  Vernon R.G., (1981). Lipid metabolismo in adipose tissue of Rumiants. En “Lipid Metabolism in Ruminant Animals”. Ed: Christie W.W., Pergamon Press., Oxford: 279-362.
-  Vernon R.G., (1986). The growth and metabolism of adipocytes. En: Control and Manipulation of Animal Growth. Ed.: P.J. Buttery, N.B. Haynes, D.B. Lindsay. Butterworths. Londres: 67-83.
-  Wood J.D., McFie H.J.H.,Pomeroy R.W., Twinn D.J., (1980). Carcass composition in four sheep breeds: The importante of type of breed and stage of maturity. Animal Production 30: 135-152.
-  Woods V.B., Forbes E.G.A., Easson D.L., Fearon A.M., (2005). Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their subsequent availability in milk, meat and eggs. Agri-Food and Biosciences Institute.

# ANEXOS

## ANEXO I.- REGLAMENTO (UE)

### REGLAMENTO (UE) N o 116/2010 DE LA COMISIÓN

de 9 de febrero de 2010

por el que se modifica el Reglamento (CE) n o 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN EUROPEA,

anexo, en el que también se fijan las condiciones de uso.

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

(2) El Reglamento (CE) n o 1924/2006 establece asimismo que las modificaciones pertinentes del anexo se adoptarán previa consulta a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), en lo sucesivo denominada «la Autoridad».

Visto el Reglamento (CE) n o 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos <sup>1</sup>, y, en particular, su artículo 8, apartado 2,

(3) Previamente a la adopción del Reglamento (CE) n o 1924/2006, la Comisión solicitó el dictamen de la Autoridad sobre las declaraciones nutricionales y sus condiciones de uso en relación con los ácidos grasos omega-3, las grasas monoinsaturadas, las grasas poliinsaturadas y las grasas insaturadas

Considerando lo siguiente:

(1) El artículo 8, apartado 1, del Reglamento (CE) n o 1924/2006 establece que las declaraciones nutricionales en los alimentos solo se autorizarán si están enumeradas en el

<sup>1</sup> DO L 404 de 30.12.2006, p.9.

- (4) En su dictamen, adoptado el 6 de julio de 2005 <sup>2</sup>, la Autoridad concluyó que los ácidos grasos omega-3, las grasas monoinsaturadas, las grasas poliinsaturadas y las grasas insaturadas desempeñan importantes funciones en la dieta. El consumo de algunas grasas insaturadas como los ácidos grasos omega-3 es, a veces, inferior al recomendado. Por ello, las declaraciones nutricionales que identifican los alimentos fuente de estos nutrientes —o ricos en ellos— podrían ayudar a los consumidores a elegir alimentos más sanos. Sin embargo, estas declaraciones nutricionales no estaban incluidas en la lista establecida en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006 tal como fue adoptado por el Parlamento Europeo y el Consejo, ya que entonces no se pudieron definir con claridad sus condiciones de uso.
- (5) Dado que se han aclarado estas condiciones de uso, y teniendo en cuenta un dictamen de la Autoridad relativo al etiquetado de la ingesta de referencia de ácidos grasos omega-3 y omega-6, adoptado el 30 de junio de 2009 <sup>3</sup>, procede añadir a la lista las declaraciones en cuestión.
- (6) En lo relativo a las declaraciones «Fuente de ácidos grasos omega-3» y «Alto contenido de ácidos grasos omega-3», las condiciones de uso deberían distinguir entre los dos tipos de ácidos grasos omega-3, que desempeñan funciones fisiológicas distintas y para los que se recomiendan distintos niveles de consumo. Además, esas condiciones de uso deberían establecer una cantidad mínima requerida por 100 g y 100 kcal del producto, a fin de garantizar que solo los alimentos que proporcionan una cantidad significativa de ácidos grasos omega-3, en sus cantidades de consumo, puedan estar provistos de estas declaraciones.
- (7) Por lo que se refiere a las declaraciones «Alto contenido de grasas monoinsaturadas», «Alto contenido de grasas poliinsaturadas» y «Alto contenido de grasas insaturadas», las condiciones de uso deberían establecer el contenido mínimo requerido de grasas insaturadas en el alimento para, de esta forma, garantizar que la cantidad

<sup>2</sup> The EFSA Journal (2005) 253, pp.1-29.

<sup>3</sup> The EFSA Journal (2009) 1.176, pp.1-11.

declarada corresponda siempre a una cantidad significativa en un consumo que se puede conseguir mediante una dieta equilibrada.

- (8) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

*Artículo 1*

El anexo del Reglamento (CE) nº 1924/2006 queda modificado por el anexo del presente Reglamento.

*Artículo 2*

El presente Reglamento entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 9 de febrero de 2010.

*Por la Comisión*

*El Presidente*

José Manuel BARROSO

---

## ANEXO

En el anexo del Reglamento (CE) n o 1924/2006 se añade el texto siguiente:

### «FUENTE DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3

Solamente podrá declararse que un alimento es fuente de ácidos grasos omega-3 o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene al menos 0,3 g de ácido alfa-linolénico por 100 g y por 100 kcal, o al menos 40 mg de la suma de ácido eicosapentanoico y ácido decosahexanoico por 100 g y por 100 kcal.

### ALTO CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3

Solamente podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de ácidos grasos omega-3 o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene al menos 0,6 g de ácido alfa-linolénico por 100 g y por 100 kcal, o al menos 80 mg de la suma de ácido eicosapentanoico y ácido decosahexanoico por 100 g y por 100 kcal.

### ALTO CONTENIDO DE GRASAS MONOINSATURADAS

Solamente podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de grasas monoinsaturadas o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si al menos un 45 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas monoinsaturadas y las grasas monoinsaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.

### ALTO CONTENIDO DE GRASAS POLIINSATURADAS

Solamente podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de grasas poliinsaturadas o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si al menos un 45 % de los ácidos grasos presentes en el

producto proceden de grasas poliinsaturadas y las grasas poliinsaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.

#### ALTO COTENIDO DE GRASAS INSATURADAS

Solamente podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de grasas insaturadas o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si al menos un 70 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas insaturadas y las grasas insaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.» ES L 37/18 Diario Oficial de la Unión Europea 10.2.2010

## ANEXO II.- MANUAL MEDICIÓN DEL DIÁMETRO DE LOS ADIPOCITOS

El software empleado en el análisis de imagen es el **Image Pro Plus**. Este programa permite el trabajar con imágenes digitalizadas a partir de una cámara de video (en este caso conectada a un microscopio).

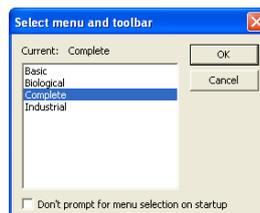
### Procedimiento

#### Toma de imágenes:

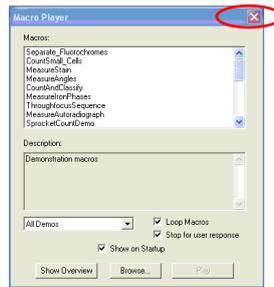
1. Encender por este orden:
  - a. el ordenador
  - b. el microscopio
  - c. la cámara (que debe estar acoplada al convertidor y éste al ocular superior del microscopio).
2. Colocar la lente de 40 aumentos (4X).
3. Pinchar el icono del programa



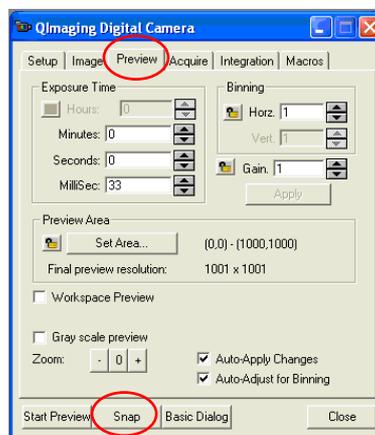
4. Seleccionar el modo completo: "Complete"



5. Cerrar el recuadro titulado "Macro Player"



6. Para llegar al cuadro de diálogo *QImaging Digital Camera* pinchar en el icono  o seguir la ruta: *Acquire* → *Video/Digital capture*.
7. Pinchar en *Preview* para visualizar la imagen observada en el microscopio.
8. Una vez se encuentre la imagen deseada, se reajusta el enfoque y se congela la imagen con *Snap*.



9. Guardar la imagen con el icono  o siguiendo la ruta *File* → *Save As* → *Guardar* (en la carpeta que corresponda).

### Procesado de imágenes:

1. Encender por este orden:
  - a. el ordenador
  - b. el microscopio
  - c. la cámara
2. Colocar la lente de 40 aumentos (4X).

3. Pinchar el icono del programa.
4. Seleccionar el modo completo: "Complete".
5. Cerrar el recuadro titulado "Macro Player".
6. Calibrar: en las mismas condiciones que en la toma de imágenes, tomar una foto de un porta excavado o cámara de contaje con cuadrícula de superficie conocida.

Seguir la ruta:  → *Measure* → *Calibration* → *Spatial*, se abrirá el cuadro *Spatial Calibration*. Seleccionar la ventana *Name*, elegir la opción *Spatial Cal 0* y cambiarla por *Adipocitos Cal 0*.

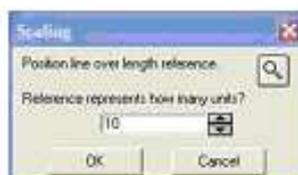
En la ventana *Unit* seleccionar *microns* (micras).

En la ventana *Pixels/unit*, elegir la orden *Image*. Se abrirá el cuadro *Scaling* y aparecerá una línea verde (en la parte superior izquierda de la imagen); al pinchar en sus extremos se moverá hasta la medida de referencia. Hacer el *Zoom* necesario para minimizar el error y ajustar la línea con la medida de referencia. Se puede hacer *Zoom* y modificar la línea de

manera simultánea, para ello sólo hay que pinchar el icono .

Cuando se haya ajustado la línea, escribir las unidades de la medida de referencia en el cuadro *Scaling* y aceptar pulsando *OK*.

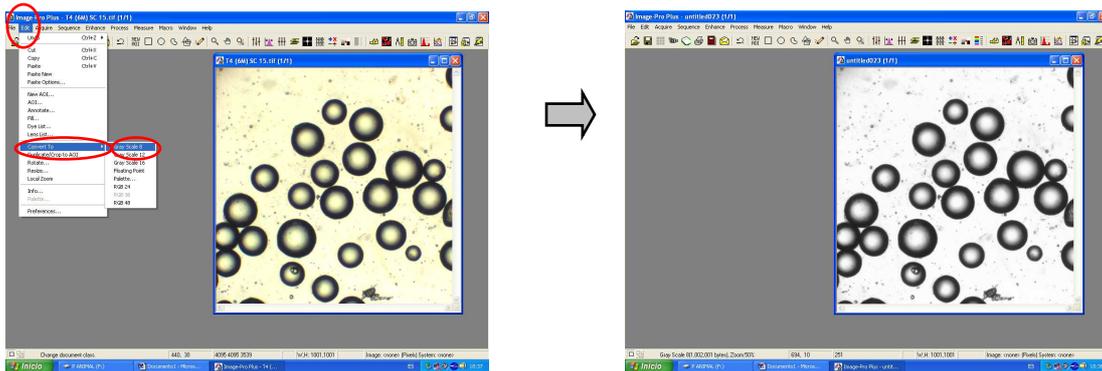
Inmediatamente, aparecerá el cuadro *Spatial Calibration*, donde para guardar la aplicación, hay que pulsar sobre *apply* y cerrar el cuadro de dialogo.



7. Antes de empezar a trabajar con una imagen, se recomienda echar un vistazo a todas las fotografías que correspondan al mismo grupo (por ejemplo, mismo animal y mismo depósito) y seleccionar el orden con el que sea más cómodo el trabajo.

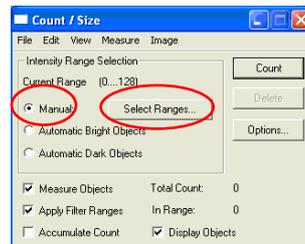
Para ello, usar el icono  o seguir la ruta *File* → *Open*, localizar las imágenes, seleccionarlal y abrirlas.

8. Convertir la imagen a la escala de gris con la orden: *Edit* → *Convert to* → *Gray scale*

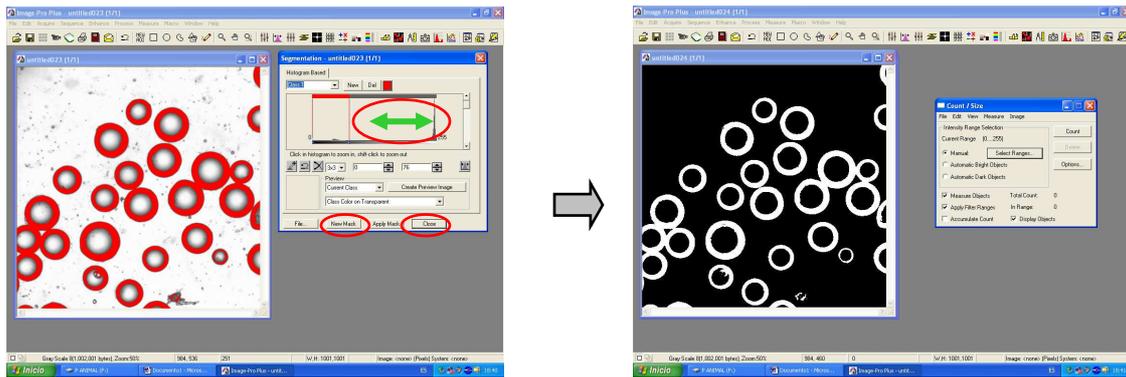


9. Seleccionar *Measure* → *Count/Size* o usar el icono .

En *Count/Size*, elegir la opción *Manual* y seleccionar *Select Ranges*



En el cuadro *Segmentation* se selecciona el nivel de escala de gris desplazando con el ratón la línea (señalada en la figura) hacia izquierda o derecha. Cuando se obtenga la escala de gris adecuada, pinchar en *New Mask* y cerrar el cuadro *Segmentation* empleando el botón *Close*.



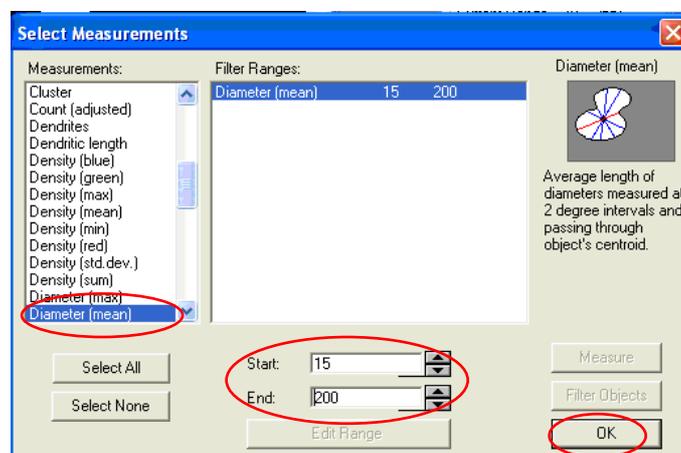
- Calibrar la imagen con la escala guardada anteriormente (en el punto Calibración), para lo cual se sigue la ruta: *Measure* → *Calibration* → *Select Spatial*; en el cuadro *Active Spatial Calibration* elegir la opción *Adipocitos Cal 0*.

También se puede pinchar en icono  y seleccionar la opción *Adipocitos Cal 0*.

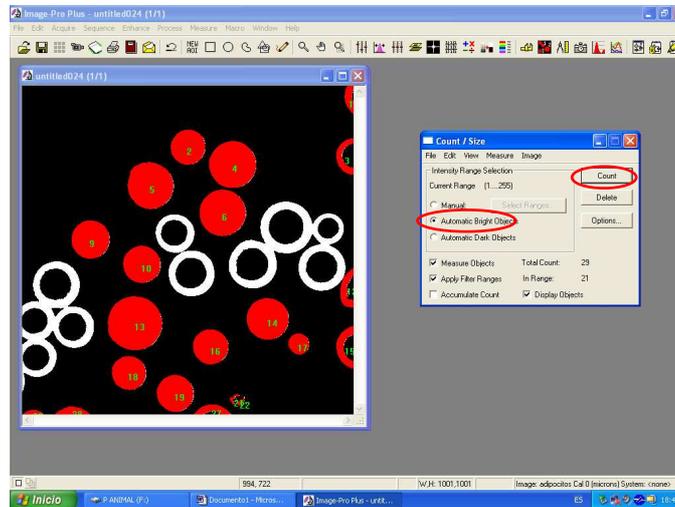
Tras activar esta calibración, aparecerá en la barra de herramientas inferior el mensaje: *Image: adipocitos Cal 0*.



- En el cuadro *Count/Size*, seguir la ruta: *Measure* → *Select Measurements*. Por defecto, el programa mide el Área, por lo que hay que eliminarlo (pinchando sobre él dos veces) y elegir la opción *Diameter (mean)*, tomando como límite inferior (*Start*) 15 µm y como superior (*End*) 200 µm. Para finalizar, pinchar *Ok*.



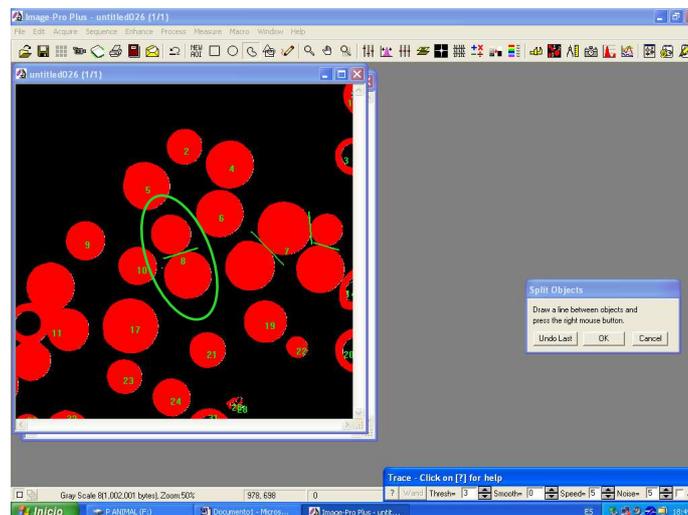
12. Para seleccionar de manera automática los adipocitos a medir, seleccionar la opción *Automatic Bright Objects* y aceptar la orden con *Count*.



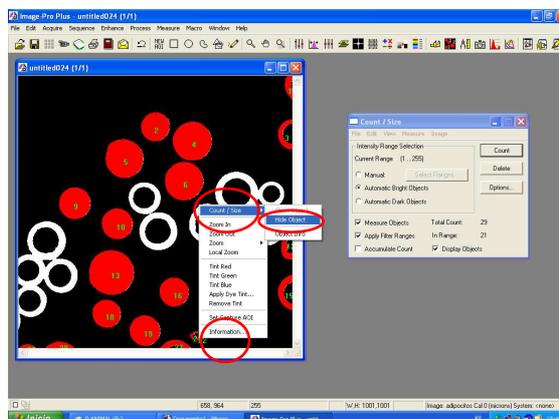
13. Cortar todos los adipocitos pegados entre sí:

- ✓ De forma automática: seleccionar *Edit* (en el cuadro *Count/Size*) → *Watershed Split*.
- ✓ De forma manual: seleccionar *Edit* (en el cuadro *Count/Size*) → *Split Objects* → dibujar la línea de corte utilizando el botón derecho del ratón: pinchar en el inicio de la línea 1 sola vez el botón derecho, desplazar el ratón y al final de dicha línea volver a pinchar el botón derecho. Cuando se hayan realizado todos los cortes (de manera manual) hay que confirmar la orden pulsando el botón *OK* del cuadro *Split Objects*.

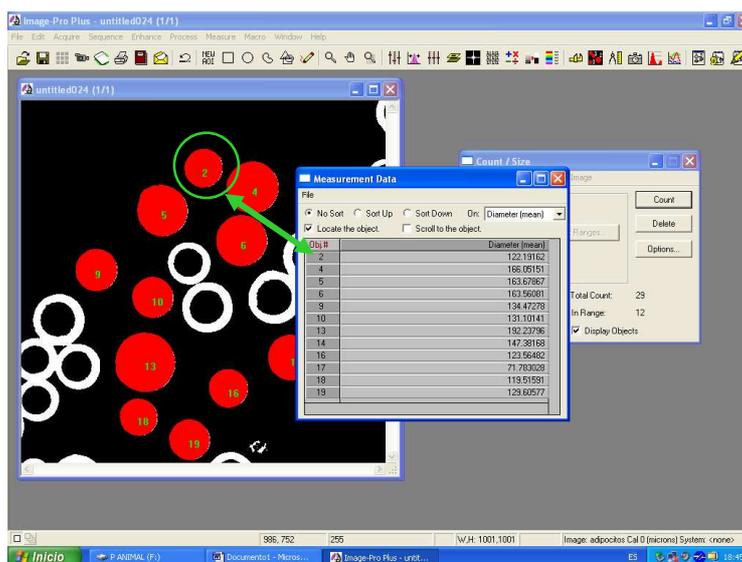
Normalmente esta opción es más aconsejable.



14. Eliminar aquellos objetos que sean adipocitos: pinchar sobre cada uno de los objetos con el botón derecho del ratón y pulsar *Count/Size* → *hide object*.



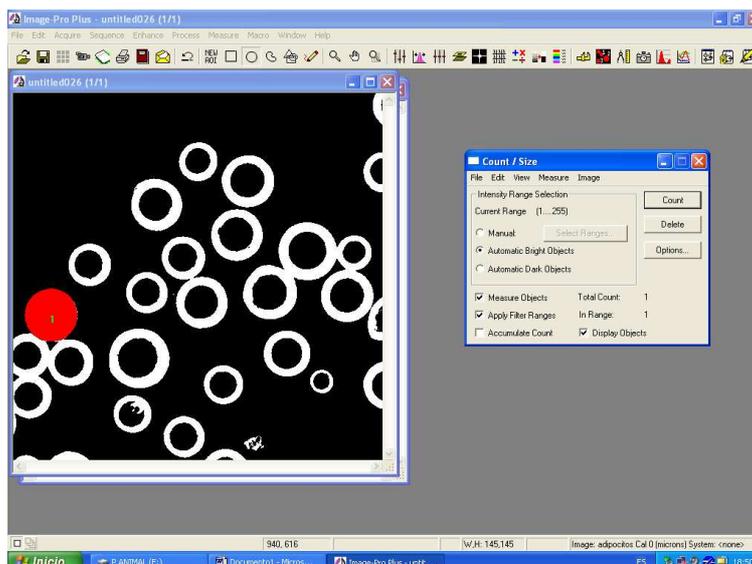
15. Para obtener los datos seguir la ruta: *View* → *Measurement Data*.



16. Antes de exportar los datos, es necesario crear (y guardar) una hoja de Excel con el nombre de las muestras (por ejemplo el nombre del animal y del depósito).

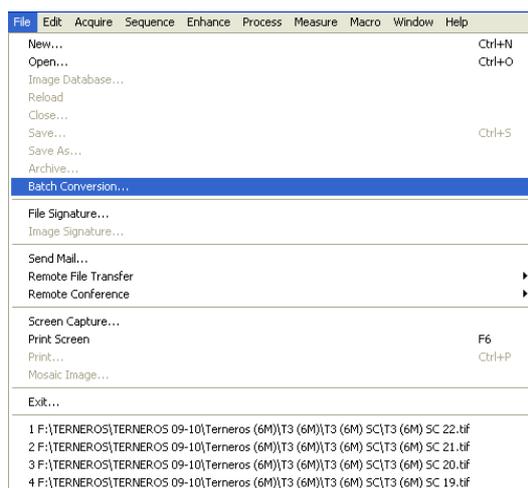
Los datos se exportan siguiendo la ruta: *File* → *DDE To Excel*.

17. Dibujar el contorno de todos aquellos adipocitos que no se hayan medido de manera automática, es decir manualmente. Para ello hay que pinchar el icono , dibujar un adipocito, pulsar *Count* y, como ya se ha explicado anteriormente, obtener el diámetro y exportarlo a Excel.



### Transformación de imágenes a formato FPG:

1. Es necesario crear una carpeta donde se vayan a guardar estos archivos.
2. Seguir la ruta: *File* → *Batch Conversion...*



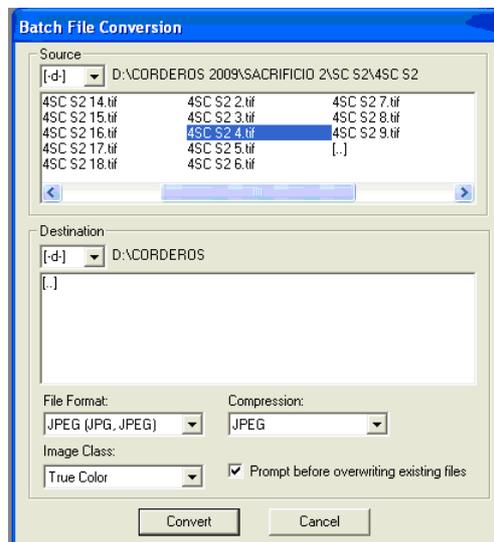
3. Aparecerá el cuadro de diálogo *Batch File Conversion*.

En la pestaña *Source* buscar la carpeta que contenga las imágenes deseadas. Seleccionar la(s) imagen(es) (CUIDADO: si llevan signos en sus nombres, dará problemas)

En la pestaña *Destination* buscar la carpeta de destino.

Comprobar que la pestaña *File Format* tiene la opción *JPEG (JPG;JPEG)* y la pestaña *Compression* la *JPEG*.

Pulsar *Convert*.



## ANEXO III.- MÉTODOS DE TRABAJO

### A.- HOMOGENEIZACIÓN DE DEPÓSITO GRASO PARA LA DETERMINACIÓN DE ENZIMAS

#### Procedimiento

- ✓ Desmenuzar con un bisturí un pedazo de grasa.
- ✓ Pesar entre 0,7 y 0,8 gramos de la muestra.
- ✓ Añadir 4 ml de tampón STEG\*.
- ✓ Homogeneizar la mezcla con el ULTRA-TURRAX durante 30 segundos a 24.000 rpm. Repetir este paso dos veces más.
- ✓ Filtrar el producto resultante con filtro de red.
- ✓ Centrifugar el filtrado a 6.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- ✓ Filtrar con filtro de tela.
- ✓ Centrifugar el producto a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C.
- ✓ Filtrar a través de un filtro de papel Whatman (0,45 µm de poro) usando una jeringuilla.
- ✓ Dividir el filtrado en tubos eppendorf de 1,5 ml.
- ✓ Almacenar a – 80°C.

\*Tampón STEG (pH= 7,4):

- Sacarosa (0,30 M): 102,69 g/l
- Trizna base (30 mM): 3,63 g/l
- EDTA (1 mM): 0,37 g/l
- Glutación forma reducida 1 mM): 0,307 g/l

## B.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### B.1.- GLICEROL 3 FOSFATO DESHIDROGENASA (G3PDH)

El espectrofotómetro mide el consumo de NADH.



#### Procedimiento

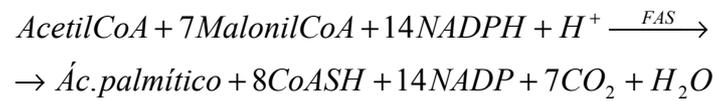
- ✓ Calentar el tampón\* a 37 °C y añadir 275 µl a la cubeta.
- ✓ Añadir a la cubeta:
  - 10 µl de NADH (0,215 mM)
  - 5 µl de muestra (en OVINO, diluir la muestra 1:10)
  - 10 µl de Dihidroxiacetona fosfato (DHAP; 1,2 mM) (ó H<sub>2</sub>O desionizada en el caso del control)
- ✓ Agitar la cubeta (invirtiéndola).
- ✓ Medir la reacción durante 3 minutos a 340 nm.

\*Tampón (pH= 7,5):

- Trietanolamina (100 mM): 13,34 g/l
- EDTA (3 mM): 1,12 g/l

## B.2.- SINTETASA DE ÁCIDOS GRASOS (FAS)

El espectrofotómetro mide el consumo de NADPH.



### Procedimiento

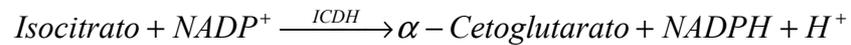
- ✓ Calentar el tampón\* a 37 °C y añadir 262 µl a la cubeta.
- ✓ Añadir a la cubeta:
  - 10 µl de Acetil CoA (0,05 mM)
  - 10 µl de NADPH (0,15 mM)
  - 8 µl de muestra
  - 10 µl de Malonil CoA (0,1 mM) (ó H<sub>2</sub>O desionizada en el caso del control)
- ✓ Agitar la cubeta (invirtiéndola).
- ✓ Medir la reacción durante 3 minutos a 340 nm.

\*Tampón (pH= 6,8):

- Fosfato potásico (100 mM): 22,82 g/l
- EDTA (1 mM): 0,3722 g/l
- Ditioneitol (DTT; 1 mM): 0,154 g/l

### B.3.- NADP – ISOCITRATO DESHIDROGENASA (ICDH)

El espectrofotómetro mide la producción de NADPH.



#### Procedimiento

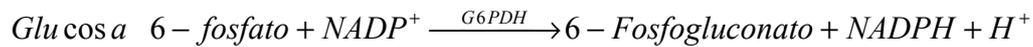
- ✓ Calentar el tampón\* a 37 °C y añadirlo 250 µl a la cubeta.
- ✓ Añadir a la cubeta:
  - 25 µl de Cloruro de manganeso (30 mM)
  - 50 µl de EDTA (3,4 mM)
  - 5 µl de NADP (15 mM)
  - 10 µl de muestra
  - 5 µl de Isocitrato (15 mM) (ó H<sub>2</sub>O desionizada en el caso del control)
- ✓ Agitar la cubeta (invirtiéndola).
- ✓ Medir la reacción durante 3 minutos a 340 nm.

\*Tampón (pH= 7,4):

- TRIS (50 mM): 6,04 g/l

## B.4.- GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH)

El espectrofotómetro mide el consumo de NADPH.



### Procedimiento

- ✓ Calentar el tampón\* a 37 °C y añadir 274 µl a la cubeta.
- ✓ Añadir a la cubeta:
  - 10 µl de NADP (0,2 mM)
  - 6 µl de muestra
  - 10 µl de Glucosa 6 fosfato (G6P; 0,2 mM) (ó H<sub>2</sub>O desionizada en el caso del control)
- ✓ Agitar la cubeta (invirtiéndola).
- ✓ Medir la reacción durante 3 minutos a 340 nm.

\*Tampón (pH= 7,6):

- Glicilglicina (0,1 M): 13,210 g/l
- Cloruro magnésico (10 mM): 2,022 g/l