



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este Trabajo de Fin de Grado (TFG) he podido tener la colaboración de muchas personas a las cuales quiero agradecer su ayuda. En primer lugar quiero agradecer al Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos por permitirme ser útil durante la realización de la Beca de Colaboración la cual comparte temática con el mencionado TFG. Muy especialmente dentro de este Departamento querría agradecer su ayuda a los técnicos de laboratorio, Jesús y Belén, sin los cuales hubiera sido imposible la obtención de los resultados expuestos en este TFG.

Otras dos personas dentro de la Universidad a las que querría darle las gracias son: la estudiante del Máster de Nutrición Animal, Carmen Huguet, por facilitarme mucha información sobre su Trabajo de Fin de Máster que sido de gran utilidad así como su colaboración siempre que la he necesitado, además de a mi tutor, Antonio de Vega querría darle las gracias también, por permitirme elegir esta línea de investigación que tan interesante ha resultado ser, y por guiarnos a Carmen y a mí en la realización de nuestros trabajos resolviendo las dudas que nos iban surgiendo.

En el ámbito personal me gustaría agradecer el apoyo que he recibido desde casa para poder superar los obstáculos que me han ido surgiendo durante el transcurso de la carrera de fondo que es el Grado en Veterinaria. A mi padre, Joaquín, por inculcarme la pasión por las ciencias agrarias y a mi madre, Reyes, por descubrirme que el esfuerzo y trabajo diario es la base para el éxito. A mis hermanas, Reyes y Pilar, por animarme a seguir la carrera que de verdad me apasionaba, la Veterinaria. No podría olvidarme tampoco de mi abuela, Inmaculada, que desde donde esté no me cabe la menor duda de que me da todo su apoyo y está muy orgullosa de este TFG y de todos los demás logros que he conseguido y espero conseguir en la vida. También a mi abuelo, Sebastián, cuyo cariño por el mundo del campo he tenido presente desde muy pequeño.

He podido tener el placer de rodearme de grandes personas durante los 5 años que ha durado la carrera y que ahora puedo llamar amigos. Estoy seguro de que se alegrarán de mis logros en el futuro tanto como yo de los suyos. Una pena no poder mencionarlos individualmente porque seguro que alguno me dejó pero creo que las personas a las que están dedicadas estas palabras se darán por aludidas al leer este texto.

A todos ellos, GRACIAS.

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BILBIOGRÁFICA	5
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
<i>Diseño experimental.....</i>	9
<i>Composición química de los piensos</i>	10
<i>Determinación de la oxidación lipídica de los piensos</i>	10
<i>Procedimientos matemáticos y estadísticos</i>	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
<i>Composición química de los pienso</i>	15
<i>Procedimientos matemáticos y estadísticos</i>	17
5. CONCLUSIONES	23
CONCLUSIONS.....	24
6. VALORACIÓN PERSONAL.....	25
7. BIBLIOGRAFÍA.....	26

RESUMEN

Este Trabajo de Fin de Grado forma parte del proyecto “Combinación de antioxidantes intra y extracelulares para minimizar el estrés oxidativo de caballos sometidos a diferentes grados de ejercicio e incrementar la vida útil de los piensos”, financiado por la empresa CADEBRO. El objetivo fue conocer el efecto de dos dosis (50 y 100 mg/kg de pienso) de dos antioxidantes (etoxiquina y butil-hidroxi-tolueno (BHT)) sobre la vida útil de un pienso en dos presentaciones (gránulo o mezcla), y sometido a dos temperaturas de conservación (ambiente ($< 25^{\circ}\text{C}$) y a 50 $^{\circ}\text{C}$).

Para poder alcanzar este objetivo se cuantificó mensualmente el índice de anisidina, como indicador de la oxidación lipídica secundaria, en los piensos conservados durante un periodo de seis meses.

Además se analizó la composición química de los piensos, comparándola con la ofrecida en la etiqueta, pudiéndose apreciar una mayor coincidencia en los piensos granulados que en los presentados en forma de mezcla.

Los resultados del análisis del índice de anisidina mostraron lo siguiente: 1.- la grasa del pienso en forma de grano se oxida más que la del pienso en mezcla, 2.- a mayor temperatura, mayor es la oxidación de las grasas de los piensos, 3.- en las citadas condiciones la etoxiquina a altas concentraciones (100 mg/kg) es más eficaz que el BHT como antioxidante, aunque el uso de la misma ha sido recientemente prohibido por la Unión Europea.

ABSTRACT

“Effect of the use of antioxidants in horse's compound feeds to increase their stability in high-temperature conditions”

This Final Degree Project forms part of the project called “Combination of intra and extracellular antioxidants to minimize oxidative stress in horses subjected to varying levels of exercise and to increase feeds' lifetime”, financed by CADEBRO. The main objective was to know the effects of two doses (50 and 100 mg per feed kg) of two antioxidants (ethoxyquin and butyl-hydroxytoluene) on feeds' lifetime in two methods of presentation (granule or meal), and subjected to two storage temperatures (room temperature ($< 25^{\circ}\text{C}$) and 50°C).

To achieve this objective, the anisidine index was used as an indicator of secondary lipid oxidation. This index was quantified monthly in feedingstuffs kept for a period of six months.

In addition, the chemical composition of the feed was analyzed, comparing it with the one offered in the label, being possible to see a greater coincidence in the granulated feed than in those presented in the form of meal.

The results of the analysis of the anisidine index showed the following: 1. - the fat of the feed in the form of grain is oxidized more than that of the feed in mixture, 2. - the higher the temperature, the greater the oxidation of fats in feed, 3. - under these conditions ethoxyquin at high concentrations (100 mg / kg) is more effective than BHT as an antioxidant, although the use of ethoxyquin has recently been banned by the European Union.

INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Actualmente, para llegar a cubrir las altas necesidades energéticas de los caballos en entrenamiento se utilizan grasas y aceites. Éstos permitirán a los caballos cubrir las necesidades que, según el INRA [1] alcanzan las 2,5-3,0 UFC/h si el ejercicio que los animales realizan es intenso. Además de esto, las grasas y aceites permiten la reducción de la cantidad de hidratos de carbono solubles que ha de llevar el pienso, lo cual previene la aparición de algunos tipos de cólicos derivados de fermentaciones anómalas en el tracto intestinal, y que podrían derivar en problemas de laminitis o infosura [2].

El uso de grasas y aceites en los piensos puede presentar varios problemas, de los cuales el más relevante es el proceso de oxidación que tiene lugar durante el procesado, el almacenamiento y/o el transporte de los diferentes productos destinados a la alimentación animal. Esta oxidación se debe, principalmente, a reacciones de autooxidación en las que los ácidos grasos insaturados provenientes de las grasas vegetales de los piensos reaccionan con el oxígeno ambiental.

A este proceso también se le conoce como rancidez oxidativa, y supone el factor limitante a la hora de calcular la vida útil de los piensos que contengan incluso pequeñas cantidades de grasa (hasta el 0,5%-1%) [3]. Para poder frenar esta reacción se utilizan unas sustancias conocidas como antioxidantes, que pueden ser de carácter enzimático o no enzimático [4].

En cuanto al proceso de rancidez oxidativa cabe destacar que consta de tres fases diferentes: la fase de iniciación, la fase de propagación y la fase de terminación. En la fase de iniciación, diversos iniciadores como la luz, el calor, trazas de metales u otros radicales favorecen la pérdida de un átomo de hidrógeno del ácido graso, creando así un radical libre. La duración del período de iniciación, y la velocidad de oxidación, dependen de la naturaleza del ácido graso oxidable. Así, el linolénico forma radicales antes que el linoleico, y éste a su vez antes que el oleico. De la misma manera, los ácidos grasos insaturados forman más fácilmente radicales libres cuando se extrae un átomo de H de un grupo metilénico que de un grupo alilo aislado [5, 6].

En la fase de propagación, el radical lipídico formado reacciona rápidamente con oxígeno ambiental para dar lugar a un radical peroxilo, el cual actúa como iniciador para extraer de otra molécula lipídica un hidrógeno, y así formar un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical lipídico, que inicia de nuevo la fase de propagación. De esta manera, muchas moléculas lipídicas pueden ser oxidadas hasta hidroperóxidos mediante diversas formas de iniciación. Esta fase es

interrumpida debido a las reacciones de terminación, en las cuales hay consumo de radicales [5, 6].

En la fase de terminación, los hidroperóxidos provenientes de la etapa de propagación interaccionan con otras moléculas generando nuevas sustancias. Estos hidroperóxidos pueden fragmentarse por roturas homolíticas y/o heterolíticas de enlaces.

Por sí solos, los hidroperóxidos no afectan a la calidad de las grasas, pero las sustancias que se forman como producto de las reacciones secundarias o terciarias de la rancidez oxidativa, como los aldehídos, cetonas, alcoholes u otros hidrocarburos, pueden tener efectos perjudiciales sobre la productividad animal y la salud [7].

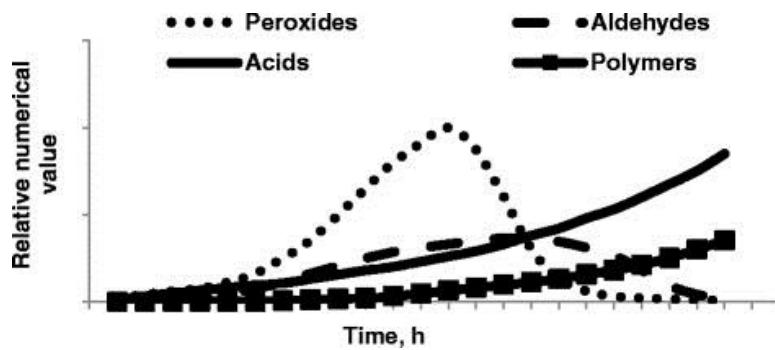


Figura 1: Efecto del tiempo sobre la aparición de diferentes productos de la oxidación de las grasas [6]

En la Figura 1, se puede apreciar cómo al pasar el tiempo van aumentando las cantidades de hidroperóxidos, hasta cierto punto en el cual se empiezan a formar aldehídos y aumenta la concentración de otros ácidos carboxílicos, que son los que alteran las grasas y/o aceites del pienso [7].

De los aldehídos que más se han estudiado como producto de la peroxidación lipídica destacan el malondialdehído (MDA) y los 4- hidroxialquenales, en especial el 4-hidroxinonenal (HNE) y el 4-hidroxihexenal. El MDA es una molécula volátil de bajo peso molecular, presente en las reacciones de degradación por peroxidación lipídica de todos los ácidos grasos, por lo que se ha establecido como marcador para este proceso [4].

La rancidez oxidativa de los piensos produce una disminución de su valor nutritivo, ya que reduce el balance energético teórico de la dieta debido a una reducción de la energía disponible para el animal. También se ve comprometida la presencia de otros nutrientes liposolubles como vitaminas (A, D, E y K) y pigmentos carotenoides [8].

Si el nivel de peróxidos en el pienso es muy elevado puede llegar a resultar tóxico para el animal, ya que se podrán oxidar los ácidos grasos insaturados (fácilmente oxidables) presentes en las membranas celulares del animal, proceso que se produce de forma más gradual de manera natural y que, además, en condiciones normales se ve frenado por un conjunto de enzimas que evitan la oxidación tisular como son la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Si este sistema se ve superado por la cantidad de peróxidos en la dieta, se pueden producir alteraciones en los componentes biológicos del animal como son lípidos, proteínas o DNA [8]. Además, a nivel organoléptico se pierden cualidades (flavor, textura, aroma), lo que provoca que el animal ingiera el alimento en menor cantidad, resultando de esto un menor consumo energético que puede llegar a no cubrir las necesidades de mantenimiento y entrenamiento del caballo [3].

Para poder frenar estas reacciones de oxidación lipídica, y así combatir los efectos perjudiciales de los productos derivados de las mismas, se utilizan moléculas conocidas como antioxidantes [9]. Éstos son sustancias que, estando presentes en bajas concentraciones, son capaces de prevenir o retrasar la oxidación de moléculas como los lípidos en los piensos [10].

Los antioxidantes se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos. En el primer grupo se incluyen, entre otras, las enzimas superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa, y su modo de actuación consiste en catalizar la transferencia de electrones desde un sustrato a los radicales libres que se forman en la fase de iniciación [11].

Los antioxidantes no enzimáticos, a su vez, se dividen en naturales o sintéticos. Dentro de los antioxidantes naturales los más conocidos son las vitaminas C y E (también llamadas ácido L-ascórbico y α -tocoferol, respectivamente), glutatión, carotenoides y compuestos fenólicos. La vitamina E destaca por su carácter lipofílico, y previene la oxidación especialmente de los ácidos grasos poliinsaturados, mientras que la vitamina C, de carácter hidrofílico, participa en el reciclaje de radicales producidos en la oxidación de la vitamina E. El glutatión actúa a nivel celular en el animal, por lo que no es de utilidad para incrementar la vida útil de los piensos. Los carotenoides intervienen en las reacciones de formación de radicales libres, mientras que los compuestos fenólicos intervienen en la fase de propagación deteniendo las reacciones que en ella tienen lugar [12].

De los antioxidantes sintéticos cabe destacar dos de ellos: el butil-hidroxi-tolueno (BHT) y la etoxiquina (6-etoxy-1,2-dihidro-2,2,4-trimetilquinolina), esta última recientemente prohibida en la Unión Europea para su uso en piensos [13].

El BHT es un fenol con acción antioxidante similar a la de la vitamina E, ya que dona un átomo de hidrógeno a un radical peroxi o alcohoxi evitando la fase de propagación de la rancidez oxidativa. Esto es debido a la estructura fenólica del anillo aromático, gracias a la cual el radical oxigenado no puede sustraer átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos insaturados [14]. La etoxiquina, por su parte, forma parte de las quinoleínas, y su acción antioxidante también proviene de su estructura basada en la unión de un núcleo de benceno y de un núcleo piridínico.

La etoxiquina es a día de hoy el antioxidante más potente usado en la industria de la nutrición animal ya que ni los naturales ni el BHT, entre otros tienen tal efecto antioxidante ya que tanto la etoxiquina como productos derivados de su degradación tienen estos efectos [15]. El principal problema que ofrece la etoxiquina es que hay indicios de que ciertos aditivos que se le añaden en el proceso de elaboración, como la p-fenetidina, pueden tener un efecto mutagénico. Tanto la etoxiquina como el BHT son antioxidantes secundarios, ya que actúan en las reacciones de propagación evitando que se extiendan los radicales libres [8] y, a día de hoy, ambos son muy usados en nutrición animal. El objetivo del presente estudio es determinar hasta qué punto la acción antioxidante del BHT es comparable a la de la etoxiquina a diferente dosis y temperaturas de conservación de los piensos que los incluyen, y así valorar si puede ser utilizado como sustitutivo de la misma.

JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS

Este Trabajo de Fin de Grado forma parte del proyecto titulado “Combinación de antioxidantes intra y extracelulares para minimizar el estrés oxidativo de caballos sometidos a diferentes grados de ejercicio e incrementar la vida útil de los piensos”, financiado por la empresa CADEBRO. En el marco del proyecto, mi trabajo se ha centrado en el estudio del efecto de dos dosis (50 y 100 mg/kg de pienso) de dos antioxidantes (etoxiquina y butil-hidroxi-tolueno (BHT)) sobre la vida útil de un pienso en dos presentaciones (gránulo o mezcla), y sometido a dos temperaturas de conservación (ambiente ($< 25^{\circ}\text{C}$) y a 50°C). El uso de grasas y aceites en los piensos puede presentar varios problemas, de los cuales el más relevante es el proceso de oxidación que tiene lugar durante el procesado, el almacenamiento y/o el transporte de los diferentes productos destinados a la alimentación animal. Esta oxidación se debe, principalmente, a reacciones de autooxidación en las que los ácidos grasos insaturados provenientes de las grasas vegetales de los piensos reaccionan con el oxígeno ambiental. A este

proceso también se le conoce como rancidez oxidativa, y supone el factor limitante a la hora de calcular la vida útil de los piensos.

El principal objetivo de este trabajo fue, por tanto, cuantificar el grado de peroxidación lipídica o rancidez oxidativa de los piensos citados y conservados durante seis meses en las condiciones indicadas. De esta manera puede determinarse si estos piensos son aptos para el transporte y almacenamiento en condiciones de temperatura extrema, como las que se dan en los países del Golfo Pérsico, ya que el objetivo de CADEBRO es abrir mercado en esa zona del planeta.

Al margen del interés que tiene para la empresa, el estudio es novedoso ya que, aunque se conoce que a mayor temperatura aumentan las reacciones de peroxidación lipídica, este hecho se ha demostrado con grasas procedentes de aceites [16] o carnes [17], pero no con grasas incorporadas en piensos compuestos.

Es importante recalcar que en el presente estudio se ha trabajado con presentaciones del pienso en mezcla y en granulado. Ya que esta última presentación implica el tratamiento de las materias primas molidas con calor, presión y humedad, la oportunidad para comprobar como afectaban estos factores a la peroxidación lipídica fue evidente.

También es imprescindible señalar que la Unión Europea ha prohibido muy recientemente el uso de la etoxiquina como antioxidante en los piensos [3], por lo que el presente estudio permitirá contrastar si el BHT presenta el mismo grado de protección frente a la oxidación lipídica que aquélla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

En el presente estudio se ha trabajado con un mismo pienso, en dos presentaciones (granulado o mezcla) y sometido a dos condiciones de conservación: a temperatura ambiente (menos de 25 °C), y a 50 °C en estufa de desecación, con el objetivo de simular las condiciones extremas que se pueden dar durante el transporte a, y almacenaje en países del Golfo Pérsico. Para cada una de las presentaciones y condiciones de conservación se utilizaron tres piensos: Control, que incluía 0.1 mg de butilhidroxianisol (BHA) /kg de pienso (en materia fresca) como antioxidante; Control más 50 mg/kg de pienso de etoxiquina (ETOX 50); Control más 100 mg de etoxiquina/kg de pienso (ETOX 100); Control más 50 mg/kg de pienso de butilhidroxitolueno (BHT)/kg de pienso (BHT 50) y Control más 100 mg de BHT/kg de pienso (BHT 100). Por tanto, en total se

trabajó con 20 muestras de pienso diferentes , de las cuales se obtuvo una muestra mensual (en recipientes de plástico (debidamente identificados con el tipo de muestra que guardaban) de aproximadamente un litro de capacidad, y con doble tapa para evitar contaminaciones y oxidaciones lipídicas adicionales en las muestras tomadas) durante un periodo de ensayo de seis meses para comprobar la evolución de la rancidez oxidativa en función del tiempo y temperatura de conservación. Aunque el pienso control ya incluía BHA como antioxidante, la concentración fue de entre 500 y 1000 veces menor que las de BHT y etoxiquina, por lo que se pensó que era difícil un enmascaramiento del efecto de estos dos últimos antioxidantes por la presencia de BHA.

Composición química de los piensos

La composición química de los piensos se determinó sobre muestra original de los mismos (diez muestras, cinco por cada forma de presentación), no sobre las muestras mensuales indicadas más arriba.

Tras la molienda a través de una criba con un tamaño de poro de 1 mm, la materia seca de laboratorio fue obtenida mediante secado en estufa a 104°C durante 24 horas, y la materia orgánica mediante incineración a 550°C durante 8 horas [18]. El nitrógeno total fue determinado siguiendo el método Kjeldahl, usando cobre como catalizador [18] y un equipo 2300 *Kjeltec Analyzer Unit (Foss Tecator)*. El extracto etéreo (EE) o grasa bruta fue determinado utilizando un *ANKOM^{XT15} Extraction System* [19] y siguiendo las recomendaciones del fabricante. La fibra neutro detergente (FND) se analizó con un equipo *ANKOM²⁰⁰ Fiber Analyzer*, de acuerdo con el método propuesto por Mertens [20] (ebullición con solución neutra de sulfato lauril sódico y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)). La fibra ácido detergente (FAD) y la lignina ácido detergente (LAD) de los alimentos se determinó de acuerdo con los procedimientos descritos por la AOAC [18] (ebullición con una solución ácida de bromuro de cetiltrimetilamonio) y por Robertson y Van Soest [21] (utilizando ácido sulfúrico concentrado al 72%), respectivamente. Las tres entidades fueron expresadas libres de cenizas tras un análisis secuencial (FND-FAD-LAD).

Determinación de la oxidación lipídica de los piensos

Las muestras mensuales fueron inmediatamente molidas en un molino de martillos a través de una criba con orificios de 1 mm de diámetro, y conservadas a -80°C, en bolsas de plástico cerradas e identificadas, hasta su análisis. Éste consistió en la extracción de la grasa de las muestras de piensos, previa homogeneización de las mismas, utilizando el método descrito en el apartado anterior. Otro posible método de extracción de grasas que se consideró fue el método en frío de Bligh y Dyer [22]. Éste consiste en utilizar cloroformo y metanol como

disolventes, y posteriormente eliminarlos utilizando diferentes técnicas como la filtración, la sedimentación o el rotavapor. El principal inconveniente que ofreció el método de extracción de Bligh y Dyer fue que la eliminación de los disolventes con el rotavapor no fue posible por la alta volatilidad de los mismos, por lo que para eliminar totalmente el cloroformo fue necesario emplear grandes cantidades de nitrógeno, lo cual incrementaba notablemente el coste económico de esta parte del proceso. Por este motivo se decidió utilizar el método de extracción en caliente mediante el *ANKOM^{XT15} Extraction System*, pese a que éste presentaba dos desventajas: el pesaje de la grasa en caliente podía afectar a la precisión del valor y, por otra parte, si se pretendía utilizar el índice de peróxidos como medidor de la rancidez de las grasas (como así fue en un principio), éste se podía ver incrementado por el tratamiento térmico de las grasas.

Para la extracción de grasas en caliente se pesó, utilizando una báscula de precisión, una cantidad de material que oscilaba entre los 2 y los 2,2 gramos en las bolsas filtro de celulosa para la extracción de grasas de ANKOM®. De cada tipo de muestra se pesaron siete bolsas con esas cantidades. Una vez pesadas se procedió a cerrar las bolsas mediante termosellado, con el fin de evitar la fuga de partículas, y se introdujeron en el extractor de grasas *ANKOM^{XT15} Extraction System* en la disposición correcta. El extractor funciona disolviendo la grasa del pienso en éter de petróleo a alta temperatura, aumentando así la solubilidad de las grasas. Una vez extraídas éstas se dejó reposar la mezcla en el interior del extractor hasta que se evaporó el éter de petróleo, quedando únicamente la grasa de los piensos. Esta grasa fue recogida y almacenada a -80°C hasta ser procesada con el método analítico necesario para cuantificar la oxidación de las grasas: el índice de peróxidos, el cálculo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico o el índice de anisidina.

Inicialmente se planteó utilizar el índice de peróxidos, basado en una reacción colorimétrica entre el yodo, proveniente del yodato potásico tras reaccionar con los peróxidos de las grasas oxidadas, y una solución estándar de almidón [23]. No obstante, tras intentar cuantificarlo se observó una interferencia reiterada de color de diversos pigmentos contenidos en el pienso (Figura 1), motivo por el cual se decidió descartar como método de cuantificación de la oxidación de la grasa el índice de peróxidos.

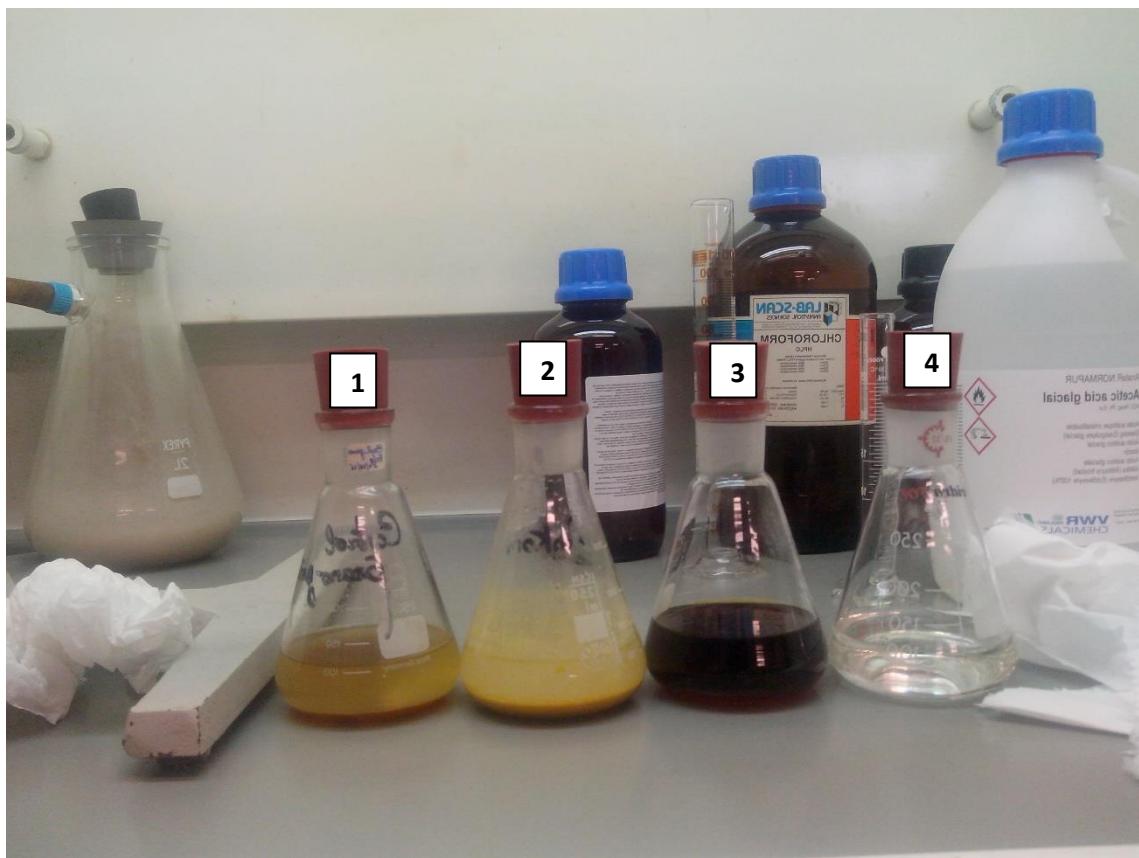


Figura 1. El frasco 1 contiene una muestra de grasa extraída con el método de extracción en frío. El frasco 2, una muestra de grasa extraída con el método de extracción en caliente. El frasco 3 se corresponde al viraje apreciable en una grasa oxidada (aceite de cocina) utilizando el método de reacción colorimétrica al yodo (índice de peróxidos). El frasco 4 contiene una muestra de grasa del mismo aceite de cocina oxidado que el frasco 3, la cual es transparente debido a la ausencia de pigmentos puesto que son eliminados en el proceso de extracción de grasas puesto que no se hallan tan íntimamente ligados a la grasa como en el caso de los piensos.

Además se observó que utilizando el índice de anisidina se podían cuantificar productos de la oxidación más estables que los hidroperóxidos, como son las cetonas o los aldehídos, de forma que los resultados serían más perdurables en el tiempo.

Para obtener el índice anisidina se pesaron, en una báscula de precisión, aproximadamente 0,2 gramos de grasa de cada muestra, que se disolvieron en 10 ml de isooctano con la ayuda de un agitador magnético. Pese a que la ES ISO 6885-2012 [24] indica que han de pesarse entre 0,4 y 4 g de grasa, en nuestro caso estas cantidades condujeron a valores de absorbancia en el espectrofotómetro excesivamente altos (superiores a 0,8), que aumentaron progresivamente con el tiempo de conservación. Por ello se decidió reducir la cantidad de grasa pesada en las sucesivas mediciones. Otra dificultad que surgió durante este experimento fue que la mezcla de

p-anisidina, isoctano y muestra de grasa que se analizaba en el espectrofotómetro ofrecía cierta turbidez por lo que era imposible poder medir su absorbancia. Para solucionar esto, se comprobó cuál de los productos que participaban en la reacción estaba defectuoso o con algún tipo de fallo en su preparación previa. Se encontraron fallos en la preparación de p-anisidina por lo que fue necesaria la purificación de la misma mediante el protocolo laboratorial mencionado anteriormente [24].

Para la elaboración del ‘valor cero’ (A_0), se mezclaron 5 ml de la mezcla de grasa e isoctano con 1 ml de ácido acético glacial utilizando un agitador mecánico, dejando reposar la dilución 8 minutos en condiciones de oscuridad. La lectura de la absorbancia se realizó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 350nm [24].

Para la elaboración del valor A_1 se añadió a un A_0 1 ml de p-anisidina, previamente purificada si presentaba alguna coloración grisácea. Para llevar a cabo esta purificación se disuelven 4 gramos de p-anisidina en 100 ml de agua a 75°C. A esta disolución se le añaden 0,5 gramos de sulfito de sodio y 2 gramos de carbón y, seguidamente se agita durante 5 minutos la disolución. Posteriormente se filtra la misma por medio de un papel de filtro y en condiciones de vacío, para conseguir una disolución de color claro, y se enfriá el filtrado a 0°C manteniéndolo a esta temperatura durante 4 horas. Finalmente se deja secar el líquido filtrado en un desecador de vacío para eliminar el agua presente y obtener la p-anisidina pura. La p-anisidina es necesario conservarla en condiciones de oscuridad y refrigeración (0°C-4°C), y debe usarse en las menores cantidades posible debido a su alta capacidad carcinogénica. La combinación de reactivos se dejó reposar durante 8 minutos en condiciones de oscuridad y se leyó en espectrofotómetro en las mismas condiciones que el A_0 . Por último, se procedió a realizar el blanco (A_2) para lo cual fueron necesarios dos reactivos: 5 ml de isoctano y 5 ml de p-anisidina. Este A_2 también se dejó reposar 8 minutos en condiciones de oscuridad, leyéndose en espectrofotómetro en las mismas condiciones ya citadas.

En las tres soluciones se calculaba un tiempo de aproximadamente 2 minutos entre que se acababa el reposado de la solución en la oscuridad y que era procesada en el espectrofotómetro, siendo así un total de 10 minutos lo que se dejaba para que la reacción colorimétrica entre la p-anisidina y las grasas oxidadas tuviera lugar. En el caso de que no estuvieran todos los reactivos (como en el caso del blanco y el cero) se usaba este tiempo igualmente para homogeneizar el proceso.

Procedimientos matemáticos y estadísticos

Para obtener los valores del índice de anisidina se utilizó la siguiente fórmula matemática:

$$AV = \frac{100QV}{m} [1,2(A_1 - A_2 - A_0)]$$

En la que:

- AV es el índice de anisidina sobre el cual realizaremos la interpretación.
- Q es el contenido de muestra de la solución medida en las unidades del valor de anisidina (gramos por mililitro). En este caso, Q= 0,01 g/ml.
- V es el volumen en el que la muestra está diluida. En este caso, V= 25 ml.
- m es la masa de la muestra de grasa en gramos.
- A₁ es la absorbancia de la preparación A₁ en la cual tiene lugar la reacción colorimétrica entre la p-anisidina y la grasa problema.
- A₂ es la absorbancia de la preparación A₂ o blanco en la que está presente la p-anisidina y el isooctano.
- A₀ es la absorbancia de la preparación A₀ o cero, en la cual no tiene lugar la reacción colorimétrica ya que únicamente contiene la grasa problema, el isooctano y ácido acético glacial.

Para comparar los valores de composición química de los piensos indicados en la etiqueta y los determinados en el laboratorio se estableció una regresión lineal entre los valores de cenizas, proteína bruta (nitrógeno x 6,25) y EE obtenidos por ambos métodos. Los valores de fibra no pudieron incluirse en esta regresión, ya que las etiquetas solo especificaban a fibra bruta, mientras que analíticamente se determinaron FND, FAD y LAD, indicadores mucho mejores del contenido en paredes celulares de los piensos para animales herbívoros [25].

También se establecieron regresiones lineales, para cada tratamiento (Control, BHT50, BHT100, ETOX50 y ETOX100), entre los índices de anisidina y el tiempo de conservación de los piensos con el objetivo de examinar la efectividad de los diferentes antioxidantes (y sus dosis) durante tiempos prolongados de almacenamiento.

Los índices de anisidina mensuales se analizaron estadísticamente mediante un modelo mixto con medidas repetidas (PROC MIXED, SAS), considerando la presentación (granulado o mezcla), la forma de conservación (temperatura ambiente o 50 °C), el tipo y dosis de antioxidante y el mes como efectos fijos. También se consideró como factor fijo la interacción cuádruple entre los factores principales. Probabilidades menores de 0,05 se consideraron significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química de los piensos

En la Tabla 1 se muestra la composición química de los piensos utilizados en el presente experimento, determinada en el laboratorio, y en la Figura 2 la relación existente entre ésta y la declarada en la etiqueta. En esta relación solo fue posible utilizar los contenidos en cenizas, proteína bruta y extracto etéreo, ya que la fibra fue cuantificada por la empresa en forma de fibra bruta, mientras que en nuestro caso se diferenció entre fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina ácido detergente. Es necesario recordar que la entidad fibra bruta no representa de forma adecuada el contenido en paredes celulares vegetales del pienso, ya que en el procedimiento químico para obtenerla se solubilizan prácticamente todas las hemicelulosas, porciones variables de celulosa e incluso parte de la lignina [25].

Tabla 1: Composición química de los piensos utilizados en el presente trabajo. Expresados en % de materia seca del pienso.

	Gránulo	Mezcla
Cenizas	7,711468858	5,989716391
PB	14,46806355	13,13797086
EE	6,705115257	5,45750496
FND	21,27897666	26,8110906
LAD	9,104293014	12,142768
FAD	1,691315685	3,50916389

Los valores analíticos de laboratorio son la media de los 5 piensos utilizados (Control, BHT 50, BHT100, ETOX 50 y ETOX 100).

En el caso del pienso granulado la composición analítica fue muy similar a la declarada en la etiqueta (pendiente de 0,9096), aunque estas últimas subestimaron en alrededor de un 10% los valores de laboratorio, mientras que en el caso del pienso en forma de mezcla los valores de la etiqueta subestimaron en casi un 30% (pendiente de la regresión de 0,7316) los obtenidos analíticamente en el laboratorio. Este hecho pudo ser debido a la mayor dificultad para obtener muestras homogéneas del pienso en forma de mezcla, ya que el tamaño de partícula de los mismos fue muy grande (gran cantidad de materias primas sin moler o molidas muy groseramente).

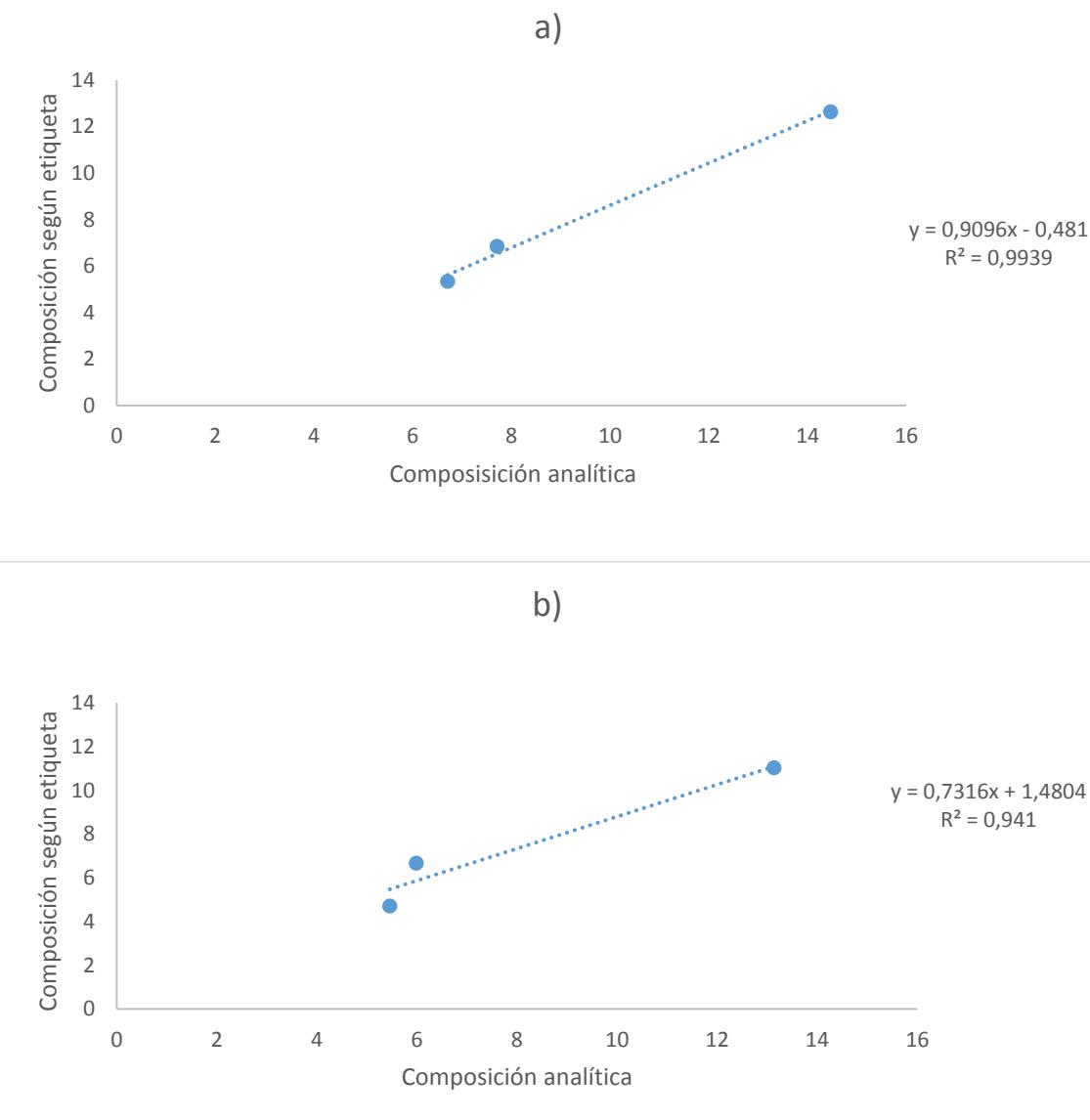


Figura 2. Relación entre la composición analítica de los piensos y la declarada en la etiqueta. a) Presentación en forma de granulado. b) Presentación en forma de mezcla

El pienso en forma granulada ha debido ser previamente molido [26] lo cual permite una mezcla más uniforme de todos los componentes del mismo. Estas diferencias en la homogeneidad de los piensos granulado y en forma de mezcla justificarían los diferentes valores de los coeficientes de determinación ($R^2=0,994$ en el caso del pienso granulado, y $R^2=0,941$ en el pienso en forma de mezcla). El hecho de que las etiquetas de los piensos reflejen una concentración de nutrientes inferior a la analizada en laboratorio es un hallazgo habitual, que puede justificarse por el deseo de las empresas de no arriesgarse a denuncias por fraude comercial. También es necesario indicar que la composición que figura en las etiquetas de los piensos no proviene, generalmente, de un análisis químico de los mismos en fábrica, sino que son valores teóricos obtenidos al elaborar las fórmulas.

Determinación de la oxidación lipídica de los piensos

En la Tabla 2 se presentan los resultados mensuales del índice de anisidina de los diferentes piensos sometidos a dos formas de conservación (temperatura ambiente ($< 25^{\circ}\text{C}$) o en estufa a 50°C) y en dos formas de presentación (granulado o en mezcla). La cuádruple interacción entre el mes de muestreo, las formas de presentación y conservación, y el tipo de pienso (Control, BHT 50, BHT 100, ETOX 50 y ETOX 100) fue altamente significativa ($P<0,0001$), reflejando la falta de tendencias uniformes.

Cuando se establecieron regresiones lineales entre el tiempo de conservación y el índice de anisidina para cada tipo de presentación y forma de conservación (Figuras 3, 4, 5 y 6) se observó que a mayor temperatura de conservación se producía una mayor oxidación, como ya ha sido descrito por otros autores [7,27]. Por otra parte, y aunque no se realizó un test de homogeneidad de las pendientes de las regresiones, en el caso del granulado conservado a altas temperaturas la efectividad antioxidante parece que fue superior para la etoxiquina (más a mayor dosis) que para el BHT, mientras que en el caso del pienso en mezcla conservado en las mismas condiciones este orden no se mantuvo. Una posible causa pudo ser la menor homogeneidad del pienso en mezcla, lo que pudo suponer una dificultad para la correcta distribución de los antioxidantes, añadidos en dosis muy bajas.

En el caso de los piensos conservados a temperatura ambiente la oxidación fue en todos los casos muy baja, no pareciendo existir un efecto claro de los antioxidantes sobre la vida útil de los piensos.

Tabla 2: Efecto del tipo y dosis de antioxidante, y de la forma de conservación y de presentación del pienso, sobre el índice de anisidina

	CONTROL				BHT 50				BHT 100				ETOX 50				ETOX100					
	< 25°C		50°C		< 25°C		50°C		< 25°C		50°C		< 25°C		50°C		< 25°C		50°C			
MES	G	M	G	M	G	M	G	M	G	M	G	M	G	M	G	M	G	M	G	M	G	M
1	α 27,5 a	α 11,8 b	α 27,5 a	α 11,8 b	α 17,8 a	α 12,9 b	α 17,8 a	α 12,9 b	α 17,9 a	α 10,2 b	α 17,9 a	α 10,2 b	α 18,9 a	α 8,7 b	α 18,9 a	α 8,7 b	α 14,5 a	α β 13,4 bx	α 14,5 ay	α 13,4 bx	α 13,4 ay	
2	β 31,5 ax	β 15,8 bx	β 39,8 ay	β 21,1 by	ε 27,7 ax	β 19,8 bx	α 20,7 ay	α 15,1 by	β 27,9 ax	α 11,6 bx	α 17,2 ay	α 13,3 bx	β 25,8 ax	α 11,0 bx	β 5,6 ay	β 21,9 by	β 29,4 ax	α 16,4 bx	β 9,3 ay	αβ 16,2 bx	α 16,2 ay	
3	αβ 29,2 ax	ε 24,6 ax	ε 92,7 ay	ε 82,3 by	αβ 19,9 ax	ε 30,2 bx	ε 51,7 ay	β 61,7 by	α 20,2 ax	β 17,2 bx	ε 29,2 ax	β 53,9 by	α 18,3 ax	β 22,5 ax	α 22,9 ax	ε 60,9 by	αε 20,1 ax	α 16,6 ax	ε 24,8 ax	ε 53,0 by		
4	αβ 31 ax	βε 22,5 ax	μ 71,2 ay	ε 82,3 by	β 23,9 ax	β 21,6 ax	μ 61,1 ay	ε 92,7 by	β 33,4 ax	βα 16,0 bx	μ 50,0 ay	β 61,6 by	αβ 24,5 ax	β 21,5 ax	ε 49,4 ay	εμ 66,9 by	βε 23,6 ax	α 20,4 ax	μ 37,5 ay	βμ 69,5 by		
5	αβ 29,2 ax	ε 22,8 bx	λ 85,1 ay	ε 76,9 by	β 23,0 ax	β 20,8 ax	λ 78,4 by	μ 74,5 by	α 20,8 ax	β 16,4 ax	λ 68,5 by	ε 72,1 by	α 20,4 ax	βε 16,3 ax	εμ 51,4 by	μ 70,1 by	εμ 22,2 ax	α 17,7 ax	μ 34,1 ay	μ 64,6 by		
6	ε β 35,0 ax	βε 20,2 xb	Ω 131 ay	μ 94,3 by	α 21,5 ax	β 22,4 ax	λ 72,3 by	μ 44,2 by	β 31,2 ax	β 21,4 bx	μ 57,2 ay	ε 78,6 by	αβ 23,3 ax	αε 12,3 bx	ελ 46,5 ay	ε 61,1 by	βμ 28,2 ax	β 10,1 bx	λ 49,9 ay	λ 117 by		

BHT 50: Pienso control más 50 mg de butilhidroxitolueno/kg de pienso; BHT 100: Pienso control más 100 mg de butilhidroxitolueno/kg de pienso; ETOX 50: Pienso control más 50 mg de etoxiquina/kg de pienso; ETOX 100: Pienso control más 100 mg de etoxiquina/kg de pienso.

< 25 °C: Piensos conservados a temperatura ambiente; 50 °C: Piensos conservados en estufa a 50 °C.

G: Presentación del pienso en forma de gránulo; M: Presentación del pienso en forma de mezcla.

a, b: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre formas de presentación dentro de una misma forma de conservación.

x, y: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre formas de conservación dentro de una misma forma de presentación.

α, β, ε, λ, μ, Ω: letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre meses de muestreo dentro de cada forma de conservación y presentación.

GRÁNULO - ESTUFA

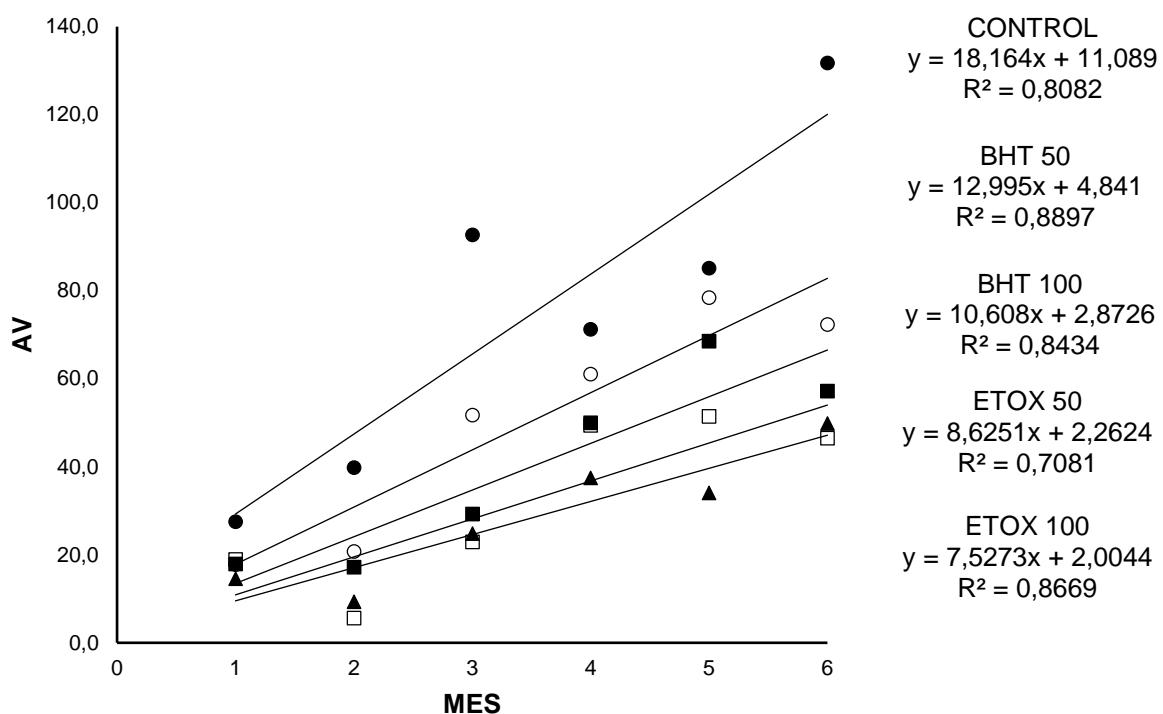


Figura 3: Relación entre el índice de anisidina (AV) y el mes de muestreo en los piensos en forma de gránulo sometidos a conservación en estufa (50°C). BHT 50: Pienso control más 50 mg de butilhidroxitolueno/kg de pienso; BHT 100: Pienso control más 100 mg de butilhidroxitolueno/kg de pienso; ETOX 50: Pienso control más 50 mg de etoxiquina/kg de pienso; ETOX 100: Pienso control más 100 mg de etoxiquina/kg de pienso.

GRÁNULO - AMBIENTE

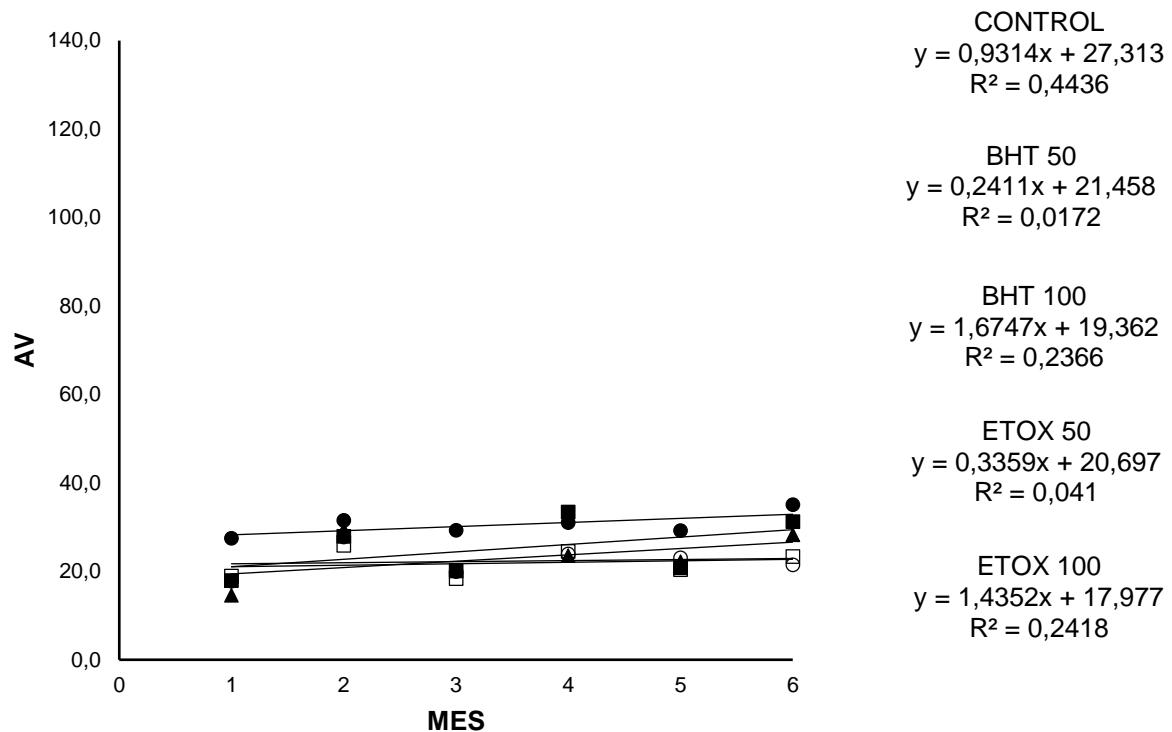


Figura 4: Relación entre el índice de anisidina (AV) y el mes de muestreo en los pienso en forma de gránulo sometidos a conservación a temperatura ambiente (< 25 °C). BHT 50: Pienso control más 50 mg de butilhidroxitolueno/kg de pienso; BHT 100: Pienso control más 100 mg de butilhidroxitolueno/kg de pienso; ETOX 50: Pienso control más 50 mg de etoxiquina/kg de pienso; ETOX 100: Pienso control más 100 mg de etoxiquina/kg de pienso.

MEZCLA - ESTUFA

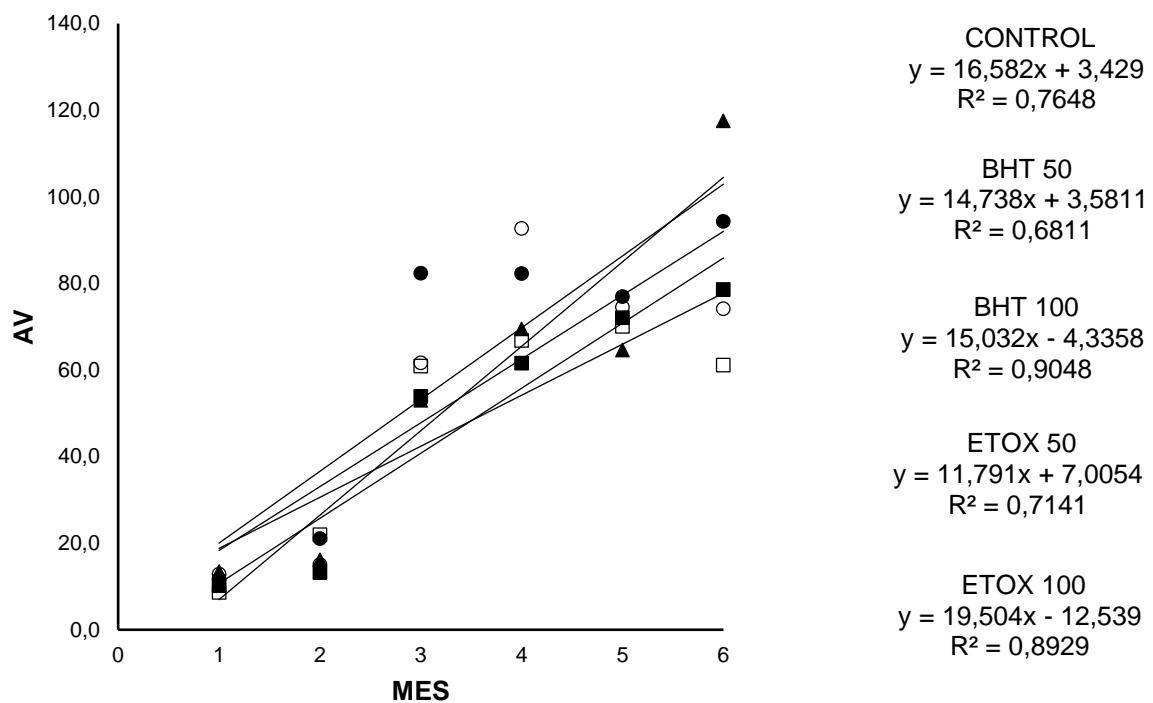


Figura 5: Relación entre el índice de anisidina (AV) y el mes de muestreo en los piensos en forma de mezcla sometidos a conservación en estufa (50°C). BHT 50: Pienso control más 50 mg de butilhidroxitolueno/kg de pienso; BHT 100: Pienso control más 100 mg de butilhidroxitolueno/kg de pienso; ETOX 50: Pienso control más 50 mg de etoxiquina/kg de pienso; ETOX 100: Pienso control más 100 mg de etoxiquina/kg de pienso.

MEZCLA - AMBIENTE

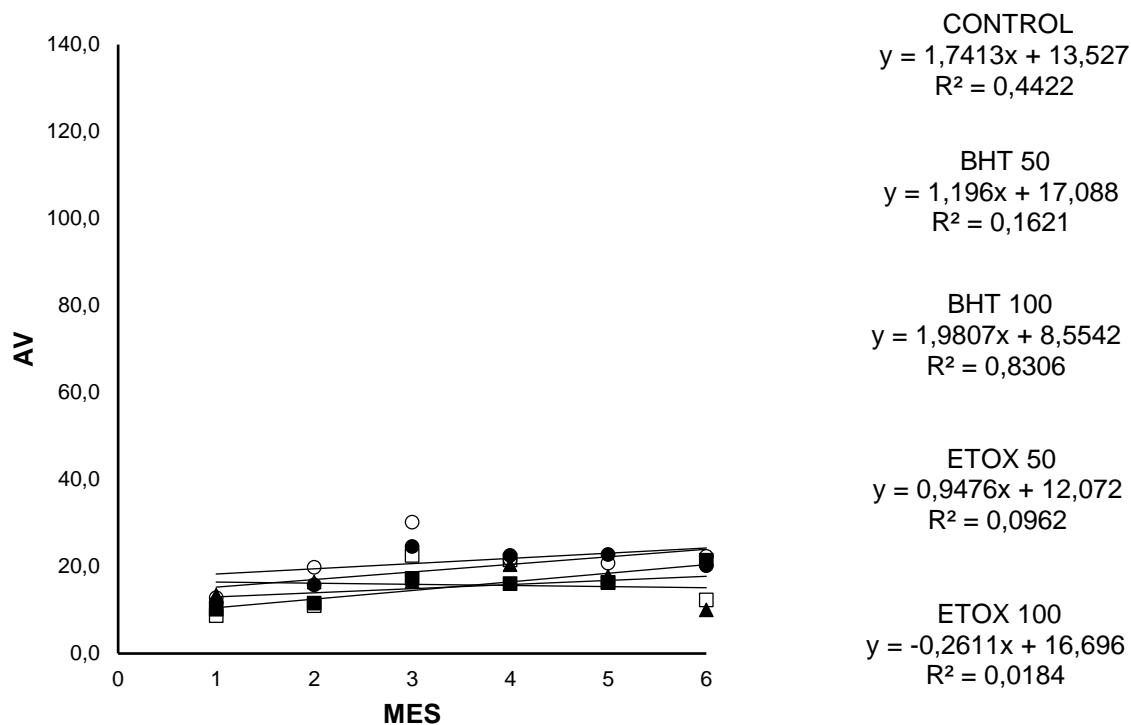


Figura 6: Relación entre el índice de anisidina (AV) y el mes de muestreo en los piensos en forma de mezcla sometidos a conservación en estufa (50°C). BHT 50: Pienso control más 50 mg de butilhidroxitolueno/kg de pienso; BHT 100: Pienso control más 100 mg de butilhidroxitolueno/kg de pienso; ETOX 50: Pienso control más 50 mg de etoxiquina/kg de pienso; ETOX 100: Pienso control más 100 mg de etoxiquina/kg de pienso.

CONCLUSIONES

A continuación, se procede a enumerar las conclusiones extraídas de los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Grado:

- Los piensos en presentación mezcla son más heterogéneos y por tanto su composición puede ofrecer mayor variabilidad a la hora de realizar raciones utilizándolos en caballos.
- La cantidad de nutrientes indicada en las etiquetas de los piensos comerciales suele estar ligeramente infravalorada en relación a la composición real de los piensos.
- La forma de presentación granulada predispone a la oxidación lipídica, en comparación con la presentación mezcla, debido al tratamiento térmico previo necesario para la formación del gránulo. Por lo que a la hora de exportar piensos a los países del Golfo Pérsico se recomienda la presentación mezcla.
- La oxidación lipídica aumenta a altas temperaturas y durante el paso del tiempo por lo que se recomienda que en caso de exportar los piensos al Golfo Pérsico, éstos se transporten y almacenen en lugares evitando temperaturas extremas, así como evitar largos períodos tiempo de almacenamiento con el fin de que la rancidez de los piensos sea la mínima posible.
- La etoxiquina tiene un efecto antioxidante mayor que el BHT en condiciones de altas temperaturas y en una forma de presentación de granulado, sin embargo no se ha demostrado tal efecto en piensos mezcla. Los antioxidantes añadidos a los piensos conservados a temperatura ambiente parecen no tener un efecto significativo sobre la peroxidación lipídica.

CONCLUSIONS

The following is a summary of the conclusions drawn from the results obtained in this Final Degree Project:

- Compound feeds in the form of meal are more heterogeneous than those in the pelleted form and hence their chemical composition could be more variable.
- The declared chemical composition of compound feeds gives nutrient concentrations below those found in the laboratory.
- Presentation as pellets seems to increase the susceptibility to lipid oxidation, maybe due to the pelleting process itself. For exportation to hot countries, where lipid oxidation is more likely, the presentation as meal seems preferable.
- Lipid oxidation increases at high temperatures and with preservation time.
Etoxiquin has higher antioxidant properties than BHT with pelleted compound feeds preserved at high temperatures, although this might not be true for compound feeds in the form of meal. Antioxidants added to compound feeds preserved at ambient temperature seem not to have a clear effect.

VALORACIÓN PERSONAL

Con la realización de este Trabajo de Fin de Grado, he visto cómo mis conocimientos relacionados con la carrera investigadora se han iniciado y que a nivel de futuro puede ser una salida profesional tan válida como cualquier otra. He tenido el placer de realizar la parte asociada al laboratorio en este Trabajo de Fin de Grado en el marco de la Beca de Colaboración lo que me ha permitido seguir este estudio desde principios de curso, incluso antes de conocer si realizaría el Trabajo sobre este tema. Este hecho, me ha permitido aumentar mis conocimientos en materia de Nutrición Animal en investigación pero, también conocer algunos detalles del mundo de la empresa relacionada con esta importante parte dentro de la Producción Animal.

He aprendido a buscar las diferentes referencias bibliográficas así como a poder valorar la información que en ellas aparece y poder seleccionarla. También, y en un aspecto más práctico, he visto que mi destreza en el laboratorio se ha ido desarrollando día a día, lo que sin duda puede ser importante en muchas de las salidas profesionales que ofrece la carrera veterinaria.

Más concretamente y centrándome en la temática de este Trabajo de Fin de Grado, he podido aprender cómo se trabaja en un laboratorio bromatológico, así como poder aprender a usar algunos de los instrumentos y aparatos que previamente a la realización del trabajo desconocía. He recordado también algunas nociones de estadística cuyo uso una vez aplicadas en la práctica te permite comprender que realmente es una herramienta útil en la vida diaria tanto en la carrera profesional investigadora como en otras muchas.

Otras herramientas que he conocido a lo largo de este Trabajo de Fin de Grado son los *softwares* informáticos como el Microsoft Excel 2015 o el PROC MIXED, SAS. En el caso del Microsoft Excel 2015 es un programa informático que ya conocía previamente pero que apenas sabía utilizar y mucho menos aplicado a estadística real. El PROC MIXED, SAS es un programa informático que desconocía antes de utilizarlo para llevar a cabo la parte estadística del trabajo, y que pese a su complejidad, tiene una gran utilidad en el mundo de las ciencias agrarias.

Además de los conocimientos puramente académicos adquiridos a lo largo de la realización del trabajo, quiero señalar el buen trato recibido y el ambiente de trabajo dentro del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] INRA. (1990) *L'alimentation des chevaux*. París: INRA.
- [2] Torre, C. (2008) *Inclusión de aceites en dietas de caballos de alto rendimiento deportivo*. Disponible en: <<https://harasambato.wordpress.com/2008/03/24/el-aceite-en-la-dieta-del-caballo/>> [Consulta: 11 de junio de 2017]
- [3] Valenzuela, A. y Nieto, S. (1996). Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y aceites*, 47, 186-196.
- [4] Casanova, C. (2015). *Selección de moléculas que inhiben la peroxidación lipídica mediante Topología molecular*. Tesis. Valencia: Universidad Cardenal Herrera –CEU. Disponible en: <http://dspace.ceu.es/bitstream/10637/7306/1/Selecci%C3%B3n%20de%20mol%C3%A9culas%20que%20inhiben%20la%20peroxidaci%C3%B3n%20lip%C3%A9tica%20mediante%20Topolog%C3%ADa%20Molecular_Tesis_Carlos%20Casanova%20Sorn%C3%AD.pdf> [Consulta: 22 de abril de 2017]
- [5] Frankel, E. (2010). “Oxidación lipídica y evaluación de antioxidantes” en *Antioxidantes naturales. Aspectos saludables, toxicológicos y aplicaciones industriales*, Eds. D. Franco Ruiz y A. Moure Varela. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia. p. 64-65.
- [6] Rojano, B.A. (1997). *Oxidación de lípidos y antioxidantes*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: <<http://www.bdigital.unal.edu.co/8413/>> [Consulta: 20 de abril de 2017]
- [7] Shurson, G.C., Kerr, B.J. y Hanson, A.R. (2015). Evaluating the quality of feed fats and oils and their effects on pig growth performance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6, 10. Disponible en: <<https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-015-0005-4>> [Consulta: 17 de abril de 2017]
- [8] Carné, S., Zaragoza, A. y Mascarell, J. (2013). “Función de los antioxidantes en el pienso y efectos en la calidad de la carne”. *Selecciones Avícolas*, 657, 27-30. Disponible en: <<http://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2013/9/027-030-Alimentacion-Funcion-antioxidantes-Carne-Zaragoza-Mascarell-SA201309.pdf>> [Consulta: 20 de abril de 2017]
- [9] Halliwell, B. y Gutteridge, J.M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*, 246, 501-514.

- [10] Becker, E.M., Nissen L.R. y Skibsted, L.H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219, 561-571.
- [11] Chaudière, J. y Ferrari-Illion, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 949-962.
- [12] Ndhala, R.A., Moyo, M. y Van Staden, J. (2010). Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules? *Molecules*, 15, 6905-6930.
- [13] Unión Europea. REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2017/962 DE LA COMISIÓN de 7 de junio de 2017 por el que se suspende la autorización de la etoxiquina como aditivo en piensos para todas las especies y categorías animales. *DOUE*, 8 de junio de 2017.
- [14] Lopez Ortega, A.A. (1996). Modificación de la LDL humana por el ion cúprico. Efecto de algunos antioxidantes. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, año 2, 1, 5-24.
- [15] Blaszczyk, A., Augustyniak, A. y Skolinowski, J. (2013). "Ethoxyquin: An Antioxidant Used in Animal Feed" en *International Journal of Food Science*. Disponible en: <<https://www.hindawi.com/journals/ijfs/2013/585931/>> [Consulta: 10 de junio de 2017]
- [16] Tres Oliver, A. (2009). *Incorporación de aceites poliinsaturados, α-tocoferol y minerales en pienso: efectos sobre la composición y oxidación lipídica de plasma, hígado y carne de conejo*. Tesis. Barcelona: Universitat de Barcelona. Disponible en: <<http://deposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42506?mode=full>> [Consulta: 3 de junio de 2017]
- [17] Andreo, A. I., Garro, O.A., Judis, M.A. (2001). Influencia del tiempo de calentamiento y de envasado sobre la oxidación de lípidos en emulsiones cárnicas durante el almacenamiento. Presidencia Roque Saénz Peña: Universidad Nacional del Nordeste. Disponible en: <<http://www.revistacyt.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2001/8-Exactas/E-020.pdf>> [Consulta: 10 de junio de 2017]
- [18] Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed.* Gaithersburg, MD: AOAC.
- [19] ANKOM Technology Method (2005). *Determinación rápida de Aceite/ Grasa utilizando Extracción con solvente a Alta Temperatura.*

- [20] Mertens DR (2002). Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of the Official Association of Chemists International* 85, 1217–1240.
- [21] Robertson JB, Van Soest PJ (1981). The detergent system of analysis. In *The Analysis of Dietary Fibre in Food*, p. 123–158 [WPT James and O Theander, editors]. New York: Marcel Dekker.
- [22] Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 8, 911-917. Disponible en: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/o59-099>> [Consulta: 8 de junio de 2017]
- [23] ISO (2007). *Animal and vegetable fats and oils- Determination of peroxide value- Iodometric (visual) endpoint determination*. ISO 3960:2007. Ginebra: ISO.
- [24] Ethiopian Standards Agency. (2012). *Animal and vegetable fats and oils-Determination of anisidina value*. ES ISO 6885:2012. Addis Abeba: ESA. Disponible en: <<https://archive.org/stream/et.iso.6885.2012#page/n3/mode/2up>> [Consulta: 7 de junio de 2017]
- [25] Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- [26] Rial, E., Méndez, J., Larraga, L. (1993). “Nuevas tecnologías en fabricación de piensos: doble granulación, expander y adición de líquidos” en *IX Curso de Especialización de FEDNA*. Barcelona: FEDNA.
- [27] Shahidi, F. (2005). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Sixth Edition*. Nueva Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Disponible en: <<http://elib.peaceland.edu.ng:8383/greenstone3/sites/localsite/collect/peacelan/index/assoc/HASH62cb.dir/doc.pdf>> [Consulta: 12 de junio de 2017]