

# El Tipo de Grasa y su Estado Oxidativo Provocan Cambios en la Resistencia de la Membrana de los Eritrocitos en Pollos Broiler

Choque-López J.A., Manzanilla E.G., Baucells M.D., Barroeta A.C.

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Barcelona

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo es comprobar si el diferente grado de insaturación de la grasa y la presencia de antioxidantes o alteración oxidativa dietética, afectan al estado de oxidación *in vivo*. Para ello se utilizaron dos métodos de estimación de la estabilidad de la membrana de eritrocitos: la resistencia a la hemólisis y la susceptibilidad a la peroxidación lipídica (TBARs). Se realizaron dos experimentos con pollos de carne en fase de crecimiento (4 a 18 días, Exp. 1 y 21 a 42 días, Exp. 2), utilizando grasas con distinta estabilidad oxidativa. En el experimento 1, tres raciones experimentales que contenían grasa añadida al 6 %: aceite de girasol (G), aceite de girasol oxidado (O) y aceite de girasol + 200 ppm. de acetato de alfa tocoferol (V). En el experimento 2, los 3 tratamientos dietéticos incluían 6 % de linaza (L), 6 % de sebo y un pienso sin grasa añadida (C). Con relación a la tasa de hemólisis, en el primer experimento, la suplementación con acetato de alfa tocoferol dio lugar a valores inferiores al resto de tratamientos, que fueron estadísticamente significativos frente al tratamiento (G) el día 11 de vida ( $P = 0.008$ ). Una evolución similar se observa para los niveles de oxidación (TBARs) siendo los tratamientos G y O los que presentan una mayor susceptibilidad a la oxidación ( $P < 0.05$ ) el día 11 (G y O vs. V) y el día 18 (O vs. V). En el experimento 2, los animales alimentados con la grasa más insaturada (linaza), presentaron una mayor sensibilidad a la hemólisis ( $P = 0.032$ ) respecto a aquellos alimentados sin grasa o con grasa saturada (sebo). De forma similar, se observa un mayor nivel de oxidación en la sangre de los animales alimentados con aceite rico en AGPI n-3 ( $P < 0.001$ ). Podemos concluir, que la presencia de productos de oxidación y altos niveles de insaturación en la dieta, produce una mayor sensibilidad de los eritrocitos a la rotura. La incorporación de acetato de alfa-tocoferol permite mejorar la estabilidad de los lípidos de la membrana. Existe un paralelismo entre los resultados de la tasa de hemólisis y la susceptibilidad a la oxidación de los eritrocitos. Ambos métodos de determinación son capaces de discriminar estados de oxidación *in vivo*.

## ABSTRACT

This study is performed to study the effect of unsaturated fat, oxidized fat and antioxidants included in the diet, on the *in vivo* oxidative status. We used two different methods to determine the lipid oxidation: the haemolysis level and the TBARs test. We carried out two trials using broiler chickens of different ages and using fats differing on the oxidative stability. In experiment 1, animals were fed three diets containing 6% of: sunflower oil (G), oxidized sunflower oil (O) or sunflower oil + 200 ppm of alfa-tocopherol acetate (V). In experiment 2, diets included 6% of, linseed oil (L), tallow (S) or no added fat (C). In experiment 1, alfa-tocopherol inclusion promoted the lower haemolysis values, which became significantly different to (G) for 11 days old chickens ( $P = 0.008$ ). Oxidation level (TBARs) showed a pattern similar to that shown for haemolysis. In particular, G and O treatments showed the highest oxidation effects ( $p <$

0.05) on 11 (G and O vs. V) and 18 days old chickens (O vs. V). In experiment 2, linseed oil increased haemolysis ( $P = 0.032$ ) compared to treatments S and C. Treatment L, the treatment presenting higher PUFA n-3 level, also increased ( $P = 0.001$ ) the oxidation level (TBARS). From the here presented results we conclude that oxidized and high PUFA fats, included in the diet, increase haemolysis level. Moreover, inclusion of alfa-tocopherol acetate in the diet improves membrane lipid stability. Finally, results for haemolysis and oxidation present similar pattern; both methods are able to show *in vivo* oxidation status.

## INTRODUCCION

Es bien conocido, que conforme aumenta el grado de insaturación de las materias grasas se incrementa su susceptibilidad a la oxidación. Numerosos estudios han demostrado que el perfil en ácidos grasos de los depósitos del animal, refleja el perfil lipídico de la dieta. Así, la incorporación de altos niveles de AGPI en la ración y, consecuentemente, en los tejidos, provocan una menor estabilidad frente a la oxidación. (Cortinas *et al.*, 2005; Golapakrishna and Prabhakar, 1986 y Villaverde *et al.*, 2004)

Durante la oxidación, los ácidos grasos insaturados son destruidos y transformados a productos de oxidación primaria y, posteriormente, secundaria (p.e.: malondialdehído). Se ha demostrado que la presencia de productos de oxidación modifica la permeabilidad de la membrana de las células, resultando perjudicial para el organismo. (Chin, 1995; Dibner *et al.*, 1996) Además, un aumento del nivel de oxidación de la carne, reduce su valor nutritivo y organoléptico. (Addis *et al.*, 1989; Emanuel *et al.*, 1991; Hallywell y Gutteridge, 1990)

Por otro lado, se ha demostrado que la incorporación de antioxidantes a la ración, y en concreto la suplementación con acetato de alfa-tocoferol, resulta efectiva en aumentar la estabilidad oxidativa de los lípidos y en definitiva, mejorar la calidad de la carne. (Cortinas *et al.*, 2005; Grau *et al.*, 2001; Villaverde *et al.*, 2004)

En la mayoría de estos trabajos el nivel de oxidación se determina a través de la cantidad de compuestos de oxidación secundaria, en concreto de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, expresadas como malondialdehído), pero casi siempre medidas en carne. (Grau *et al.*, 2001; Maraschiello *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 1999). Es decir es una medida realizada *post mortem* y refleja el nivel de oxidación del producto.

El objetivo del presente trabajo es comprobar si el diferente grado de insaturación de la grasa y la presencia de antioxidantes o productos de oxidación en la ración, afecta al estado de oxidación *in vivo*. En concreto, determinar el efecto sobre la susceptibilidad a la oxidación de los eritrocitos a través de la tasa de hemólisis y formación de productos de oxidación secundaria. (TBARS)

## MATERIAL Y METODOS

Para la consecución de estos objetivos se realizaron dos pruebas con pollos de carne a distintas edades, utilizando grasas con distinta estabilidad oxidativa.

**Experimento 1.** 48 pollos de engorde fueron alimentados *ad libitum* entre los días 4 y 18 de vida con tres dietas ricas en AGPI w-6 que diferían en el grado de oxidación de la grasa añadida. En concreto, una dieta control que contenía 6% de: (G) aceite de girasol, (O) aceite de girasol calentado a 185 ° C durante 18 horas y (V) aceite de girasol protegido con 200ppm de acetato de alfa-tocoferol.

**Experimento 2.** 45 pollos de engorde fueron alimentados *ad libitum* entre los 21 y 42 días de vida con tres dietas experimentales, que diferían en el nivel y tipo de grasa añadida. En concreto, una dieta control que no contenía grasa añadida (C), suplementada con un 6 % de sebo (S) rico en AG saturados o linaza (L) rica en AGPI w-3.

Se realizó la extracción de sangre por punción intravenosa a la edad de 11 días (5 muestras procedentes de 10 aves, 2 pollitos/una muestra) y 18 días (6 aves por tratamiento) en el primer experimento y a los 42 días (6 muestras por tratamiento) en el segundo experimento. La sangre se almacena en tubos de heparina, para proceder al análisis de la resistencia a la lisis de la membrana eritrocitaria "RBC Haemolysis" y la formación de productos de oxidación secundaria TBARs

**Hemólisis de los glóbulos rojos (RBC Haemolysis).** La suspensión de eritrocitos previa centrifugación, fue lavada con solución salina y centrifugada. BHP (t-Butil hidroperóxido) fue añadido a cada muestra, para proceder a la lectura de su absorbancia (A) en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV-1203 SHIMADZU). La tasa de hemólisis (%) fue calculada según la siguiente fórmula (Moriguchi *et al.* 2001; modificado por Schiavone *et al.* 2004):

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

**TBARs,** 1 ml de muestra enriquecida con BHP sin incubación previa, mezclada con una solución compuesta de TBA (Ácido Tio Barbitúrico), HCL (Ácido Clorhídrico), TCA (Ácido Tricloroacético) y BHT (Butil Hidroxitolueno), llevada hasta ebullición y centrifugada, para la posterior lectura de su absorbancia. (Beuge and Steven, 1987)

**Análisis estadístico,** los datos obtenidos en ambos experimentos fueron procesados con SAS 8.2. El procedimiento utilizado fue PROC GLM y la separación de medias se hizo con el test Tukey-Kramer.

## RESULTADOS Y DISCUSION

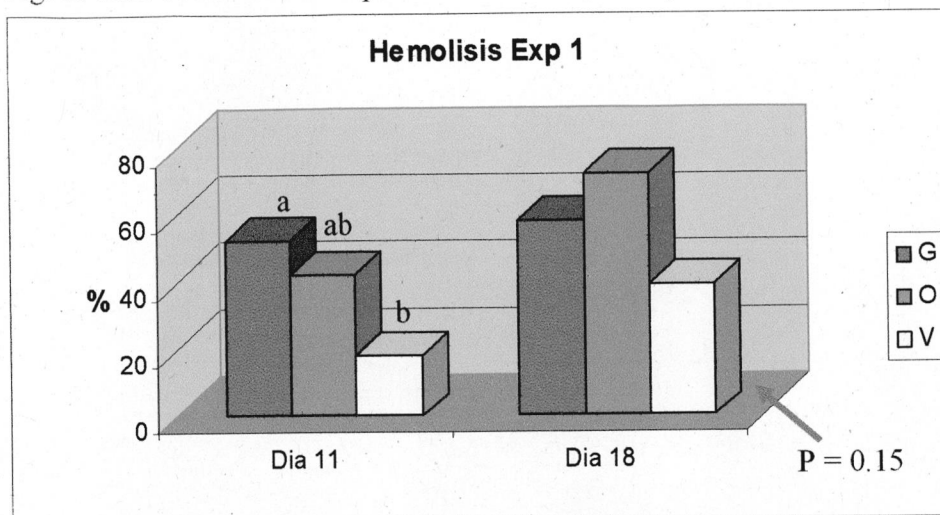
### Experimento 1.

En relación a la tasa de hemólisis (figura 1), la suplementación con acetato de alfa tocoferol presentó valores inferiores al resto de tratamientos. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas frente al tratamiento (G) el día 11 de vida ( $P = 0.008$ ). Una evolución similar se observa para los niveles de oxidación (TBARs; figura 2), siendo los tratamientos G y O los que presentan una mayor susceptibilidad a la oxidación, que se evidencia de forma estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) el día 11 (G y O vs. V) y el día 18 (O vs. V). Además, se observa una disminución de los valores de oxidación a los 18 días de edad.

Estos datos sugieren que la vitamina E mejora la integridad de la membrana de los eritrocitos incrementando su resistencia a la hemólisis, en presencia de grasa poliinsaturada y compuestos de oxidación.

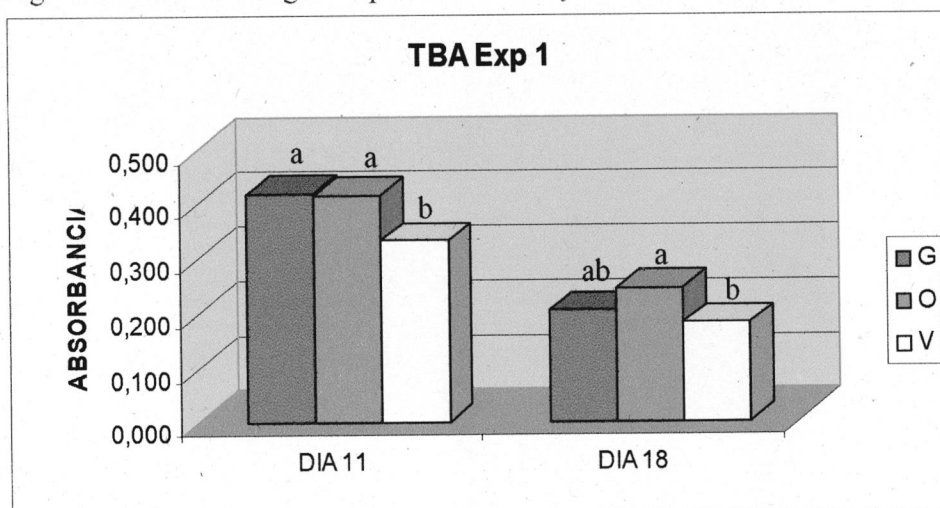
Estos resultados concuerdan, con los obtenidos por otros autores que han medido los TBARs en carne de pollo. En concreto en trabajos utilizando acetato de alfa tocoferol sobre niveles dietéticos de AGPI con y sin oxidación inducida. (Cortinas *et al.*, 2004; Gradinski-Vrbanac *et al.*, 2002 ; Schiavone *et al.*, 2005)

Fig. 1. Tasa de hemólisis en pollos de carne a los 11 y 18 días de edad



G = 6 % Aceite de girasol; O = 6 % Girasol Oxidado; V = 6 % Girasol + vit. E

Fig. 2. TBARs en sangre de pollos a los 11 y 18 días de edad.



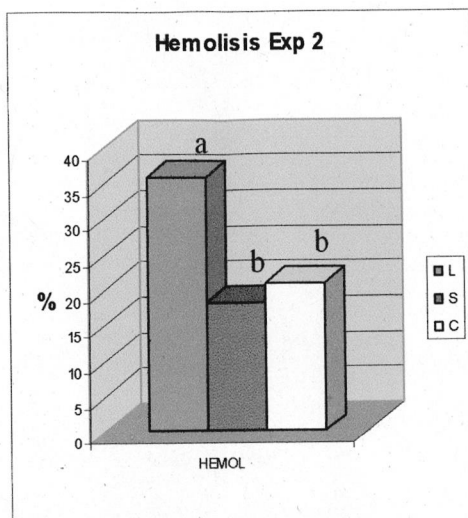
a,b = P < 0.05

### Experimento 2.

En el segundo experimento, los animales alimentados con la grasa más insaturada (linaza), presentaron una mayor sensibilidad a la hemólisis ( $P = 0.032$ ) respecto a aquellos alimentados sin grasa o con grasa saturada (sebo). (Fig. 3)

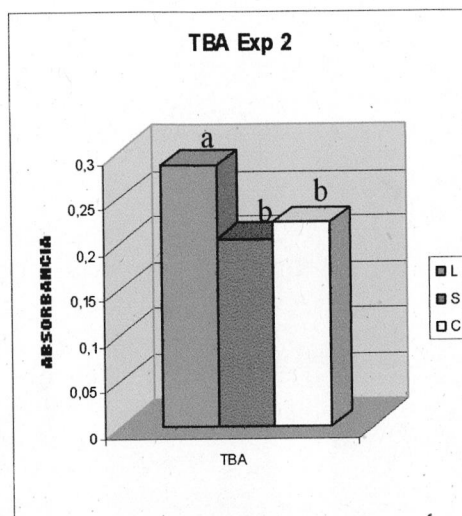
De forma similar, se observa un mayor nivel de oxidación en la sangre de los animales alimentados con aceite rico en AGPI n-3 ( $P < 0.001$ ; figura 4). Estos datos confirman la hipótesis de que el tipo de grasa y su estado oxidativo, afectan tanto a la resistencia de la membrana como a la susceptibilidad a la oxidación del eritrocito. Las diferencias encontradas en relación al grado de saturación de la grasa utilizada, concuerdan con los datos de oxidación presentados en experimentos anteriores con pollos de carne, tanto en muestras de carne, en concreto muslo (Ahn *et al.*, 1995; Cortiñas *et al.*, 2004; Surai and Sparks, 2000;), como en sangre (Moriguchi *et al.*, 2001 y Schiavone *et al.*, 2005)

Fig. 3. Tasa de hemólisis en pollos de carne a los 42 días de edad.



L = Aceite de Linaza añadida; S = Sebo; P = Pienso sin adición de grasa  
a,b =  $P < 0,05$

Fig. 4. TBARS en muestras de sangre de pollos de carne a los 42 días de edad.



Puede observarse como en los dos experimentos presentados, se produce una concordancia en los resultados obtenidos con ambas técnicas analíticas, los valores de TBARS siguen una evolución similar a los relativos a la tasa de hemólisis. De hecho se ha descrito, que un aumento de los valores TBARS provoca un aumento de la rigidez de la membrana y una menor capacidad de deformación del eritrocito, lo que da lugar a una pérdida de viabilidad (Fernández *et al.*, 1991; Moriguichi *et al.*, 2001; Novak *et al.*, 1990)

Se evidencia que ambos parámetros se ven influidos por la calidad de la grasa dietética. Por un lado, una grasa con un alto grado de insaturación (AGPI n-3 y n-6) es más susceptible a la oxidación y así se refleja en una mayor fragilidad de la membrana del eritrocito. La peroxidación lipídica de las membranas, es uno de los principales responsables del daño oxidativo de la célula. (Gradinski-Vrbanac *et al.*, 2002). La incorporación de antioxidantes refuerza la estabilidad de los lípidos de la membrana celular y previene su alteración.

Por otro lado, vemos como las grasas que contienen productos de oxidación provocan efectos perjudiciales en el ave que las consume, en parte por efectos cito-tóxicos. Estudios previos demostraron que la ingestión de compuestos oxidados, provoca cambios en la permeabilidad de las membranas. Estas modificaciones también tienen consecuencias sobre la salud intestinal del ave. Se han descrito modificaciones en la absorción de nutrientes por parte de las células epiteliales y la disminución de la vida media de los enterocitos (Chin *et al.*, 1995 y Dibner *et al.* 1996). Además la alteración en la microbiota intestinal, en concreto, la adición de grasas oxidadas se ha relacionado con un aumento en el número de coccidias en excreta. (Choque-López *et al.*, 2005), que podrían afectar indirectamente sobre la respuesta productiva de las aves.

## CONCLUSIONES

La presencia de productos de oxidación y altos niveles de insaturación en la dieta, produce una mayor sensibilidad de los eritrocitos a la rotura. La incorporación de acetato de alfa-tocoferol permite mejorar la estabilidad de los lípidos de la membrana.

Existe un paralelismo entre los resultados de la tasa de hemólisis y la susceptibilidad a la oxidación de los eritrocitos. Ambas determinaciones son capaces de discriminar diferentes estados de oxidación *in vivo*.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del proyecto Europeo (FOOD-CT-2004-0702): "Quality and safety of feeding fats obtained from waste or by-products from the food chain" y a la concesión de una beca para estudios doctorales MAE-AECL (Ministerio de Asuntos Exteriores)

## REFERENCIAS

- Addis PB, Emanuel HA, Bergman SD, Zavoral JH. 1989. Capillary GC quantification of cholesterol oxidation products in plasma lipoproteins of fasted humans. *Free Radical Biol. Med.*; 7:179-182.
- Ahn, D.U., F.H. Walfe and J.S. Sim. 1995. Dietary alpha-linoleic Acid and Mixed Tocopherols, and Packagings Influences on Lipids Stability in Broiler Chickens Breast and Lengh Muscle. *J. Food Sci.* 5:1013-1018.
- Beuge J.A., D.A. Steven. 1987. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* (52):302-310
- Cortinas, L., C. Villaverde, J. Galobart, M.D. Baucells, R. Codony and A.C. Barroeta. 2004. Fatty Acid Content in Chickens Thigh and Breast as Affected by Dietary Poliunsaturation Level. *Poult. Sci.* 83:1155-1164
- Cortinas, L., A Barroeta, C. Villaverde, J. Galobart, F. Guardiola and M-D. Baucells. 2005. Influence of the Dietary Poliunsaturation Level on chickens Meat Quality: Lipid Oxidation. *Poult. Sci.* 84:48-55.
- Chin Sou Fei, 1995. The detrimental effects of feeding oxidized fats to animals. American Soybean Association. Technical Bulletin. NO 195/11/95 Vol. PO21-1995
- Choque-López J.A., E.G. Manzanilla, A. Gomez de Segura, M.D. Baucells and A.C. Barroeta. 2005. Effects of Oxidated Fat and Vitamin E Inclusion on Resistance to Haemolysis, Intestinal Microbiota, Faecal Coccidia Counts and Epithelium Structure of Broiler Chicken. In Proceeding of the 28<sup>th</sup> Poultry Science Symposium: Avian Gut Function, Health & Disease. WPSA UK Branch. Bristol-United Kingdom.
- Dibner, J.J., C.A. Atwell, M.L. Kitchell, W.D. Shermer, F.J. Ivey. Feeding of oxidized fats to broilers and swine: effects on enterocyte turnover, hepatocyte proliferation and the gut associated lymphoid tissue. *Animal Feed Science Technology* 62(1996)1-13
- Emanuel HA, CA Hassel, PB. Addis, SD. Bergman, JH. Zavoral. 1991. Plasma cholerterol oxidation products (oxysterols) in human subjects fed a meal rich in oxysterols. *J. Food Sci.*; 56(3):843-847.

- Engberg, R. M. et al. 1996. Inclusion of Oxidized Vegetable Oil in Broiler Diets. Its Influence on Nutrient Balance and on the Antioxidative Status of Broilers. *Poultry Science* 75: 1003-1011
- Fernandes, A.C., P.M. Filipe, H. Coelho and C.F. Manso. 1991. The inhibition of lipid peroxidation by cinnarizine. Possible implications to its therapeutic and side-effects. *Biochem. Pharmacol.* 41:709-714.
- Golapakrishna, A. G., and J.V. Prabhakar, 1986. Effect of water activity on autoxidation of methyl linoleate. *J. Food Sci. Technol. Mysore, India* 23:152-157.
- Gradinski-Vrbanac B, Z. Stojevic, S. Milinkovic-Tur, T. Balenovic, J. Pirslijin and M. Zdelar-Tuk. 2002. In Vitro Suceptibility of duck, chicken, and pig erythrocyte lipids to peroxidation. *Vet. Med.-Czech*, 47, (10-11):303-308.
- Grau, A., F. Guardiola, S. Grimpa, A.C. Barroeta, and R. Codony. 2001. Oxidative Stability of Dark Chicken Meat Through Frozen Storage: Influence of Dietary Fat and alpha-tocopherol and Acsorbic Acid Supplementation. *Poult. Sci.* 80:1630-1642.
- Halliwell B. y Gutteridge, JMC. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzimol*; 186:1-85.
- Kanasawa, K., H. Ashida, S. Minamoto, and M. Nataka, 1986. The effect of orally administered secondary autoxidation products of linoleic acid on the activity of detoxifying enzymes in the rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 879:36-43
- Lin, C.F., A. Asghar, J.I. Gray, D.J. Buckley, A.M. Booren, R.L. Crackel, and C.J. Flegal, 1989. Effect of oxidized dietary oil and antioxidant supplementation on broiler growth and meat stability. *British Poultry Science* 30:855-864.
- Maraschiello, C., C. Sagara, J.A. Garcia Rugeiro. 1999. Glutathione Peroxidase Activity, TBARs, and alpha-tocopherol in Meat From Chickens fed Different Diets. *J. Agric. Food Chem.* 47:867-872.
- Moriguchi T., N. Takasugi and Y. Itakura. 2001. The Effects of Aged Garlic Extract on Lipid Peroxitation and the Deformability of Erythrocytes. *J. Nutr.* 131:1016S-1019S.
- Novak, Z., S.I. Varga, L. Pataki and B. Matkovics. 1990. Simple method for the measurement of antioxidants. *Clin. Chim. Acta* 194:115-119.
- Ruiz, J.A., A.M. Perez-Vendrell, E. Esteve-Garcia. 1999. Effect of beta-carotene and Vitamin E on Peroxidative Stability in Leng Meat of Broiler Fed Different Supplemental Fats. *J. Agric. Food Chem.* 47:448-454.
- Schiavone A, M.D. Baucells and A.C. Barroeta. 2005. Oxidative Status of Dietary Fat Influences Lipid Stability of Erythrocytes in Chickens. En proceeding of 9<sup>th</sup> Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition. Grugliasco (To), Italy.
- Surai, P.F., and N.H.C. Sparks. 2000. Tissue-specific Fatty Acid and alpha-tocopherol Profiles in male Chickens Depending on Dietary Tuna oil and Vitamin E Provision. *Poult. Sci.* 79:1132-1142.
- Villaverde, C., L.Cortinas, A.C. Barroeta, S.M. Martín-Orúe and M-D. Baucells. 2004. Relationship Between Dietary Unsaturation and Vitamin E in Poultry. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 88:143-149.

<b>Descripción</b>	<b>Experimento 1</b>	<b>Experimento 2</b>
Días de vida	4 -18	21 – 42
Grasa añadida (Tratamientos)	6 % Girasol (G) 6 % Girasol Oxidado (O) 6 % Girasol + 200 ppm acetato de $\alpha$ -tocoferol (V)	6 % Linaza (L) 6 % Sebo (S) 0 % Control (C)
Número de muestras (Sangre por punción IV))	Día 11 :n = 5 y Día 18: n = 6 muestras por tratamiento	Día 42 : n = 6 muestras por tratamiento
Análisis	Tasa de Hemólisis y TBARs	Tasa de Hemólisis y TBARs