



**Instituto de Ganadería de Montaña**

**EFFECTO DEL ÁCIDO CARNÓSIDO AÑADIDO A LA  
DIETA DE CORDEROS SOBRE EL BIENESTAR  
ANIMAL Y LA CALIDAD DE LA CARNE.**

**Effect of carnosic acid included in the diet of lambs on  
animal welfare and meat quality.**

**Lara Morán Lobato**

**León, 2013**

La autora de esta tesis doctoral ha disfrutado de una ayuda del programa JAE-PREDOC (Junta para la Ampliación de Estudios Predoctorales) concedida por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Fondo Social Europeo).

Los trabajos que componen esta memoria han sido financiados por los siguientes proyectos: AGL902010-19094 del Plan Nacional, proyecto de la Junta de Castilla y León CSI185B11-2, Proyecto Intramural Especial (PIE) Ref. 201240E105 del CSIC y por el proyecto de Grupos de Excelencia de la Junta de Castilla y León (GR158).

**Memoria presentada para optar al grado de Doctora  
Internacional por la Licenciada en Biología**

**Lara Morán Lobato  
León, 2013**

**Mediante el sistema de “compendio de publicaciones” de acuerdo con el Real Decreto 99/2011, y de las normas para su aplicación aprobadas por Universidad de León (BOCyL de 11 de Octubre de 2012)**

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer el apoyo académico y personal que me ha brindado mi co-directora de tesis Sonia Andrés Llorente, gracias por tirar de mí siempre hacia adelante, y al resto de mi grupo de investigación, Francisco Javier Giráldez, Raúl Bodas (sin ti el SAS y yo no habiéramos acabado bien) y Nuria Prieto, gracias a todos por apoyarme permitiéndome pensar por mí misma.

*“Mientras los hombres sean libres para preguntar lo que deben,  
para decir lo que piensan, para pensar lo que quieran,  
la libertad nunca se perderá y la ciencia nunca retrocederá”*

*Robert Oppenheimer*

El mayor de mis agradecimientos a mi familia porque sin ellos ni siquiera sería licenciada, en especial a mi madre, gracias mamá, por tu apoyo, por tu dedicación, por estar siempre ahí y aguantarme como soy; a mi padre que me ayudó a desarrollar mi pensamiento crítico, y a mi hermana pequeña, Yolanda, la estudiosa de la familia, que llegará lejos en la vida. No me olvido de mis abuelos, que me han querido como mis propios padres, y de mi tía Mar, a la que quiero como una hermana, ni de la nueva “peque”, Andrea, que siempre sabe sacarme una sonrisa.

A mi pareja, el otro pilar de mi vida. Gracias, Pedro, por estar ahí siempre, por apoyarme y soportarme en los momentos malos, por ser mi confidente, y mi mejor amigo, por hacerme reír, por ayudarme en esos fines de semana interminables de experimento y, sobre todo, por quererme tal y como soy, a pesar de mis locuras y por ser partícipe de ellas.

Me gustaría agradecerle a mis amigos y amigas los momentos de diversión ya que como dijo Alexander Fleming: *Un buen trago de whisky al acostarse, no es muy científico, pero ayuda.* Muchas gracias, Ana, eres la persona más buena que he encontrado en mi

vida, ánimo amiga. A ti, Olaya, por ser mi amiga desde siempre. Gracias Ana, Yago, Fer y Rosa por las tardes de pesca, manualidades y paseos perrunos.

A mis compañeros becarios/as por comprenderme, por echarme una mano cuando la he necesitado, ha sido genial contar con vosotros. Elena, que decir de ti que eres un sol y que te lo mereces todo; Carolina, gracias por compartir los momentos de estrés conmigo, y convertirlos en divertidos; Ana María ¡ánimo! que ya estamos ahí, Edgar, gracias por las risas, Tamara, David... todos sabéis que tenéis una amiga.

A su vez agradecerle a todo el personal del Instituto de Ganadería de Montaña su ayuda. Especialmente al personal de finca que han convertido la parte "más dura", en la más divertida. A Guillermo, Iván, Mario y David por estar siempre dispuestos a ayudarme y siempre con una sonrisa, a Lucio y Melchor por hacérmelo pasar tan bien los días de sacrificio. Y a Miguel del que tantas anécdotas hemos oído. Me gustaría también agradecerle a Mariví que todas las tardes traiga un momentito de alegría a nuestra becaría, eres un sol.

Agradecer al departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León toda la atención y asesoramiento prestado especialmente a Chema y a Javier Mateo. Así como al departamento de Sanidad del IGM, de gran ayuda en mi aventura por el bienestar animal, gracias María y Julio.

También me gustaría agradecer el trato recibido a lo largo de mis estancias en el extranjero, especialmente a Spiridoula Athanasidou, Pier Antonio Biondi y Sara Panseri, que tan bien me trataron. Y por su puesto a las personas y amigos que conocí en cada lugar, sobre todo a Conchita y a Charline.

Por último, aunque digan que estoy loca, también tengo que agradecer al peludo que comparte su vida conmigo, a Hobbit, y a aquellos a los que he ayudado y me han ayudado, Lupín, África, Pintina... La vida es mucho más divertida cuando te reciben con un lametazo.

Parece mentira pero esto se acaba. Espero no olvidarme de nadie y que nadie se olvide del tiempo que hemos pasado junto. Gracias...

*“La luna camina lentamente, pero atraviesa el mundo”*

*Proverbio Africano.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE .....	i
SUMMARY .....	1
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	14
<b>1. Consideraciones generales.....</b>	<b>14</b>
1.1 Situación actual del ovino en España .....	14
1.2 El consumo de carne de ovino en España.....	15
<b>2. Los procesos de oxidación.....</b>	<b>16</b>
2.1 Especies Reactivas del Oxígeno (ROS).....	16
2.2 La oxidación .....	18
2.2.1 Moléculas biológicas diana de las reacciones de oxidación.....	19
a) <i>Lípidos</i> .....	19
b) <i>Proteínas</i> .....	22
c) <i>Ácidos nucleicos</i> .....	23
2.2.2 Sistemas de defensa biológicos frente a la oxidación.....	23
a) <i>Antioxidantes enzimáticos</i> .....	23
b) <i>Antioxidantes no enzimáticos</i> .....	24

<b>3. Antioxidantes en producción animal.....</b>	<b>25</b>
3.1 Antioxidantes sintéticos .....	25
<i>a) Butilato hidroxianisol (BHA) .....</i>	<i>26</i>
<i>b) Butilhidroxitolueno (BHT).....</i>	<i>26</i>
<i>c) Tertbutilhidroxiquinona (TBHQ).....</i>	<i>26</i>
<i>d) Ésteres del ácido gálico .....</i>	<i>26</i>
3.2 Antioxidantes naturales .....	27
<i>a) Vitamina C.....</i>	<i>27</i>
<i>b) Carotenoides .....</i>	<i>27</i>
<i>c) Vitamina E.....</i>	<i>28</i>
<i>d) Compuestos fenólicos.....</i>	<i>30</i>
<u><i>Compuestos fenólicos del romero .....</i></u>	<u><i>32</i></u>
<b>4. Estrés oxidativo y bienestar animal .....</b>	<b>34</b>
4.1 La respuesta inmune.....	34
<i>a) Respuesta inmunitaria innata .....</i>	<i>35</i>
<i>b) Respuesta inmunitaria adquirida .....</i>	<i>36</i>
4.2 Patologías relacionadas con el estrés oxidativo .....	39
<i>a) Inmunodepresión por estrés.....</i>	<i>39</i>



<i>b) Mastitis</i> .....	40
<i>c) Problemas reproductivos y de gestación</i> .....	42
<i>d) Urolitiasis</i> .....	42
<i>e) Infecciones parasitarias</i> .....	42
<i>f) Acidosis ruminal y metabólica</i> .....	43
<b>5. Calidad de carne</b> .....	<b>45</b>
5.1 Concepto y composición de la carne .....	45
5.2 La calidad de la carne y el efecto de la oxidación.....	49
<i>a) Características nutricionales</i> .....	50
<i>b) Características tecnológicas</i> .....	51
<p><u>pH</u>.....</p>	51
<p><u>Capacidad de retención de agua (CRA)</u>.....</p>	52
<i>c) Características sensoriales u organolépticas</i> .....	53
<p><u>Color</u>.....</p>	53
<p><u>Textura</u>.....</p>	55
<p><u>Flavor</u> .....</p>	55
<i>d) Calidad higiénico-sanitaria</i> .....	56
5.3 Factores que afectan a la oxidación .....	58

5.3.1 Factores ante-mortem y perimortem.....	59
a) <i>Genética</i> .....	59
b) <i>Sexo</i> .....	60
c) <i>Edad y peso al sacrificio</i> .....	60
d) <i>Tipo de músculo</i> .....	61
e) <i>Alimentación</i> .....	62
f) <i>Bienestar animal: estrés y manipulación pre-sacrificio</i> .....	65
<b>5.3.2 Factores post-mortem</b> .....	<b>66</b>
a) <i>Procesado de la carne</i> .....	67
b) <i>Exposición a la luz</i> .....	67
c) <i>Envasado</i> .....	67
d) <i>Temperatura de almacenado</i> .....	68
e) <i>Cocinado</i> .....	69
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>71</b>
<b>CAPÍTULO 1:</b> <i>Antioxidants included in the diet of fattening lambs: effects on immune response, stress, welfare and distal gut microbiota</i> .....	<b>72</b>
<b>CAPÍTULO 2:</b> <i>Metabolic acidosis corrected by including antioxidants in diets of fattening lambs</i> .....	<b>81</b>

<b>CAPÍTULO 3:</b> <i>Carnosic acid dietary supplementation at 0.12% rates slows down meat discoloration in gluteus medius of fattening lambs</i> .....	84
<b>CAPÍTULO 4:</b> <i>Meat texture and antioxidant status are improved when carnosic acid is included in the diet of fattening lambs</i> .....	91
<b>CAPÍTULO 5:</b> <i>Effect of dietary carnosic acid on the fatty acid profile and flavour stability of meat from fattening lambs</i> .....	96
<b>CAPÍTULO 6:</b> <i>Effect of carnosic acid dietary supplementation on meat quality from suckling lambs</i> .....	104
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	128
<b>CONCLUSIONS</b> .....	136
<b>CONCLUSIONES</b> .....	137
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	138



---

## SUMMARY

Management or environmental conditions of the current intensive animal production systems may induce acceleration of heart rate, blood flow and a set of metabolic adjustments which, at the end, may promote an imbalance between the production of reactive oxygen species and the animal's antioxidant defense mechanisms, resulting in oxidative stress. The oxidative stress in the living animal also is promoted by a high intake of polyunsaturated fatty acids, or by a deficiency of nutrients involved in the antioxidant defense system. In any case, high levels of oxidative stress might influence negatively the animal welfare, and hence the animal performance in intensive production systems.

Moreover, the meat quality may also be affected by oxidative stress. Thus, oxidation of lipids is a major cause of deterioration in the meat from fattening and suckling lambs affecting directly meat characteristics such as flavor, color, texture, nutritive value and safety of the product. Lipid oxidation in muscle food is initiated in the living animal, as explained before, but damage to lipids is accentuated, in particular, during handling, processing and storage, thus promoting the reduction of shelf life of meat.

Dietary factors such as vitamin E contribute to the antioxidant defence system of the animal and protect biological membranes of the cells against lipid oxidation, also preserving the welfare and food quality. There are many other natural compounds (plant origin) with antioxidant properties which also might be included in animal feedstuff to improve the resistance of animals against oxidative stress. In this context it has been suggested that supplementation with phenolic compounds may have beneficial effects on certain inflammatory and immune parameters, particularly under oxidative stress conditions. Additionally, some plants with high content in phenolic compounds have demonstrated antimicrobial activity and delayed lipid oxidation of meat when they are included in the diet of the animal. With this regard, especial attention has been paid to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), an herb commonly used as a flavouring agent. The bioactive properties of this plant have

been attributed to the high quantity of phenolic compounds, and chiefly to the diterpenic phenolic compound carnosic acid. However, the concentration of phenolic compounds in the plants varies depending on the maturity stage or climatic conditions, so feeding rosemary extracts with a known richness of carnosic acid instead of intact plants will allow recommendations to be established about the amount of rosemary which should be fed to the animals according to its levels of carnosic acid.

In order to determinate the effect of different doses of carnosic acid included in the diet of fattening lambs on some parameters related to welfare and meat quality, 32 male Merino lambs were used. After stratification on the basis of body weight (average BW =  $15.2 \pm 0.749$  kg), lambs were penned individually and allocated randomly to one of four different groups (eight lambs per treatment): a control group was fed barley straw (BS) and concentrate alone (CONTROL); a second group was fed BS and concentrate with a single dose of carnosic acid (CARN006: 0.6 g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  concentrate); a third group was fed BS and concentrate with a double dose of carnosic acid (CARN012: 1.2 g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  concentrate); and a fourth group was fed BS and concentrate with vitamin E (50%  $\alpha$ -tocopheryl acetate) at a rate of 0.6 g  $\text{kg}^{-1}$  concentrate (VITE006, equivalent to 900 IU vitamin E  $\text{kg}^{-1}$  concentrate). Concentrate (35 g  $\text{kg}^{-1}$  BW per day) and forage (200 g barley straw  $\text{day}^{-1}$ ) were weighed and supplied in separate feeding troughs at 9:00 a.m. each day. Fresh drinking water was always available. The orts were also weighed daily, and feed samples were collected for chemical and fatty acids (FAs) composition analysis.

The article entitled "*Antioxidants included in the diet of fattening lambs: Effects on immune response, stress, welfare and distal gut microbiota*" describes the effects of different doses of carnosic acid on all these parameters and compares them with the most frequently used antioxidant in animal nutrition, vitamin E. Thus, after 7 weeks of being fed the experimental diets, blood samples were taken to measure blood lymphocyte subpopulations by flow cytometry and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )

production; then, all lambs were subjected to a 4-h transportation stress period to study the evolution of haematological and biological parameters during road transport. Finally, rumen fluid and faeces samples were collected to study microbial diversity. With regards to the results obtained, vitamin E supplemented to fattening lambs enhanced IFN- $\gamma$  production, although the biological significance of these effects remains to be determined. Additionally, vitamin E supplementation tended to reduce the increments of blood tissue damage indicators (creatine phosphokinase) during road transport, thus preserving the health of the animal under stress conditions. Finally, carnosic acid only promoted changes in the faecal bacterial community that might be related to differences in feed digestion in the large intestines.

The article entitled: "*Metabolic acidosis corrected by including antioxidants in diets of fattening lambs*" describes the effects of the antioxidants (different doses of carnosic acid and vitamin E) included in the diet of animals on the ruminal and metabolic acidosis promoted by acidogenic diets. Thus, after 7 week of being fed the experimental diets blood samples were collected to measure pH, bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ),  $\text{CO}_2$  pressure ( $\text{pCO}_2$ ), anion gap, total  $\text{CO}_2$  ( $\text{tCO}_2$ ), and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  concentrations. After slaughter (25 kg of intended body weight) rumen fluid was also obtained and ruminal pH determined immediately. Two pieces of the rumen wall were conserved for further anatomical study. Regarding the results, the pH of blood samples was lower for the CONTROL lambs when compared to the groups fed antioxidants, being also the rest of blood parameters indicative of metabolic acidosis. On the contrary, no differences between groups were detected at the ruminal level. Therefore, metabolic acidosis in fattening lambs was corrected by both antioxidants (carnosic acid and vitamin E), but no detectable effects were observed on ruminal acidosis.

The final part of this study was designed to determine the influence of the dietary inclusion of carnosic acid on meat quality parameters. Accordingly, the animals were

slaughtered at 25 kg of intended body weight and the pH of the meat was measured after 0, 45 min and 24 h post-mortem in *longissimus thoracis* muscle. Then, the experimental muscles were removed from the cold carcass, *longissimus thoracis* being used to determine chemical composition and fatty acids profile, whereas the other quality parameters were analyzed on sliced stored (4°C with 12 h of daily illumination) muscles [*longissimus lumborum* (LL) and *gluteus medius* (GM)] packaged in modified atmosphere (MAP) (35% CO<sub>2</sub>, 35% O<sub>2</sub> and 30% N<sub>2</sub>). Finally the left hind leg was removed and stored at -30 °C until sensory evaluation.

On the article entitled "*Carnosic acid dietary supplementation at 0.12% rates slows down meat discoloration in gluteus medius of fattening lambs*" the effect of carnosic acid supplementation on the color, water holding capacity, microbial spoilage, and sensorial characteristics of the meat is described. No statistical differences were found on water holding capacity, sensorial characteristics or microbial spoilage of meat. Nevertheless dietary carnosic acid seemed to be useful to protect meat from discoloration after a long period of time under MAP at refrigerated storage, particularly in medium stable muscles such as *gluteus medius*. However, its effectiveness was lower than that observed for vitamin E.

On the article entitled "*Meat texture and antioxidant status are improved when carnosic acid is included in the diet of fattening lambs*" the effect of carnosic acid supplementation on oxidative stability of lipids (lipid peroxidation and cholesterol oxidation products) and proteins and the related quality parameter -texture- is described. The results show that carnosic acid dietary supplementation reduces lipid peroxidation in meat samples after a long period of time under MAP at refrigerated storage, particularly in medium stable muscles such as *gluteus medius*. Texture and protection against cholesterol oxidation were also improved either by carnosic acid or vitamin E, being the effectiveness of the last one better once again.



The article entitled: “*Effect of dietary carnosic acid on the fatty acid profile and flavour stability of meat from fattening lambs*” reveals that dietary supplementation of carnosic acid or vitamin E did not modify the fatty acid profile, but the volatile compounds production was clearly affected by the addition of carnosic acid to the diet of fattening lambs in a dose dependent manner.

A second experiment was carried out to elucidate the effects of dietary carnosic acid on the welfare and meat quality attributes of artificially fed suckling lambs. Thus, 24 suckling lambs were stratified on the basis of body weight (average BW,  $5.95 \pm 0.766$  kg), and allocated randomly to one of three different groups (n=8 per treatment); a control group (CTRL), a second group fed a dose (0.096 g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  of LW; CARN) of carnosic acid, and a third group fed a dose of vitamin E ( $\alpha$ -tocopheryl acetate 50%) at a rate of 0.024 g  $\text{kg}^{-1}$  LW (VITE).

The manuscript entitled: “*Effect of carnosic acid dietary supplementation on meat quality from suckling lambs*”, describes the influence of dietary carnosic acid on the meat quality of artificially fed suckling-lambs. Animals were slaughtered at the intended body weight (11-12 kg LW). *Longissimus thoracis* muscles were used to determine the proximate composition of meat, whereas different muscles (*longissimus lumborum* and *gluteus medius*) were sliced and kept under refrigerated during 0, 7, and 14 days to determine water holding capacity, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and cholesterol oxidation products (COPs) in cooked meat samples. *Biceps femoris* muscles were used for the analysis of volatile compounds on precooked meat after 1 and 7 days of storage. The results indicate that carnosic acid dietary supplementation in artificially fed suckling lambs might reduce the levels of lipid peroxidation and COPs in meat whilst volatile compounds levels would not be affected. However, the results are not conclusive at the dose of carnosic acid used in the present study.

To sum up, metabolic acidosis was corrected by the inclusion of carnosic acid in the diet of fattening lambs. This compound also promoted changes in the faecal bacterial community that might be related to differences in feed digestion in the large intestine. Regarding meat attributes, carnosic acid added on the diet of fattening lambs improved some important quality parameters such as color or texture and seemed to delay lipid peroxidation. However, the effect of carnosic acid was not conclusive when included in the diet of artificially fed suckling lambs at the rate of 0.096 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of LW.



---

## RESUMEN

En los sistemas de producción animal intensivos actuales, el manejo y otras condiciones del ambiente, pueden inducir el incremento de la frecuencia cardíaca, presión sanguínea u otro conjunto de ajustes, que finalmente, promueven la ruptura del equilibrio existente entre la producción de especies reactivas del oxígeno y los mecanismos antioxidantes del propio animal, dando lugar a estrés oxidativo. El estrés oxidativo en el animal también puede ser promovido por el consumo de altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, o debido a una deficiencia de los nutrientes implicados en el sistema de defensa antioxidante. De cualquier manera, el estrés oxidativo en altos niveles influencia negativamente parámetros relacionados con el bienestar animal y el rendimiento productivo de los animales en los sistemas de producción intensivos.

Por otro lado, la calidad de la carne también puede verse afectada por el estrés oxidativo. La oxidación lipídica es la principal causante del deterioro de la carne tanto de corderos de cebo como lechales, afectando directamente sobre características del producto como: el flavor, el color, la textura, el valor nutritivo y la seguridad alimentaria. La oxidación lipídica en el músculo se inicia en el animal vivo, tal y como ya hemos comentado anteriormente, pero la oxidación lipídica es particularmente acentuada por el manejo, el procesado y el almacenado, promoviendo por tanto la reducción de su vida útil.

Algunos compuestos procedentes de la dieta, como es el caso de la vitamina E, contribuyen a la defensa del sistema antioxidante del animal protegiendo las membranas celulares frente a la oxidación lipídica, y por tanto preservando el bienestar animal y la calidad del producto. Existen muchos otros compuestos naturales (proceden de plantas) con propiedades antioxidantes que podrían utilizarse incluidos en el propio alimento de los animales para mejorar la resistencia de los animales al estrés oxidativo. En este contexto, se ha sugerido que la suplementación de compuestos fenólicos en la alimentación, podría mostrar efectos

beneficiosos sobre algunos parámetros relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria, especialmente bajo condiciones de estrés oxidativo. Además, algunas plantas con altos contenidos en compuestos fenólicos incluidas en la dieta de los animales han mostrado actividad antimicrobiana y la capacidad de retrasar la oxidación lipídica de la carne. Con este objetivo se ha puesto especial atención en el Romero (*Rosmarinus officinalis* L.), una planta comúnmente utilizada como especia. Las propiedades bioactivas de dicha planta son atribuidas principalmente a su alta concentración en compuestos fenólicos y en especial al diterpeno fenólico denominado ácido carnósico. No obstante, la concentración de compuestos fenólicos en las plantas varía, dependiendo del estado de madurez o de las condiciones climatológicas, por lo tanto sería aconsejable la utilización de extractos de romero con cantidades conocidas de ácido carnósico, en lugar de la utilización de la planta completa para permitir establecer recomendaciones sobre las cantidades de romero que deben ser administradas a los animales en función de sus niveles de ácido carnósico.

Para la determinación del efecto producido por la inclusión de diferentes dosis de ácido carnósico en la dieta de corderos de cebo sobre parámetros relacionados con el bienestar y la calidad de carne, se utilizaron 32 corderos Merinos machos. Tras su estratificación en función del peso vivo (Promedio del peso vivo =  $15.2 \pm 0.749$  kg), los corderos fueron alojados al azar de manera individual y asignados a uno de los cuatro grupos experimentales existentes (ocho corderos por tratamiento): un grupo control alimentado con paja de cebada (BS) y concentrado únicamente (CONTROL); un segundo grupo alimentado con BS y concentrado suplementado con una dosis básica de ácido carnósico (CAR006: 0,6 g ácido carnósico  $\text{kg}^{-1}$  concentrado); el tercer grupo se alimentó con BS y concentrado suplementado con una dosis doble de ácido carnósico (1,2 g ácido carnósico  $\text{kg}^{-1}$  concentrado); y por último el cuarto grupo se alimentó con BS y concentrado suplementado con vitamina E (50%  $\alpha$ -tocoferol

acetato) a razón de 0,6 g kg<sup>-1</sup> concentrado (VITE006, equivale a 900 UI de vitamina E kg<sup>-1</sup> concentrado).

Diariamente el concentrado (35 g kg<sup>-1</sup> peso vivo al día) y el forraje (200 g paja de cebada day<sup>-1</sup>) se pesaban y administraban en comederos separados a las 9:00. El agua de bebida fresca estaba disponible en todo momento. Así mismo los restos se pesaron diariamente, y se recogía una muestra del alimento para la determinación de la composición química y del perfil de ácidos grasos (FAs).

El artículo titulado: "*Antioxidants included in the diet of fattening lambs: Effects on immune response, stress, welfare and distal gut microbiota*" describe el efecto de las diferentes dosis de ácido carnósico en todos los parámetros descritos y los compara con el antioxidante más frecuentemente utilizado en alimentación animal, la vitamina E. Tras 7 semanas con la dieta experimental se extrajeron muestras de sangre permitiendo la medida de las subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo, así como la producción de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ). Tras la toma de muestras de sangre los corderos fueron sometidos a estrés por transporte durante un periodo de 4 horas con intención de estudiar la evolución de los parámetros tanto hematológicos como biológicos durante el transporte. Finalmente, para realizar un estudio de la diversidad microbiana se recogieron muestras de líquido ruminal y heces.

Con respecto a los resultados obtenidos, la suplementación de corderos de cebo con vitamina E incrementa la producción de IFN- $\gamma$ , aunque el significado biológico de este efecto queda todavía por determinar. A su vez, la suplementación con vitamina E tiende a reducir el incremento producido durante el transporte en los indicadores de daño tisular en sangre (creatina fosfoquinasa), por tanto preserva la salud de los animales sometidos a condiciones de estrés. Finalmente, el ácido carnósico únicamente generó cambios a nivel de la comunidad bacteriana en heces,

pudiendo estar relacionado con diferencias en la digestión del alimento a nivel de intestino grueso.

El artículo titulado: “*Metabolic acidosis corrected by including antioxidants in diets of fattening lambs*” describe el efecto de los antioxidantes (diferentes dosis de ácido carnósico y vitamina E) incluidos en la dieta de los animales sobre la acidosis promovida por dietas acidogénicas a nivel ruminal y metabólico. Para ello, tras 7 semanas de alimentación con la dieta experimental se tomaron muestras de sangre para la medición de: pH, bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), presión de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ), anión gap,  $\text{CO}_2$  total ( $\text{tCO}_2$ ), así como las concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Tras el sacrificio (a los 25 kg de peso vivo) se tomó líquido ruminal para la determinación inmediata del pH. Así mismo se conservaron dos muestras de la pared ruminal para el posterior estudio anatómico. Los resultados mostraron que el pH sanguíneo era menor en los corderos CONTROL comparado con los grupos alimentados con antioxidantes, siendo también el resto de los parámetros sanguíneos indicativos de acidosis metabólicas. Por el contrario, no se encontraron diferencias entre los grupos a nivel ruminal. Por tanto, la acidosis metabólica en corderos de cebo se corrigió con ambos antioxidantes (ácido carnósico y vitamina E), pero no se observaron efectos sobre la acidosis ruminal.

La parte final de este estudio fue diseñada para conocer la influencia de la inclusión en la dieta de ácido carnósico sobre los parámetros de calidad de carne. Para ello, los animales se sacrificaron al llegar a los 25 kg de peso vivo y el pH de la carne se midió tras 0, 45 minutos y 24 horas *post-mortem* en el músculo *longissimus thoracis*. Posteriormente, se extrajeron de la canal fría los músculos experimentales; el *longissimus thoracis* se utilizó para la determinación de la composición química y del perfil de ácidos grasos. El resto de los parámetros de calidad de carne, se analizaron en músculos [*longissimus lumborum* (LL) and *gluteus medius* (GM)] previamente fileteados, empaquetados en atmósfera modificada (MAP) (35%  $\text{CO}_2$ , 35%  $\text{O}_2$  and

30% N<sub>2</sub>) y almacenados a 4°C con una iluminación diaria de 12 horas. Finalmente, la pierna izquierda se almacenó a -30°C hasta la evaluación sensorial.

En el artículo titulado "*Carnosic acid dietary supplementation at 0.12% rates slows down meat discoloration in gluteus medius of fattening lambs*" se describe efecto de la inclusión de ácido carnósico sobre el color, la capacidad de retención de agua, la contaminación microbiana y las características sensoriales de la carne. No se observaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de capacidad de retención de agua, características sensoriales y crecimiento microbiano. Sin embargo el ácido carnósico en la dieta parece ser útil protegiendo la carne de la decoloración almacenada en MAP durante largos periodos de tiempo, especialmente en músculos de estabilidad media como es el caso del *gluteus medius*. En todo caso, su efectividad fue menor que la observada en el caso de la vitamina E.

En el artículo titulado "*Meat texture and antioxidant status are improved when carnosic acid is included in the diet of fattening lambs*" se describe el efecto de la suplementación con ácido carnósico sobre la estabilidad oxidativa de lípidos (peroxidación lipídica y productos de oxidación del colesterol) y proteínas, así la textura como parámetro de calidad relacionado. Los resultados mostraron que la suplementación de la dieta con ácido carnósico permite reducir la peroxidación lipídica de muestras de carne almacenada durante un largo periodo de tiempo en MAP, especialmente en músculos de estabilidad media como el *gluteus medius*. La textura y la protección frente a la oxidación del colesterol también se mejora con ambos suplementos, ácido carnósico y vitamina E, siendo la efectividad de este último mayor una vez más.

El artículo titulado: "*Effect of dietary carnosic acid on the fatty acid profile and flavour stability of meat from fattening lambs*" revela que la inclusión de ácido carnósico y vitamina E no modifica el perfil de ácidos grasos, pero la producción de compuestos volátiles se ve claramente afectada por la adición de ácido carnósico en la dieta de los corderos de cebo de manera dosis dependiente.



Finalmente se llevó a cabo un segundo experimento para dilucidar el efecto que ejerce el ácido carnósico sobre el bienestar y los atributos de calidad de carne en corderos lechales amamantados artificialmente. Para ello se utilizaron 24 corderos lechales que se estratificaron en función de su peso vivo (promedio de peso vivo:  $5,95 \pm 0,766$  kg), y fueron asignados al azar a uno de los tres grupos existentes (n=8 por tratamiento): un grupo control (CTRL), un segundo grupo alimentado con una dosis de ácido carnósico ( $0,096$  g ácido carnósico  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo; CARN), y un tercer grupo suplementado con una dosis de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol acetato 50%) a razón de  $0,024$  g  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo (VITE).

El manuscrito titulado: "Effect of carnosic acid dietary supplementation on meat quality from suckling lambs", describe la influencia del ácido carnósico incluido en la dieta sobre la calidad de la carne de corderos lechales alimentados artificialmente. Los animales fueron sacrificados al alcanzar el peso corporal previsto (11-12 kg peso vivo). El músculo *longissimus thoracis* fue utilizado para determinar la composición química de la carne, por otro lado diferentes músculos (*longissimus lumborum* and *gluteus medius*) fueron fileteados y se mantuvieron en refrigeración durante 0, 7 y 14 días para determinar capacidad de retención de agua, sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs) y productos de oxidación del colesterol (COPs) en muestras de carne cocinada. El músculo *biceps femoris* se utilizó en el análisis de los compuestos volátiles en carne precocinada tras 1 y 7 días de almacenamiento. Los resultados indican que la suplementación de la alimentación de los corderos lechales amamantados artificialmente puede reducir los niveles de peroxidación lipídica y COPs presentes en la carne, mientras que los niveles de compuestos volátiles no se ven afectados. Por tanto, los resultados no son concluyentes a la dosis de ácido carnósico utilizada en el presente estudio.

En definitiva, podemos decir que la acidosis metabólica puede ser corregida por la inclusión de ácido carnósico en la dieta de los corderos de cebo. Este compuesto así mismo, promueve cambios en la comunidad bacteriana fecal que puede relacionarse

con cambios en la digestión en el intestino grueso. Con respecto a los atributos de la carne, el ácido carnósico añadido en la dieta de los corderos de cebo mejora parámetros de calidad de carne importantes como el color y la textura y parece retrasar la oxidación lipídica. No obstante el efecto del ácido carnósico no fue concluyente cuando se incluyó en la dieta, a razón 0,096 g de ácido carnósico kg<sup>-1</sup> de peso vivo, en corderos lechales amamantados artificialmente



## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

---

## **1. Consideraciones generales**

### **1.1 Situación actual del ovino en España**

La cabaña ovina española cuenta con aproximadamente 17 002 721 cabezas de ganado representando las cabañas de Castilla y León, Castilla la Mancha y Aragón, junto con Extremadura y Andalucía, más del 80% del censo de la cabaña ovina nacional (MAGRAMA, 2011b; MAGRAMA, 2011c).

España se encuentra situada en la décima posición en el ranking mundial en producción de carne ovina (FAO, 2010). De hecho, la encuesta de sacrificio de ganado, realizada por el MAGRAMA (2011b), establece que en 2011 se sacrificaron en España 10 590 376 corderos. En general, la producción española se basa sobre todo en canales ligeras (máx. 13 kg) distribuyéndose a nivel estatal en un 15,2% de menos de 7 kg (cordero lechal), un 52% de entre 7 y 13 kg (ternasco, pascual o recental) y un 32,7% de peso más elevado (ternasco, cordero de cebo precoz y cordero mayor) (Ciria, Asenjo, Romera y Calvo, 2009). El caso de Castilla y León es un tanto diferente puesto que produce el 79% de los corderos lechales sacrificados en España. Esta circunstancia se debe a la existencia de la IGP (Indicación Geográfica Protegida) “Lechazo de Castilla y León” que ampara a los corderos nacidos en las comarcas cerealistas de la comunidad autónoma, correspondientes a las razas Ojalada, Castellana y Churra, alimentados a base de leche materna y con un peso de canal de entre 4,5 y 7 kg. No obstante en la actualidad, son cada vez más los corderos lechales provenientes de ganaderías de basadas en razas de alta producción (Assaf, Awassi y en menor medida Lacaune), cuya leche es destinada a producción quesera, este tipo de corderos llevan un manejo especial puesto que suelen separarse de sus madres postparto para ser amamantados mediante la utilización de lactorreemplazantes.

En el caso del ovino carne, la producción en régimen extensivo es cada vez menor, ya que se ha incrementado la producción de cordero de cebo en sistemas intensivos

que compiten en mejores condiciones con la carne procedente de otras regiones de la UE (Rumanía, Bulgaria...) y de Nueva Zelanda. En este tipo de sistemas, los corderos se destetan cuando tienen 14-16 kg de peso vivo para cebarlos con paja de cereal y piensos compuestos *ad libitum* (Ciria et al., 2009). Normalmente, en la alimentación de corderos de cebo se utilizan piensos compuestos muy energéticos, con un porcentaje elevado de grano de cereal, y niveles de proteína entre el 15% y el 20%. Además, se incluyen correctores vitamínico-minerales a niveles de aproximadamente el 3% (Ciria et al., 2009).

## **1.2 El consumo de carne de ovino en España**

La carne es un alimento muy nutritivo. De hecho, tan solo 28 g de carne pueden proporcionar a un adulto el 10% de sus requerimientos diarios de energía y una gran cantidad de nutrientes, como por ejemplo aminoácidos esenciales, ácidos grasos, vitaminas y minerales, todos ellos con gran biodisponibilidad (Diaz, Sanchez, Martinez, Vieira y Garcia, 2005). Con respecto al consumo de este alimento, la carne y los productos cárnicos son componentes cada vez más importantes en la dieta de los países desarrollados. El consumo de carne en España es de 52,65 kg por habitante y año, valor medio del que tan solo 2,08 kg al año corresponderían a carne de ovino (MAGRAMA, 2011a).

El consumo de ovino se ha reducido en España durante el año 2011 en un 6,5%. Las razones de este descenso son variadas y pueden encontrarse, por una parte, en el precio de este producto, que suele ser más caro que otras carnes. Por otro lado los consumidores consideran que esta carne tiene un sabor “fuerte” (Buxadé, 2009), por lo que habitualmente no la incluyen en la cesta de la compra, y su consumo está ligado especialmente a fiestas y celebraciones. Hay que tener en cuenta también que el consumidor está cada vez más preocupado por la repercusión que tienen los alimentos de su dieta sobre su salud; en este sentido, existe una relación entre el consumo de carne y la propensión a padecer patologías cardiovasculares.

Finalmente, hay que reseñar que la compra diaria ha desaparecido en muchos hogares por lo que el consumidor selecciona alimentos con una vida útil más larga (envasados en atmósfera modificada, loncheados, etc.), presentaciones poco habituales para la carne de cordero, que sigue siendo muy tradicional.

Por tanto, el desarrollo de nuevas estrategias que incrementen la vida útil de este producto en el mercado reduciendo, por un parte, el desarrollo de la carga microbiana y, por otra, la oxidación lipídica y el deterioro del color que se produce como consecuencia de ella (p. ej., incluyendo antioxidantes en la ración de los animales, nuevos empaquetados...) permitiría prolongar el periodo de tiempo a lo largo del cual esta carne podría ser comercializada y consumida, lo que constituiría, sin duda, un estímulo económico para este sector agropecuario tan castigado por las circunstancias actuales.

## **2. Los procesos de oxidación**

El oxígeno es una molécula esencial para el desarrollo de la vida aerobia ya que resulta fundamental en aspectos claves como, por ejemplo, el metabolismo energético y la respiración. No obstante, como parte de estos procesos se forman especies reactivas del oxígeno (ROS), que pueden resultar perjudiciales para el organismo si se encuentran en cantidades excesivas y no se neutralizan adecuadamente.

### **2.1 Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)**

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son los principales compuestos que provocan reacciones de oxidación en los sistemas biológicos. Pueden ser producidos de manera accidental debido a reacciones de reducción del oxígeno durante la respiración aerobia, pero también como subproductos de ciertas enzimas, por autooxidación de compuestos como el ácido ascórbico o bien con una función determinada como parte de la actividad fagocítica e inmunológica en general (Sies, 2005).

Las ROS comprenden todas las sustancias reactivas que, siendo o no radicales libres, centran su actividad en un átomo de oxígeno. Dentro de ellas se incluyen los radicales libres (RL), que son cualquier especie química (molécula, átomo o ión) que pudiendo existir de manera independiente tiene un electrón desapareado en su orbital más externo. Algunas de las ROS más destacadas se detallan a continuación:

-Radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), formado por la reducción univalente del oxígeno molecular en estado triplete  $^3O_2$ . Este anión se considera un ROS primario.

-Radical hidroperoxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), surge como consecuencia de la protonación de un radical superóxido.

-Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), aparece al reaccionar un radical superóxido con agua. En condiciones biológicas es un oxidante débil y menos reactivo que otros productos. Se genera principalmente por enzimas como las oxidasas peroxisomales y algunas enzimas mitocondriales. A partir del peróxido de hidrógeno surgen radicales mucho más activos y peligrosos.

-Radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), es uno de los ROS más activos puesto que no solo es capaz de iniciar reacciones en cadena por sustracción de un átomo de hidrógeno sino que, además, posee una gran facilidad para capturar electrones dando lugar a  $HO^{\cdot}$ , por lo que puede causar daños en sistemas biológicos (ácidos nucleicos, proteínas, ácidos grasos). Se puede formar por radiolisis de peróxido de hidrógeno, por descomposición fotolítica de alquilhidropéroxidos o bien como consecuencia de la reducción univalente del peróxido de hidrógeno con iones metálicos [normalmente hierro ( $Fe^{2+}$ )] o con aniones superóxido mediante la reacción de Haber-Weiss.

-Radical peroxilo ( $ROO^{\cdot}$ ), es altamente reactivo, pero su reactividad depende sobre todo del grupo sustituyente (R). Participa en diversas reacciones

biológicas y puede oxidar ácidos grasos, romper la cadena de ácidos nucleicos y modificar proteínas.

-Óxido nítrico (NO<sup>·</sup>), se forma por la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa siendo su precursor la L-arginina. Es abundante puesto que actúa como señal en gran variedad de procesos biológicos de gran importancia, principalmente como vasodilatador o neurotransmisor. También es utilizado por los macrófagos durante los procesos inflamatorios puesto que actúa inhibiendo la producción de adenosin trifosfato (ATP) y, por tanto, impidiendo la proliferación de bacterias, hongos y parásitos (Viant, Fonseca, Rodríguez y Anglada, 1998).

## **2.2 La oxidación**

Las ROS ejercen un papel relevante en diversos procesos esenciales para la vida como, por ejemplo, procesos inmunitarios y de detoxificación de xenobióticos (Urquiaga y Leighton, 2000). En consecuencia, las ROS, en concentraciones adecuadas, son beneficiosas para el organismo. Es cuando se produce un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y los mecanismos de defensa antioxidante del organismo cuando la presencia de ROS se vuelve perjudicial debido a su capacidad para provocar daños en las moléculas biológicas. A este desequilibrio es a lo que se denomina estrés oxidativo, que fue definido por Sies (1985) como *“la perturbación del balance prooxidante-antioxidante de un organismo a favor del primero provocando un daño potencial al que denominamos daño oxidativo”*. Los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos son las principales dianas de las ROS, por tanto el daño oxidativo está implicado en procesos como mutagénesis, carcinogénesis, daños en la membrana por peroxidación lipídica y oxidación proteica.

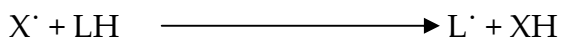


## 2.2.1 Moléculas biológicas diana de las reacciones de oxidación

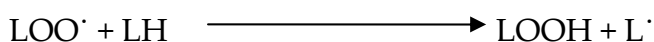
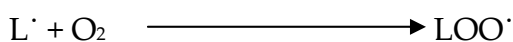
### a) Lípidos

Los lípidos son las moléculas más susceptibles de ser oxidadas por las ROS, y lo son en mayor medida si en su estructura existe la presencia de dobles enlaces. Es el caso de los fosfolípidos que, a pesar de ser minoritarios respecto a los triglicéridos en músculo, son mucho más susceptibles a la oxidación por su alto contenido en ácidos grasos insaturados (Labuza y Dugan, 1971). Puesto que los fosfolípidos se encuentran principalmente en las membranas celulares, la acción de las ROS sobre ellos puede causar alteraciones de adhesión, fluidez y permeabilidad así como de la función metabólica.

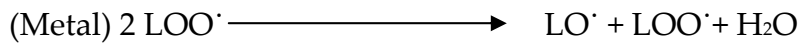
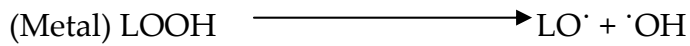
La peroxidación lipídica comienza con la participación de una especie reactiva ( $X^\cdot$ ), normalmente un hidroxilo, capaz de sustraer un átomo de hidrógeno de un grupo metilo de la cadena del ácido graso insaturado, lo que convierte a este en un radical lipídico o radical alquilo ( $L^\cdot$ ).



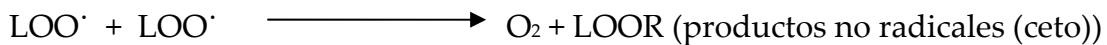
Durante la propagación estos radicales libres lipídicos reaccionan con el oxígeno dando lugar a un peroxirradical ( $LOO^\cdot$ ). Este peroxirradical, a su vez, sustrae un átomo de hidrógeno del siguiente ácido graso generando un hidroperóxido ( $LOOH$ ), lo que provoca una reacción en cadena a través de la matriz lipídica (Halliwell y Chirico, 1993; Ladikos y Lougovois, 1990). Los hidroperóxidos son los productos primarios formados como consecuencia de la oxidación (Gray y Monahan, 1992).



Estos hidroperóxidos son estables por si mismos pero pueden reaccionar dando lugar a una iniciación secundaria mediada normalmente por metales de transición durante la cual se forman radicales peroxilo (LOO $\cdot$ ) y alcoxilo (LO $\cdot$ ).



El proceso finaliza principalmente al adicionarse dos radicales peroxilo, ya que en presencia de oxígeno la reacción hacia el radical peroxilo (LOO $\cdot$ ) es tan rápida que la concentración del resto de los radicales es despreciable (Steele, 2004) dando lugar a un producto no oxidativo (Monahan et al., 1992).



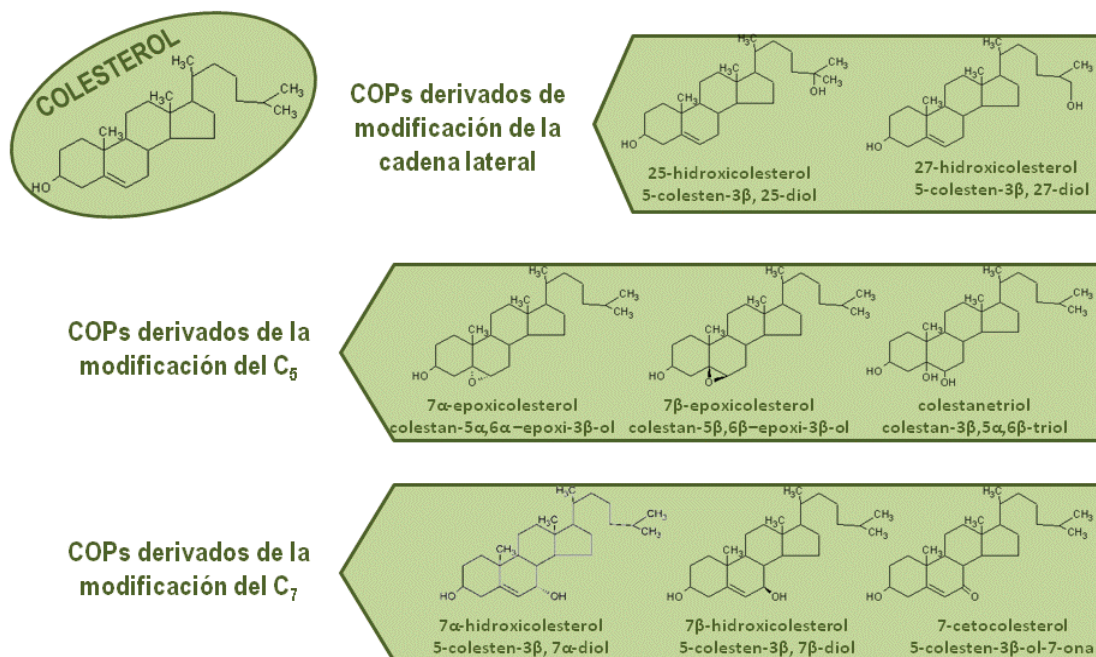
Estos radicales no se forman únicamente como consecuencia de la reacción con ROS, sino que también pueden ser generados de manera enzimática. Este tipo de oxidación, en comparación con la oxidación lipídica no enzimática que actúa en cadena, es menos rápida al depender de enzimas, por lo que no suele ser importante desde el punto de vista cuantitativo (Spiteller, 2001). La oxidación enzimática está mediada por enzimas lipooxigenasas y ciclooxigenasas (Hsieh y Kinsella, 1989; Kanner, German, Kinsella y Hultin, 1987) que poseen en su centro activo un Fe<sup>3+</sup> capaz de reducirse dando lugar a un radical alquilo, que al reaccionar con el oxígeno forma un radical peroxilo (Spiteller, 2001).

En cuanto al colesterol, este compuesto es un éster lipídico que forma parte de la membrana plasmática de las células y que posee un doble enlace en su carbono que lo hace susceptible a la oxidación en presencia de ROS; así, los peroxi u oxi radicales de los ácidos grasos poliinsaturados cercanos son los que extraen un hidrógeno del colesterol, iniciando de esta forma su oxidación (Smith, 1987). Este proceso da lugar a compuestos denominados productos de oxidación del colesterol, COPs (*“Cholesterol*

oxidation products”) u oxisteroles, con una estructura similar al colesterol pero con un grupo hidroxilo, epoxi o cetona.

La formación de COPs (Figura 1) suele comenzar con la formación de 7-hidroperóxidos de colesterol por sustracción del hidrógeno del C<sub>7</sub>, lo que promueve la aparición de 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol y de ellos el 7-cetocolesterol (Smith, 1987). Estos tres COPs son los más abundantes. A partir de ellos se pueden generar otros COPs por epoxidación del doble enlace en el C<sub>5</sub> de los hidroperóxidos principales dando lugar a  $\alpha$  y  $\beta$ -epoxicolesterol que, a su vez, por hidratación, generan colestanetriol. Finalmente también pueden ocurrir oxidaciones en la cadena lateral dando lugar a hidroperóxidos y a sus productos de descomposición, de los que los más abundantes son el 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol (Smith, 1987). A partir de ellos o por otras vías menos comunes se pueden formar otros tipos de COPs que por su escasa importancia y representatividad en carne no incluiremos.

Figura 1. Estructura química y origen de los oxisteroles de interés biológico más importantes.

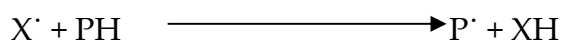


## b) Proteínas

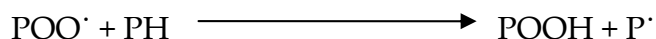
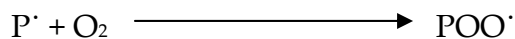
Las proteínas también son moléculas susceptibles de ser oxidadas por las ROS. No obstante, debido a la progresión más lenta de las reacciones, la oxidación proteica ha sido menos estudiada que la lipídica.

La oxidación proteica da lugar a la formación de proteínas carboniladas, pérdida de grupos sulfhidrilo y a la formación de cruzamientos entre proteínas. Como resultado se producen rupturas en las cadenas peptídicas, modificaciones en las cadenas laterales de los aminoácidos y formación de entrecruzamientos intermoleculares por alteraciones de carga eléctrica, siendo la cisteína, la tiroxina y la fenilalanina los aminoácidos que muestran una mayor susceptibilidad a la oxidación (Davies, 1987; Davies y Dean, 2003). Estas modificaciones afectan a las propiedades de las proteínas, incrementando la susceptibilidad a la proteólisis e incluso inhibiendo su función enzimática (Dean, Fu, Stocker y Davies, 1997).

El proceso de oxidación proteica comienza con la sustracción de un átomo de hidrógeno por las ROS, dando lugar a la generación de un radical proteico (P<sup>•</sup>).



Dicho radical es convertido a su vez en presencia de oxígeno en radical peroxilo (POO<sup>•</sup>) y de ahí se genera un alquilperóxido (POOH) que extrae el hidrógeno de otra molécula proteica.



A su vez los alquilperóxidos pueden reaccionar con agua para generar radicales alcoxi (PO<sup>•</sup>) o su derivado hidroxilo (POH).

### *c) Ácidos nucleicos*

La gran cantidad de ROS que se libera en la cadena respiratoria hace del ADN mitocondrial un sustrato muy susceptible al daño oxidativo (Machlin y Bendich, 1987). La oxidación de desoxirribosas y modificación de bases nitrogenadas puede provocar rupturas y entrecruzamientos de las cadenas de ADN y se puede llegar a la pérdida de expresión. La acción de las ROS sobre el ADN también se relaciona con la generación de mutaciones que pueden ser carcinogénicas (Machlin y Bendich, 1987).

### **2.2.2 Sistemas de defensa biológicos frente a la oxidación.**

Puesto que la formación de ROS es inherente al metabolismo aerobio existe una gran variedad de sistemas de defensa antioxidante que tratan de mantener el balance oxidativo del organismo y evitan los riesgos que conlleva el estrés oxidativo (Sies, 2005). Halliwell y Gutteridge (1989) definieron antioxidante como *“cualquier sustancia que al entrar en contacto con un sustrato oxidable presente en mayor concentración que ella, inhibe o retrasa de manera significativa la oxidación de dicho sustrato”*. Los grupos de antioxidantes más relevantes se detallan a continuación:

#### *a) Antioxidantes enzimáticos*

Superóxido dismutasa (SOD): metaloproteína citosólica (Cobre y Zinc) y mitocondrial (Mn) responsable de la conversión de radicales superóxido ( $O_2^-$ ) en especies no reactivas como el agua (Yu, 1994).

Glutación peroxidasa (GPX): selenoproteína citosólica y mitocondrial. Actúa sobre el glutatión (GSH) para convertir el peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua, así como inactivando los peróxidos lipídicos. El glutatión se reduce de nuevo mediante una glutatión reductasa dependiendo de NADPH. La GPX actúa a bajas concentraciones de  $H_2O_2$  puesto que, a pesar de ser muy eficaz, depende del reciclado de GSH y del consumo de NADPH (Yu, 1994).

Catalasa (CAT): hemoproteína enzimática localizada principalmente en los peroxisomas y mitocondrias que provoca la ruptura del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. Actúa en conjunto con la GPX a concentraciones altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yu, 1994).

*b) Antioxidantes no enzimáticos*

El sistema de antioxidantes no enzimáticos está integrado por una serie de sustancias que, aun estando presentes a bajas concentraciones, en presencia de compuestos oxidables se oxidan antes que éstos retrasando o inhibiendo su oxidación. Los antioxidantes no enzimáticos son un heterogéneo grupo de moléculas capaces de capturar radicales libres originando especies químicas menos nocivas o radicales no reactivos. Así, el sistema antioxidante no enzimático incluye una larga serie de compuestos de bajo peso molecular, siendo los más importantes el glutatión reducido y las vitaminas E y C. Además, existen otros compuestos como los compuestos fenólicos, ácido  $\alpha$ -lipoico, ácido úrico, bilirrubina, algunos azúcares y aminoácidos, la coenzima Q o ubiquinona (y varios derivados de ésta) y la melatonina, todos ellos con propiedades antioxidantes.

En esta categoría hay que mencionar también a las proteínas de almacén y transporte de iones metálicos, que actúan secuestrando los iones Fe<sup>+3</sup> y Cu<sup>+2</sup>, ya que su exceso promueve la generación de radicales libres. Las proteínas que cumplen esta función son: ferritina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, metalotioneína, hemopexina y carnosita (Chihuilaf, Contreras y Wittwer, 2002). Dichas proteínas pueden degradarse liberando los metales, así que también existen agentes quelantes como el ácido cítrico (Papas, 1999) que forman complejos insolubles con los metales (Decker, 1998).

### **3. Antioxidantes en producción animal**

La utilización de antioxidantes en producción animal tiene un doble fundamento. En primer lugar, evitar problemas debidos al estrés oxidativo que pueden ocasionar diversas patologías y, por tanto, una merma del nivel productivo del animal. En segundo lugar, los antioxidantes se utilizan para mejorar la estabilidad oxidativa de los productos obtenidos (p. ej., carne, leche, huevos). No obstante, un compuesto que presenta propiedades antioxidantes in vitro puede manifestar otros efectos en un sistema biológico complejo, es decir, cuando se administra directamente en la dieta de los animales. Así por ejemplo, un antioxidante puede ser modificado por el tracto digestivo, puede no absorberse o ser absorbido y retenerse en unos tejidos y no en otros. Además, si las dosis in vivo no son adecuadas puede producirse un efecto inverso incrementando el daño oxidativo (Decker, 1997; Rietjens et al., 2002). Es, por tanto, necesario desarrollar ensayos in vivo en los que los animales reciban distintas dosis del antioxidante objeto de estudio con el fin de conocer el uso potencial de estos compuestos en producción animal y de definir las dosis adecuadas a las que deben ser empleados.

#### **3.1 Antioxidantes sintéticos**

Los antioxidantes sintéticos se incluyen habitualmente en productos manufacturados, como los piensos compuestos. Sin embargo existe preocupación por los efectos que pueden tener sobre la salud animal, pero también sobre la humana (Valenzuela y Nieto, 1996; Branen, 1975), ya que hay estudios que aseguran que los compuestos antioxidantes sintéticos son responsables de diversas dolencias e incluso podrían resultar carcinogénicos y teratogénicos, además de poseer toxicidad residual (Branen, 1975; Moreira, Ponce, Del Valle y Roura, 2005). Los más utilizados son los siguientes:

*a) Butilato hidroxianisol (BHA)*

Es un antioxidante muy liposoluble formado por una mezcla de entre 2 y 3 isómeros del *terbutil-4-hidroxianisol*. Se utiliza ampliamente en productos de origen animal puesto que debido a sus formas esteáricas no es muy efectivo sobre grasas y aceites vegetales. Es por ello que cuando se utiliza en estos últimos suele aparecer en combinación con otros antioxidantes (p. ej., con los esteres del ácido gálico) debido a que ejerce efectos sinérgicos (Valenzuela y Nieto, 1996).

*b) Butilhidroxitolueno (BHT)*

Muestra una estructura similar al BHA y, al igual que este, suele utilizarse en combinación con otros antioxidantes debido a su baja actividad en aceites vegetales.

*c) Tertbutilhidroxiquinona (TBHQ)*

Antioxidante sintético muy potente tanto en productos de origen animal como vegetal, por lo que se utiliza mucho en estos últimos especialmente cuando los lípidos muestran altos niveles de insaturación. Es un compuesto moderadamente liposoluble y escasamente soluble en agua (Valenzuela y Nieto, 1996).

*d) Ésteres del ácido gálico*

Se basan en las estructuras tridihidroxi del ácido gálico. Actualmente se suelen utilizar octil o dodecil galatos puesto que estructuras más pequeñas muestran problemas de solubilidad. Son antioxidantes muy potentes cuyo principal inconveniente es que tienden a unirse con el hierro, generando una decoloración azul oscuro. Además, son especialmente sensibles al calor (Valenzuela y Nieto, 1996).



### 3.2 Antioxidantes naturales

La controversia causada en torno a la utilización de antioxidantes sintéticos en animales destinados al consumo humano y, en general, en la industria alimentaria (Peng, Yuan, Liu y Ye, 2005; Tawaha, Alali, Gharaibeh, Mohammad y El-Elimat, 2007) está promoviendo la búsqueda de nuevas sustancias de origen natural que puedan suplir la actividad antioxidante ejercida por estos compuestos. Los antioxidantes naturales más conocidos y aquellos que están siendo más ampliamente estudiados son los siguientes:

#### *a) Vitamina C*

El ácido ascórbico o vitamina C es un antioxidante que actúa en medios acuosos, por lo que se localiza principalmente en los fluidos extracelulares, reaccionando de forma directa con radicales superóxido, hidroxilo e hidroperóxidos lipídicos. A su vez el ácido ascórbico es el único antioxidante endógeno que puede proteger contra el daño producido por radicales peroxilo (Griffiths y Lunec, 2001).

La actividad más importante la realiza en combinación con otros antioxidantes como la vitamina E, ya que es la vitamina C la que actúa en primer lugar en medio acuoso y, una vez llegados los radicales a las membranas, comienza a actuar la vitamina E. A su vez, cuando la vitamina E se convierte en  $\alpha$ -tocoferilo la vitamina C participa en su regeneración para convertirla de nuevo en  $\alpha$ -tocoferol (Chihuilaf et al., 2002). Paradójicamente, bajo ciertas condiciones (in vitro en bajas concentraciones) o en presencia de metales, la vitamina C puede ejercer un efecto prooxidante (Griffiths y Lunec, 2001).

#### *b) Carotenoides*

En general los carotenoides han sido ampliamente estudiados por ser rápidamente oxidables, de manera que inhiben la oxidación de otro tipo de compuestos. Los  $\beta$ -

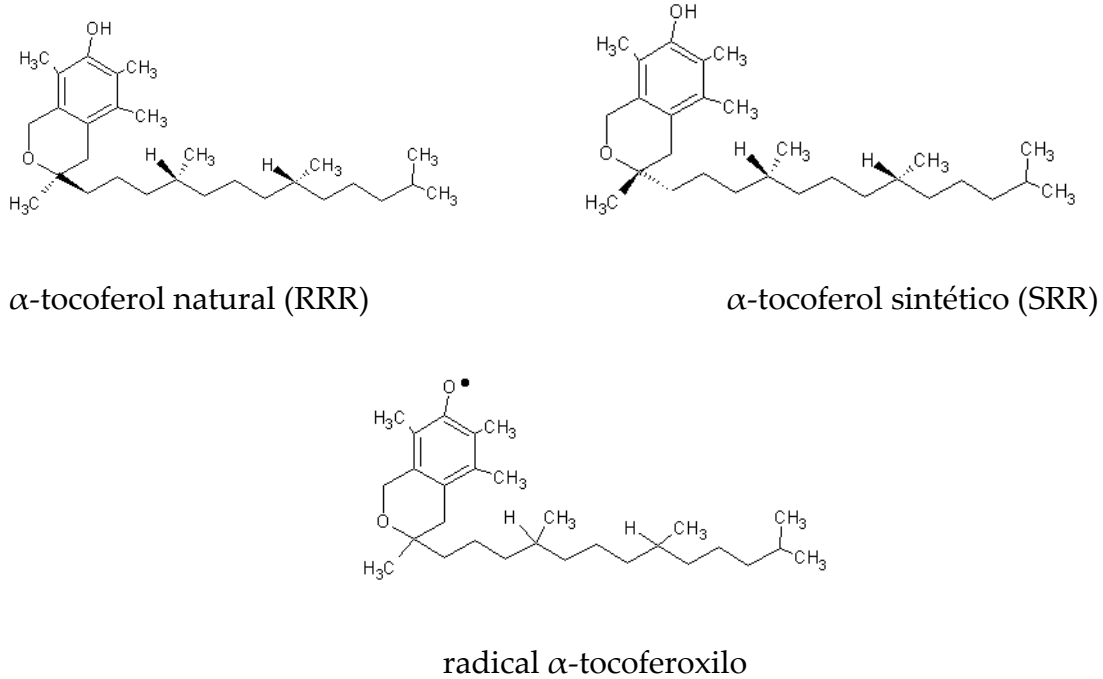
carotenos, en particular, tienen gran importancia, ya que pueden ser metabolizados en animales para producir vitamina A (Krinsky, 2001). Los  $\beta$ -carotenos se dividen en dos moléculas de retinaldehído; de ellas, una fracción se oxida irreversiblemente a ácido retinoico, mientras que la cantidad restante se reduce a retinol (Londoño, 2012).

### *c) Vitamina E*

Se engloban bajo esta denominación todos los compuestos cuya estructura se compone de una hidroquinona metilada unida a una cadena isoprenoide (Wang y Quinn, 1999). Existen 8 compuestos naturales que se incluyen en este grupo:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocoferol y  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocotrienol, siendo el  $\alpha$ -tocoferol el componente más conocido (tres grupos metilo C<sub>5</sub>, C<sub>7</sub> y C<sub>8</sub>) por su nivel de actividad así como por encontrarse entre los constituyentes lipídicos de la membranas, principales dianas de la oxidación lipídica (Wang y Quinn, 2000).

Los tocoferoles presentan tres centros de asimetría en su cadena isoprenoide. La vitamina E de origen natural presenta la configuración R en los tres centros, lo que le provee de mayor actividad que la vitamina E de origen sintético (dl- $\alpha$ -tocoferol o 2-ambo-tocoferol) (Bramley et al., 2000). La presencia de un grupo hidroxilo (C<sub>6</sub>) así como la presencia de al menos un grupo metilo en su anillo aromático son los principales responsables de su actividad antioxidante. La vitamina E es el principal antioxidante liposoluble capaz de romper la cadena de propagación de la peroxidación lipídica, neutralizando radicales peroxilo antes de que estos oxiden a su sustrato diana (ácidos grasos poliinsaturados, por ejemplo). Para ello actúa cediendo el H del grupo hidroxilo (C<sub>6</sub>) al radical peroxilo convirtiéndose en  $\alpha$ -tocoferoxilo (Figura 2), radical muy estable gracias a la presencia del anillo aromático (Bramley et al., 2000).

Figura 2. Estructura química de la vitamina E natural, sintética y del radical tocoferoxilo.



Tanto los tocoferoles como los tocotrienoles son sintetizados por vegetales superiores y cianobacterias, pero la vitamina E es un nutriente esencial que no puede ser sintetizado por los animales. Por tanto, la carencia en la dieta de vitamina E puede dar lugar a enfermedades en rumiantes como el músculo blanco (Hogue, Proctor, Warner y Loosli, 1962; Muth, Oldfield, Remmert y Schubert, 1958). También se ha descrito que la vitamina E juega un importante papel como moduladora de la respuesta inmune en humanos (Meydani y Hayek, 1992) y animales (Finch y Turner, 1996), ejerciendo un efecto directo en enfermedades inflamatorias (Packer y Fuchs, 1993).

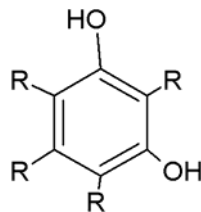
La forma comercial de vitamina E utilizada en nutrición animal es en forma de éster acetato de modo que su capacidad antioxidante se mantiene intacta hasta su hidrólisis en el sistema digestivo donde se libera el compuesto  $\alpha$ -tocoferol activo. Además, se ha descrito que existe una correlación directa entre la concentración de vitamina E en el músculo y la concentración de vitamina E en la dieta, así como con la duración del periodo de suplementación (López-Bote, Daza, Soares, y Berges, 2001

y Jensen, Lauridsen y Bertelsen, 1998). Por otra parte, la acumulación de vitamina E es dependiente del tipo de músculo, de modo que aquellos con gran cantidad de fibras de tipo I (músculos rojos) y IIA poseen un mayor porcentaje (Sheldon, 1984). El grado de acumulación de vitamina E en el músculo también depende de la especie animal (Morrissey, Sheehy, Galvin, Kerry y Buckley, 1998).

#### *d) Compuestos fenólicos*

Los compuestos fenólicos son productos del metabolismo secundario de las plantas que constituyen uno de los grupos de antioxidantes naturales más abundantes y ampliamente distribuidos en el reino vegetal con más de 8000 compuestos determinados (Dreosti, 2000). Se caracterizan por contener un anillo aromático unido a dos o más grupos hidroxilo; es lo que denominaremos grupo fenólico (Figura 3). Los compuestos fenólicos suelen dividirse por su composición química y complejidad en ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y taninos.

Figura 3. Grupo fenólico



La biosíntesis de los compuestos fenólicos es un proceso dependiente de luz (Neish, 1964; Tsao, 2010), por ello suelen localizarse sobre todo en las hojas y flores así como en los frutos. En este último caso la concentración va decreciendo desde la piel a la semilla del fruto (Crozier, Lean, McDonald y Black, 1997). Muy pocos compuestos fenólicos se encuentran en las partes subterráneas de las plantas con la evidente excepción del bulbo generado por la cebolla, que posee un elevado contenido en quercetina (Hertog, Hollman y Vandeputte, 1993).

Su biosíntesis se realiza mediante la ruta del ácido siquímico, la cual se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos: la eritrosa 4-P cony el fosfoenolpiruvato (PEP). Tras varios pasos se obtiene el ácido siquímico, del cual derivan directamente algunos fenoles en los vegetales. La vía del ácido siquímico normalmente prosigue con la incorporación de una segunda molécula de PEP dando lugar a fenilalanina que, por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa, se transforma en el ácido transcinámico. Posteriormente, el ácido cinámico es transformado en ácido p-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático y la acción de una CoA ligasa lo transforma en p-cumaroilCoA, que es el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal. La subdivisión de los compuestos fenólicos en ácidos fenólicos, taninos, lignanos y flavonoides deriva de la variedad y número de unidades simples fenólicas.

Estudios in vitro atribuyen la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos principalmente a sus propiedades redox que les permiten neutralizar radicales libres, quelar oxígeno en su estado singlete y triplete, así como descomponer peróxidos (Osawa, 1994). No obstante, también pueden desempeñar la actividad antioxidante inhibiendo las enzimas responsables de la producción de superóxidos, como es el caso de la xantina oxidasa y de la proteínquinasa (Ursini, Maiorino, Morazzoni, Roveri y Pifferi, 1994), y a su interacción con otras enzimas relacionadas con la oxidación, como la ciclooxigenasa, lipooxigenasa, monooxigenasa microsomal, NADH oxidasa... (Kandaswami y Middleton, 1994). Un gran número de antioxidantes de origen fenólico también tienen la propiedad de quelar los cofactores metálicos de las enzimas (Middleton, Kandaswami y Theoharides, 2000).

Debido a su gran variedad y complicada estructura química los compuestos fenólicos no han despertado gran interés en estudios in vivo hasta hace relativamente pocos años. Hasta entonces, su estudio se ha centrado principalmente en el efecto producido sobre la peroxidación lipídica cuando se agregan como aditivo a sustratos como, por ejemplo, la carne, de modo que diversos estudios han mostrado la

capacidad de algunos compuestos fenólicos para retrasar o detener los efectos de las ROS y prolongar la vida útil de este producto (Tanabe, Yoshida y Tomita, 2002; Ahn, Grün y Fernando, 2002; Fernández-López, Zhi, Aleson-Carbonell, Perez-Alvarez y Kuri, 2005). No obstante, y con el objeto de no manipular ni añadir ningún tipo de aditivo a la carne una vez sacrificado el animal, hay un interés creciente en conocer el potencial de estos compuestos cuando se incorporan en la ración de los animales (Andrés et al., 2012; Botsoglou, Christaki, Fletouris, Florou-Paneri y Spais, 2002; O'Grady, Maher, Troy, Moloney y Kerry, 2006; Smet et al., 2008).

Un aspecto menos estudiado es el efecto que los compuestos fenólicos pueden tener sobre el sistema inmune del animal y sobre el desarrollo de ciertas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Hasta el momento se ha comprobado la importancia de estos compuestos en la prevención de enfermedades del ser humano como, por ejemplo, el cáncer, la osteoporosis, el riesgo cardiovascular, el desarrollo de la aterosclerosis y las enfermedades neurodegenerativas (Menéndez-Carreño et al., 2008; Ziaee, Zamansoltani, Nassiri-Asl y Abbasi, 2009). De la misma manera es esperable que los compuestos fenólicos actúen protegiendo a los animales de las enfermedades provocadas por el estrés oxidativo. Además, se ha probado su actuación sobre el sistema inmune, su actividad antibacteriana y antiviral in vitro (Fernández-López, Zhi, Aleson-Carbonell, Pérez-Álvarez y Kuri, 2005; Hamer, 2007; Orhan, Özçelik, Özgen y Ergun, 2010; Rauha et al., 2000). De demostrarse estos mismos efectos en animales vivos, estos compuestos tendrían gran interés en producción animal, ya que muchas enfermedades comunes se relacionan con condiciones alteradas en el equilibrio redox (Art, Kirschvink, Smith y Lekeux, 1999; Bernabucci, Ronchi, Lacetera y Nardone, 2005; Kaftan et al., 2003).

#### Compuestos fenólicos del romero

*Rosmarinus officinalis* L., comúnmente conocida con el nombre de romero, es una especie de Labiácea que se encuentra de manera espontánea en Europa, Asia y África

pero es especialmente común en áreas de clima mediterráneo. El romero ha sido tradicionalmente utilizado como especia alimentaria y en medicina tradicional por su elevado contenido en aceite esencial. Así, por ejemplo, la suplementación con romero ha mostrado actividad inmunomoduladora en ratones (Al Sheyab, Abuharfeil, Salloum, Hani y Awad, 2012), especialmente actuando como antiinflamatorio (Altinier et al., 2007; Benincá, Dalmarco, Pizzolatti y Fröde, 2010), mientras que otros estudios destacan su actividad antibacteriana in vitro (Genena, Hense, Smania y de Souza, 2008; Oluwatuyi, Kaatz y Gibbons, 2004; Pintore et al., 2002). En relación con las propiedades de la carne, diferentes trabajos han puesto de manifiesto un efecto beneficioso (Martínez, 2013; Moñino, Martínez, Sotomayor, Lafuente y Jordán, 2008; Nieto, Estrada, Díaz, Bañón y Garrido, 2008; Nieto, Díaz, Bañón y Garrido, 2010).

Los compuestos fenólicos de mayor importancia en el romero son los siguientes: ácido carnósico (126,6 mg/100 g MF), rosmanol (124,1 mg/100 g MF), ácido rosmarínico (32,8 mg/100 g MF), naringina (53,1 mg/100 g MF) y cirsimatitina (24,4 mg/100 g MF) (Cuvelier, Richard y Berset, 1996), aunque estas cifras pueden variar ampliamente en función de las distintas partes de la planta, su estado de madurez, las condiciones ambientales o la disponibilidad de agua (Munné-Bosch, Mueller, Schwarz y Alegre, 2001).

Hay estudios en los que se ha demostrado que el principal compuesto que se acumula en carne cuando se administra romero en la dieta de los animales es el ácido carnósico (Moñino et al., 2008). En relación con la carne, es a este compuesto al que se le atribuyen las propiedades antioxidantes del romero cuando se incluye en la dieta de los animales. No obstante, aún no se ha determinado qué cantidad de ácido carnósico es óptima para mejorar la estabilidad oxidativa de los productos obtenidos, ni tampoco el efecto de este compuesto sobre el bienestar de los animales.

#### **4. Estrés oxidativo y bienestar animal**

Hughes, (1976) define bienestar animal como *“el estado de salud mental y físico en armonía con el entorno o medio ambiente”*. Por su lado, la American Veterinary Medical Association (AVMA) extiende la definición incluyendo aspectos relacionados con el alojamiento, manejo, alimentación, tratamiento y prevención de enfermedades, tenencia responsable, manipulación humanitaria y, si es necesario, la eutanasia humanitaria. Según Broom (1983), el bienestar de un individuo es un estado fisiológico que le permite adaptarse con éxito en un ambiente dado, mientras que la respuesta al estrés es el mecanismo fundamental que permite a los animales adaptarse a un cambio en su ambiente (Selye, 1936).

No obstante, cuando los estímulos estresantes son muy intensos, repetidos o sostenidos en el tiempo, este estado de alerta puede incrementar el metabolismo y, por tanto, el estrés oxidativo al que el animal está expuesto, provocando un efecto inmunodepresor que predisponga a desarrollar ciertas patologías. De ahí la estrecha relación existente entre bienestar animal, estrés oxidativo y respuesta inmune.

##### **4.1 La respuesta inmune**

La respuesta inmune es la respuesta colectiva y coordinada de los mecanismos fisiológicos que los seres vivos utilizan para defenderse del ataque de organismos o alteraciones celulares internas a las que denominamos antígeno. La primera línea de defensa se denomina respuesta inmune innata y se inicia de inmediato, al primer contacto con un antígeno. Sin embargo, la respuesta que se desarrolla cuando el ser vivo no logra eliminar el antígeno o cuando éste entra en contacto con el organismo por segunda vez se denomina respuesta inmune adquirida (Rojas y Cano, 2001).



### a) Respuesta inmunitaria innata

La respuesta inmunitaria innata se caracteriza por ser inmediata, inespecífica e independiente al antígeno y por no poseer memoria. El sistema defensivo consta de dos partes: la primera, formada por mecanismos inespecíficos externos (barreras físicas, químicas y biológicas) como la piel, las mucosas..., mientras que la segunda, consistente en mecanismos inespecíficos internos moleculares (proteínas de fase aguda, citoquinas, sistema del complemento...) y celulares (fagocitos, células asesinas naturales (NK), neutrófilos, linfocitos B1...), se activa cuando un microorganismo es capaz de atravesar dichas barreras (Tizard, 1992).

Cuando un antígeno penetra en el organismo existen señales de alarma fundamentalmente de dos tipos. En primer lugar aparecen las alarminas, que son proteínas que pueden ser liberadas por daño celular o cuando las células centinela se activan. En segundo lugar aparecen las señales de alarma denominadas patrones moleculares asociadas a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), que son moléculas de origen proteico que se encuentran en el patógeno invasor. Estos PAMPs son detectados por receptores de membrana específicos denominados *toll-like receptors* (TLRs), situados en las células centinela (macrófagos y células polimorfonucleadas) capaces de identificar y eliminar los patógenos. Dichas células centinela liberan a su vez moléculas proteicas denominadas citoquinas, mayoritariamente interleuquinas 1 y 12 (IL-1, IL-12), así como factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y otras moléculas como quimiocinas, que mantienen la inflamación hasta activar el sistema inmune adquirido.

En lo que respecta al TNF- $\alpha$ , esta proteína es liberada por las células centinela en cuanto se detecta la presencia de patógenos y es la principal responsable de la respuesta inflamatoria aguda y de sus signos: calor, hinchazón, dolor y enrojecimiento. El TNF- $\alpha$  promueve la activación de neutrófilos y su migración a la zona de daño celular. En macrófagos estimula la fagocitosis, así como la producción

de oxidantes (activando las enzimas óxido nítrico sintetasa (NOS) y ciclooxigenasa-2 (COX-2)) y de citoquinas. Secundariamente fomenta la aparición de la respuesta adquirida promoviendo la actuación de las células presentadoras de antígeno y estimulando la activación de los linfocitos T citotóxicos.

La IL-1 se produce de manera más tardía y actúa de un modo más global que la citoquina anterior. También promueve la activación de neutrófilos y su adhesividad vascular así como la producción de enzimas oxidantes, pero además actúa sobre el cerebro provocando los síntomas de aletargamiento, malestar general y falta de apetito y sobre los músculos, movilizand aminoácidos y causando fatiga y dolor muscular. Por último actúa sobre el hígado induciendo la producción de proteínas de la fase aguda.

La citoquina IL-12 estimula las células natural killer (NK) y los linfocitos T (LT) y activa factores de crecimiento para fibroblastos, participando en tareas de remodelación del daño.

Por último, en respuesta a la infección, las células fagocíticas adquieren marcadores de coestimulación y pueden presentar secuencias peptídicas de los patógenos fagocitados para convertirse en células presentadoras de antígeno que inician la respuesta adquirida.

#### *b) Respuesta inmunitaria adquirida*

La respuesta inmunitaria adquirida no es una respuesta inmediata ya que aparece tras varios días de infección, pero es muy efectiva puesto que no solo reconoce y destruye el antígeno, sino que genera una memoria del proceso que permite eliminar rápidamente reinfecciones causadas por el mismo antígeno (Tizard, 1992).

La respuesta inmune adquirida comienza con la presentación del antígeno a los linfocitos, que son las células específicas que lo reconocen y se activan durante el

proceso. Esta fase tiene lugar en el tejido linfoide periférico, mientras que el efecto se ejerce en el lugar de la infección. Durante la fase de reconocimiento, el tejido linfoide activa linfocitos T ó B dependiendo del tipo de antígeno. Los linfocitos T se encargan de la respuesta inmune celular mientras que los linfocitos B son responsables de la respuesta inmune humoral, también llamada mediada por anticuerpos (Abumohor, 2005).

### Respuesta inmune celular

Con respecto a los linfocitos T (LT), los receptores de estas células reconocen antígenos proteicos gracias a que previamente la sustancia antigénica ha sido degradada y expuesta por las células presentadoras de antígenos. Así, por ejemplo, los linfocitos CD4+ reconocen secuencias de entre 7 y 10 aminoácidos, mientras que los linfocitos CD8+ reconocen secuencias de hasta 30 aminoácidos.

La activación en el caso de los LT requiere, por una parte, del reconocimiento del determinante antigénico por el receptor y, por otra, del reconocimiento de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) en la célula presentadora. La respuesta inmediata a la activación es la secreción de citoquinas que provoca que los LT se dividan en subpoblaciones Th1 y Th2. Cada subpoblación se amplifica a si misma e inhibe a la otra.

Respuesta Th1: la presencia de IL-12, secretada por las células presentadoras del antígeno estimula la subpoblación Th1 que produce interferón gamma (INF- $\gamma$ ). Este tipo de respuesta se activa principalmente por patógenos intracelulares, virus y antígenos proteicos que activan a macrófagos o células NK. La producción de INF- $\gamma$  estimula la actividad de los macrófagos y la producción de anticuerpos capaces de marcar el patógeno para que sea identificado por macrófagos, incrementando la capacidad fagocítica.

Respuesta Th2: es estimulada por la presencia de IL-4 y secreta a su vez IL-4 o IL-5. Ocurre principalmente por infestación por helmintos o exposición a alérgeno. Este tipo de respuesta se basa en las reacciones inmunes mediadas por basófilos y eosinófilos y en la producción de IgE.

### Respuesta inmune humoral

Los linfocitos B (LB), por su parte, pueden reconocer antígenos tanto proteicos como no proteicos. Esta respuesta, denominada humoral o mediada por anticuerpos, tiene como función la defensa contra patógenos extracelulares y toxinas bacterianas.

Los receptores de los LB están formados por inmunoglobulinas de membrana (IgM o IgD). Las señales de activación, en este caso, consisten en el reconocimiento del antígeno y el reconocimiento de la molécula de complemento CD3. La activación de los LB provoca su transformación en células plasmáticas que secretan anticuerpos y forman células de memoria.

Esta respuesta, a su vez, se divide en: 1) respuesta T dependiente, si el antígeno es proteico. La mayoría de los antígenos son de este tipo, es decir, requieren cooperadores para la producción máxima de anticuerpos. Cuando una célula B ingiere un patógeno, adhiere parte de las proteínas a la proteína del complejo mayor de histocompatibilidad II. Este complejo es llevado a la superficie de la membrana celular, donde puede llegar a ser reconocido por los linfocitos T, los cuales activarán al linfocito B, para que produzca anticuerpos específicos produciendo principalmente inmunoglobulinas E y A; 2) respuesta T independiente si el antígeno es no protéico. Algunos patógenos tienen epítomos repetitivos de carbohidratos que estimulan a las células B, por medio de los llamados *receptores reconocedores de patrones*, activándolos para que sinteticen inmunoglobulinas en ausencia de cooperación de un linfocito T. Habitualmente son anticuerpos de baja afinidad IgM (infección por primera vez) e IgG (Infección secundaria respuesta más rápida)..

## 4.2 Patologías relacionadas con el estrés oxidativo

### *a) Inmunodepresión por estrés*

El transporte de los animales, bien hacia el matadero o hacia otros destinos, se considera uno de los principales responsables de estrés agudo en producción animal. Si el manejo no se realiza de acuerdo a las directrices que tratan de salvaguardar el bienestar, entonces los animales sufren una respuesta fisiológica en la que el objetivo principal es adaptar el organismo a la nueva situación. Existe una primera respuesta inmediata por activación del sistema nervioso simpático que induce cambios de comportamiento, aumento del ritmo cardíaco, de la presión arterial, además de alteraciones metabólicas como el incremento del metabolismo celular, hiperglucemia, aumento de la glucogenolisis en hígado y la activación de la respuesta inflamatoria. Para restablecer el equilibrio metabólico es necesaria una segunda respuesta, en este caso por vía sanguínea, consistente en la secreción de una hormona (ACTH), que actúa sobre la glándula suprarrenal. Esta glándula secreta sustancias a la circulación sanguínea como el cortisol, que contribuye a la adaptación definitiva. Esta segunda fase es más lenta y el cortisol tarda en elevarse aproximadamente 15 minutos tras la acción del agente estresante. El cortisol es un claro indicador de estrés a corto plazo (Grandin, 1997) y actúa liberando aminoácidos y ácidos grasos a partir de los depósitos celulares, permitiendo obtener energía; además, ejerce un efecto antiinflamatorio, disminuyendo el número de eosinófilos y linfocitos en la sangre.

No obstante, cuando los estímulos estresantes son muy intensos, repetidos o sostenidos en el tiempo, ya sea como consecuencia del transporte o de condiciones ambientales inadecuadas (frío o calor excesivo, ruidos, ...; Sivakumar, Singh y Varshney, 2010; Adachi, Kawamura y Takemoto, 1993), este estado de alerta desgasta las reservas del organismo por aumento del metabolismo y, en consecuencia, también se incrementa el estrés oxidativo al que el animal está expuesto (Wernicki et al., 2006). Este aspecto, junto al efecto inmunodepresor del cortisol anteriormente mencionado, ayuda a desencadenar ciertas patologías (Knowles, 1999; Pregel, Bollo,

Cannizzo, Biolatti y Contato, 2005; Hartung, 2003), especialmente enfermedades respiratorias (Sconberg et al., 1993). De hecho, Sconberg et al. (1993) demostraron que debido al estrés del transporte la concentración de vitamina E en plasma de ganado bovino se reducía drásticamente, al igual que los recuentos de neutrófilos y glóbulos rojos. También se ha demostrado que la suplementación con vitamina E permitiría restaurar los niveles de antioxidantes en los tejidos (Nockels, Odde y Craig, 1996), evitando problemas posteriores. De la misma forma, la suplementación con vitamina E, C y selenio mejora los valores gasométricos y bioquímicos en cabras sometidas a estrés por calor (Sivakumar et al., 2010). Asimismo la administración de vitamina E parece disminuir el proceso inflamatorio provocado como consecuencia del transporte (Ekstrand-Hammarström, Österlund, Lilliehöök y Bucht, 2007) y reduce la concentración de las proteínas de fase aguda y la presencia de IL-6 y TNF- $\alpha$  (Chirase et al., 2004) relacionadas con la aparición de enfermedades respiratorias.

#### *b) Mastitis*

La respuesta inmune y el estrés oxidativo están, sin duda, fuertemente vinculados, ya que parte de los mecanismos de defensa del sistema inmunológico se basan, precisamente, en la producción de ROS. De hecho, las células centinela emplean mecanismos oxidativos para eliminar los patógenos fagocitados. Este proceso de fagocitosis activa la NADP oxidasa, principal responsable de la producción de iones superóxido que, a su vez, pueden convertirse en peróxido de hidrógeno gracias a la presencia de la superóxido dismutasa. Además, los neutrófilos tienen enzimas capaces de convertir el peróxido de hidrógeno en iones hipoclorito e hidroxilo altamente reactivos. Los linfocitos también basan su mecanismo en la generación de ROS (Chew y Park, 2004). No obstante, el organismo posee mecanismos de defensa antioxidante tanto enzimáticos como no enzimáticos para protegerse de dicha producción de ROS.

La mastitis es una de las enfermedades que produce mayores pérdidas económicas en ganado lechero. Comienza generalmente por una infección bacteriana, la cual desarrolla una reacción inflamatoria que puede llegar a ser severa debido a la liberación masiva de óxido nítrico por los macrófagos y células epiteliales de la glándula mamaria, provocando daños epiteliales graves en la glándula (Boulanger, Bouchard, Zhao y Lacasse, 2001; Goff, Carl Johnson, Wyatt y Cluff, 1996). Durante el proceso inflamatorio se ha visto que se incrementan los niveles de oxidación lipídica y se reducen los niveles de algunos antioxidantes (Goff et al., 1996; Weiss, Hogan y Smith, 2004). Además la leche de glándulas mamarias con mastitis subclínica muestra menores niveles de capacidad antioxidante total en comparación con la procedente de glándulas mamarias sanas (Atakisi et al., 2010; Turk et al., 2012). Todo ello parece indicar la relación existente entre el daño de la mama durante una mastitis y el estrés oxidativo.

De hecho, las vacas con mastitis muestran concentraciones de vitamina C más bajas en plasma (Kleczkowski, Klucinski, Shaktur y Sikora, 2005), siendo la severidad de los signos clínicos inversamente proporcional a este parámetro (Weiss et al., 2004). Además, se ha comprobado que la inyección subcutánea de vitamina C tiene un efecto terapéutico sobre la mastitis (Naresh, Dwivedi, Swarup y Patra, 2002; Ranjan, Swarup, Naresh y Patra, 2005). Estudios con otros tipos de antioxidantes han demostrado su utilidad no solo en la prevención de la mastitis (Scaletti, Trammell, Smith y Harmon, 2003; Smith, Harrison, Hancock, Todhunter y Conrad, 1984) sino que también pueden reducir la duración, incidencia y severidad de los síntomas clínicos (Smith et al., 1984). Consideramos oportuno mencionar que que las células del sistema inmunitario tienen una membrana celular rica en PUFAs, por lo que son especialmente susceptibles a la oxidación (Meydani, Wu, Santos y Hayek, 1995).

### *c) Problemas reproductivos y de gestación*

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que las concentraciones de ROS juegan un importante papel no solo durante la fertilización del óvulo, sino también durante su implantación (Jančar, Kopitar, Ihan, Klun y Bokal, 2007; Sharma y Agarwal, 2004). En este sentido se ha observado que la administración de antioxidantes puede mejorar la fertilidad y reducir la incidencia de problemas posparto como la retención placentaria (Aréchiga, Ortiz y Hansen, 1994; Aréchiga et al., 1998; Harrison, Hancock y Conrad, 1984). Por otra parte, Al-Qudah (2011) observó que la cetosis está relacionada con un incremento en los niveles de oxidación lipídica y por tanto las ovejas afectadas por toxemia desarrollan estrés oxidativo.

### *d) Urolitiasis*

La urolitiasis es una patología relativamente importante en el cebo de corderos, cuando éstos consumen dietas con elevado contenido en cereales. Las ROS parecen estar implicadas en los daños celulares, por lo que una reducción en las ROS a nivel renal podría ser una terapia efectiva para evitar el desarrollo de esta enfermedad (Butterweck y Khan, 2009; Khan, Glenton y Talham, 2002). De hecho, la inclusión de catequinas procedentes del té (Itoh et al., 2005) y otros extractos herbales (Butterweck y Khan, 2009; Yadav et al., 2011) en la dieta, ha demostrado resultados positivos en el control de la urolitiasis en rata.

### *e) Infecciones parasitarias*

Como se señaló anteriormente, el estrés oxidativo puede deprimir el sistema inmune, provocando una mayor propensión de los animales a contraer enfermedades o bien que las enfermedades contraídas sean más agudas. El caso más obvio es la implicación de las ROS en las infecciones parasitarias. Durante la infestación por nematodos el hospedador activa mecanismos de defensa asociados con la formación de ROS (Maffei Facino et al., 1993; Shousha, Khalil y Rashwan, 1999), las cuales alcanzan niveles que pueden dar lugar a daños tisulares en el



hospedador. Durante la infección por *Fasciola hepática* en ratas, Kolodziejczyk, Siemieniuk y Skrzydlewska (2005) observaron una disminución de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, produciéndose a su vez una reducción drástica de los antioxidantes no enzimáticos disponibles. También se describió en este trabajo una relación muy estrecha entre los niveles de oxidación lipídica hepática y la aparición de marcadores de daño celular en hígado.

La búsqueda de sustancias alternativas a los antibióticos y antihelmínticos que permitan prevenir o reducir la incidencia de estas infecciones es de gran interés en un contexto en el que la utilización de antibióticos como promotores de crecimiento está muy limitado en animales destinados para consumo humano (Barton, 2000), como consecuencia del incremento de las resistencias de los patógenos a dichos fármacos. En este sentido, se ha constatado que la inclusión de taninos y otros compuestos fenólicos en la ración de animales durante la infección por helmintos permite reducir la carga parasitaria en ovejas y cabras (Kahn y Diaz-Hernandez, 1999; Osoro et al., 2007; Osoro et al., 2009).

#### *f) Acidosis ruminal y metabólica*

En el caso concreto de los rumiantes, la relación simbiótica existente entre estos animales y la población microbiana ruminal, capaz de digerir los polímeros de la pared celular de las plantas (Greathead, 2003), determina que la eficiencia del metabolismo ruminal pueda tener un gran efecto sobre la eficiencia del animal. Además, la eficiencia ruminal también es importante desde el punto de vista medioambiental puesto que puede contribuir a reducir la emisión de gases con efecto invernadero, como el metano (Bodas et al., 2012).

En este sentido, debemos destacar por su importancia en sistemas de cebo intensivo, el proceso patológico de la acidosis ruminal. La acidosis ruminal es un proceso derivado de la acumulación de ácidos grasos volátiles y ácido láctico en el

rumen (Nocek, 1997; Owens, Secrist, Hill y Gill, 1998). La acumulación de dichos compuestos, principalmente derivados del elevado consumo en carbohidratos fácilmente fermentables, hace descender el pH ruminal por debajo de los valores fisiológicos (Nocek, 1997; Dunlop y Hammond, 1965).

La alimentación con dietas muy ricas en concentrados altamente fermentables pueden ocasionar la superación de los límites de absorción ruminal, generando una acumulación de ácidos grasos volátiles en el rumen con el consecuente descenso del pH y la aparición de acidosis. A su vez estos cambios de pH modifican la microbiota ruminal, incrementando el crecimiento de las poblaciones de especies bacterianas productoras de ácido láctico (*Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium* y *Lactobacillus*), dicho compuesto es acumulado en el rumen descendiendo su pH (Slyter, 1976), y agravando la situación y provocando daños en el epitelio ruminal.

A su vez la acidez en el rumen da lugar al paso de hidrogeniones ( $H^+$ ) hacia la sangre, lo que puede derivar en una acidosis metabólica sistémica (descenso del pH sanguíneo) y estrés oxidativo (Mobbs, 2007) que puede incluso provocar la muerte del animal (Celi, 2011). Por tanto, la utilización de antioxidantes en la ración podría ayudar a compensar, en alguna medida, los trastornos derivados de esta situación. Apenas existen trabajos al respecto pero Fürll et al. (2003) observaron mejoras en vacas con desplazamiento abomasal cuando recibían un suplemento de ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocopherol, dicha patología se relaciona con la acidosis durante el puerperio.

No obstante numerosos compuestos fenólicos además de propiedades antioxidantes tienen a su vez cierta capacidad antimicrobiana, que podría contrarrestar los cambios que sufre la microbiota ruminal cuando los animales consumen dietas con un elevado contenido en cereales.

En este sentido, existe un gran número de estudios que han evaluado la actividad de saponinas, taninos y aceites esenciales sobre la microbiota ruminal in vitro. Davidson y Naidu (2000) describen que los compuestos fenólicos vegetales poseen un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias gram positivas, bacterias proteolíticas y protozoos (Wallace, McEwan, McIntosh, Teferedegne y Newbold, 2002; Hristov, Ivan, Neill y McAllister, 2003; Bhatta et al., 2009; Ando, Nishida, Ishida, Hosoda y Bayaru, 2003).

Wanapat, Cherdthong, Pakdee y Wanapat (2008) comprobaron que la suplementación con polvo de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) modificaba la población microbiana ruminal, de modo que se reducían considerablemente las poblaciones de bacterias proteolíticas *Ruminobacter amylophilus* y *Prevotella spp.* A su vez las poblaciones de protozoos tendían a disminuir.

## **5. Calidad de carne**

### **5.1 Concepto y composición de la carne**

La Real Academia de la Lengua Española define carne como: "*Parte muscular del cuerpo de los animales o alimento consistente en todo o parte del cuerpo de un animal*". Sin embargo desde el punto de vista de la tecnología alimentaria *músculo* y *carne* son conceptos distintos, ya que la carne es el producto obtenido como resultado de una serie de transformaciones físico-químicas producidas en el músculo *postmortem*.

La conversión del músculo en carne comienza con el fallo circulatorio, provocando el cese del aporte de oxígeno al músculo y, por tanto, dando lugar al cambio de la ruta glucolítica aerobia a la anaerobia, en la cual el piruvato se reduce a lactato y éste se acumula en forma de ácido láctico, provocando un descenso del pH de la carne. Al agotarse el glucógeno disponible comienza la rigidez muscular (*rigor mortis*), ya que para que exista relajación muscular se necesita ATP, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>. Al no disponer de glucógeno se produce un gran descenso del ATP disponible acompañado de una

liberación de calcio desde el retículo endoplasmático al espacio miofibrilar. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  se unen a la troponina, liberando la miosina que forma enlaces cruzados permanentes con los filamentos de actina, lo que genera el *rigor mortis*.

Tras las primeras 24h comienza el periodo de maduración de la carne; el pH baja y comienzan a actuar las proteasas (catepsinas y calpaína). En condiciones normales las catepsinas degradan la troponina-T, los enlaces de colágeno y los mucopolisacáridos del tejido conectivo, siendo las calpaínas las principales responsables de la maduración y consiguiente ablandamiento de la carne. De hecho, las calpaínas activadas por los iones  $\text{Ca}^{2+}$  (m-calpaínas entre 1-2mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\mu$ -calpaínas entre 50-100 $\mu\text{M}$ ) (Warriss, 2000) promueven la degradación de las líneas Z y de proteínas como la tropomiosina y la conectina.

Los músculos pueden ser clasificados de acuerdo con su metabolismo, su nivel de contractilidad y su color. No obstante, la clasificación más completa es la propuesta por Peter, Barnard, Edgerton, Gillespie y Stempel (1972), que combina la identificación histoquímica mediante niveles de oxidación y la actividad ATPasa de los tipos de fibras para dividir los músculos en:

Músculos oxidativos de contracción lenta: son músculos oxidativos debido a que dependen de la fosforilación oxidativa para obtener ATP, por lo que dicha generación de ATP es lenta. Estos músculos de acción lenta se componen, fundamentalmente, de fibras de tipo I caracterizadas por poseer un reducido número de miofibrillas que se agrupan en determinadas zonas, un sarcoplasma muy abundante y una elevada cantidad de mitocondrias y de gotas lipídicas. Además, debido a que este tipo de músculos requieren elevados niveles de oxígeno disponible, poseen gran cantidad de mioglobina que les permite almacenarlo, lo que les otorga un color rojo. Suelen ser músculos posturales (músculos del tronco) cuya actividad es continuada.

Músculos oxidativos-glucolíticos de contracción rápida y músculos glucolíticos de contracción rápida: los músculos glucolíticos no son tan ricos en mioglobina y tienen una apariencia más blanquecina, por lo que se les suele denominar músculos blancos; esto se debe a que estos músculos de acción rápida almacenan glucógeno en grandes cantidades y generan la mayoría de su ATP a través de reacciones glucolíticas anaerobias, mucho más rápidas que en el caso anterior. Son principalmente músculos relacionados con el movimiento, que necesitan contraerse con rapidez de manera repentina (ej. semitendinoso).

Ambos tipos de músculos se componen de fibras tipo II con gran abundancia de miofibrillas. Se caracterizan por poseer muy escaso contenido en mioglobina, sarcoplasma y mitocondrias. No obstante, se diferencian en que los músculos oxidativos-glucolíticos de contracción rápida se componen de Fibras IIA, las cuales obtienen la energía a partir tanto de la vía aerobia como de la vía anaerobia; mientras que los músculos glucolíticos de contracción rápida se componen de Fibras II-B en las cuales prácticamente sólo existe la vía anaerobia. Las Fibras II-B se fatigan rápidamente pues la cantidad de energía producida es baja, sus reservas escasas y la producción de sustancias residuales alta, mientras que las Fibras II-A tienen un comportamiento intermedio respecto a estas características.

Desde el punto de vista histológico, la carne está compuesta por fibras musculares (tal y como se acaba de mencionar), pero también por tejido conectivo, tejido adiposo, tejido vascular y nervioso.

El tejido conectivo provee de estructura al músculo. Es especialmente importante en este caso el colágeno, puesto que un incremento en su concentración puede provocar cambios en la textura de la carne. El tejido conectivo del músculo consiste en tres depósitos principales: epi-, peri- y endomisio. El epimisio es una capa muy fina que rodea al músculo pero es fácilmente separable de la carne y, por tanto, no afecta en gran medida a su calidad. Sin embargo, el perimisio (rodea los paquetes de

fibrillas musculares) y el endomisio que envuelve cada fibra y recubre la membrana basal, no pueden ser separados de la carne y pueden afectar a la textura final.

El tejido adiposo se divide en grasa intermuscular e intramuscular. La grasa intermuscular está situada entre músculos mientras que la intramuscular está formada por infiltraciones de grasa dentro del propio músculo. Además, los lípidos existentes pueden dividirse en lípidos estructurales (fosfolípidos, colesterol y una pequeña cantidad de esfingolípidos) que componen las membranas celulares y lípidos de almacenamiento (triglicéridos) que se encuentran formando parte de los adipocitos. Los adipocitos se pueden situar alrededor del músculo, asociados a la membrana de los paquetes fibrilares (depósitos intercelulares) o bien como gotitas dentro de las propias fibras musculares (depósitos intracelulares). Estos depósitos intracelulares poseen distintas proporciones de fosfolípidos y triglicéridos en función del grado de engrasamiento y son los principales responsables de factores organolépticos tan importantes como el flavor o la terniza de la carne.

Los tejidos vascular y nervioso, presentes en menor medida en la carne que los anteriores, son los encargados de irrigar y inervar el músculo del animal.

Desde el punto de vista químico la carne está compuesta básicamente de agua, proteínas, lípidos, minerales y vitaminas en composición y cantidad variable.

El agua es el componente mayoritario en la carne con un rango de valores que varía entre un 65 y un 80 % en carne de cordero dependiendo de factores como la edad del animal o su alimentación (Rodríguez, 2005). Su cantidad está inversamente correlacionada con la cantidad de grasa intramuscular (Swatland, 1991).

Las proteínas miofibrilares mayoritarias son la actina y la miosina (20-40% del total), junto con otras que, a pesar de encontrarse en menor cantidad (actinina, tropimiosina, tinina, desmina, troponina T...), también desempeñan un papel importante tanto en la estructura del sarcómero como en los procesos de maduración

(Prieto, 2006). Además, el colágeno es la proteína mayoritaria en el tejido conectivo, el cual ejerce un importante papel sobre las características de la textura. El porcentaje habitual de proteína en carne de cordero oscila entre 16-22% (Rodríguez, 2005)

La fracción lipídica, generalmente, es el componente más variable de la carne, ya que su contenido y composición dependen de factores tales como la especie, raza, edad, sexo y tipo de alimentación. En términos generales se ha descrito que la carne de cordero de cebo tiene entre un 3 y un 13 % de grasa total constituida principalmente por ácidos grasos saturados (mayoritariamente palmítico y esteárico) y monoinsaturados (fundamentalmente oleico) (Sañudo et al., 2000).

Los carbohidratos representan un bajo porcentaje del total de los componentes de la carne, principalmente debido a la escasa presencia del carbohidrato muscular mayoritario (glucógeno) tras la instauración el rigor mortis (Prieto, 2006).

Finalmente, en lo relativo a la presencia de minerales y vitaminas, la carne de cordero posee entre un 1 y un 3% de cenizas y es rica en hierro de fácil utilización, así como en sodio, potasio, y minerales traza (cobre y el selenio...). Desde el punto de vista nutricional, los minerales aportados por la carne reducen, entre otras patologías, la incidencia de anemias ferropénicas (Neale, 1992). Respecto a las vitaminas, es muy rica en vitaminas hidrosolubles (mayoritariamente B1, B2, B3, B6 y B12).

## **5.2 La calidad de la carne y el efecto de la oxidación**

La Real Academia de la Lengua define *calidad* como: “*La propiedad o conjunto de propiedades inherentes a algo, que permiten juzgar su valor*”. Puesto que el valor en este caso lo aplica el consumidor también se define como: “*Aquello que gusta al consumidor y por lo que está dispuesto a pagar más que el precio medio*” (Hammond, 1955). La calidad, por tanto, es un término subjetivo al variar con los gustos individuales, relativo puesto que depende de la situación de la persona en el momento del juicio y

dinámico ya que varía en el espacio y en el tiempo en función de lo que le gusta al público (Naumann, 1965).

En la actualidad la calidad de la carne se divide y analiza en función de las siguientes características: nutricionales, tecnológicas, organolépticas e higiénico-sanitarias (Badiani et al., 1998). Dichas características pueden ser modificadas por diversos parámetros, entre ellos la oxidación. De hecho, los cambios bioquímicos producidos tras la muerte del animal para la conversión del músculo en carne provocan una rápida ruptura de la balanza prooxidantes/antioxidantes a favor de los prooxidantes (Morrissey et al., 1998; Morrissey y Kerry, 2010). Hay otros factores que también potencian la oxidación lipídica de la carne como, por ejemplo, el periodo de almacenamiento o el tipo de cocinado y que pueden afectar negativamente al flavor, color, textura y valor nutritivo o provocar la aparición de compuestos tóxicos en carne (Liu, Lanari y Schaefer, 1995), tal y como se expone a continuación.

#### *a) Características nutricionales*

El análisis de la composición química tiene gran importancia, ya que permite establecer con exactitud la calidad nutritiva de la carne, además de estar íntimamente relacionada con las características tecnológicas, higiénicas y organolépticas finales de este producto.

Agua. La retención de este componente después del cocinado de la carne afecta a la textura y a parámetros sensoriales importantes (p. ej., jugosidad). Sin embargo, la oxidación de las proteínas durante el almacenado o el cocinado determina que se pierda parte del agua, lo que provoca que el consumidor perciba la carne como seca (Lund, Heinonen, Baron y Estevez, 2011).

Proteína. La proteína es el componente nutritivo más importante de la carne debido a la relación de aminoácidos que posee y a su buena disponibilidad para el ser humano. No obstante, la oxidación proteica limita la biodisponibilidad de



aminoácidos esenciales para el ser humano como son la fenilalanina y el triptófano (Davies, 1987). Además, el colágeno y su solubilidad determinan en gran medida la textura final de la carne (Lepetit, 2008).

Lípidos. En concreto, la carne de cordero posee un ratio entre ácidos grasos poliinsaturados y ácidos grasos saturados desfavorable cuando se compara con carne de monogástricos. Sin embargo, esta característica podría reducir la susceptibilidad de este producto a los procesos de oxidación, ya que son precisamente los ácidos grasos poliinsaturados los componentes más susceptibles a este fenómeno. Sin embargo, el ratio entre ácidos grasos omega-6 y omega-3 es favorable, en comparación con otras carnes menos grasas como el cerdo o la ternera.

Minerales y vitaminas. En relación con la oxidación, muchas vitaminas juegan un importante papel como antioxidantes no enzimáticos, mientras que los minerales son cofactores de enzimas antioxidantes, pero también pueden actuar como catalizadores de la oxidación y, por tanto, actuar como prooxidantes.

#### *b) Características tecnológicas*

La calidad tecnológica de la carne está determinada por la aptitud para la transformación y la conservación de este producto. En general, esta aptitud viene dada por un único atributo post-mortem: el pH. No obstante, también se suele considerar la capacidad de retención de agua puesto que este parámetro depende directamente de los cambios de pH durante la transformación del músculo en carne.

#### pH

Tal y como se ha comentado con anterioridad, con la muerte del animal cesa el aporte de oxígeno al músculo, y este debe utilizar sus reservas de energía para sintetizar ATP con el fin de mantener su estructura. Conforme se agota el ATP aparece fosfato inorgánico que a su vez estimula la glucólisis anaerobia. Como

consecuencia se forma ácido láctico y otros ácidos inorgánicos que generan el descenso del pH muscular hasta agotar las reservas de glucógeno o hasta la inactivación de las enzimas celulares (Lawrie, 1983). Generalmente el pH muscular está comprendido entre 7,08 y 7,30 mientras que el pH 24h *post mortem* en el músculo de referencia (*longissimus dorsi*) de ovino se sitúa entre los 5,46 y 5,48 (Sen, Santra y Karim, 2004).

En general, el pH no se ve afectado por los niveles de oxidación ni viceversa salvo en algunas condiciones como en carnes PSE (*pale, soft and exudative*). De hecho, O'Neill, Lynch, Troy, Buckley y Kerry (2003) encontraron que el jamón cocido procedente de carne PSE se oxidaba más y en mayor proporción que la carne con un pH normal.

#### Capacidad de retención de agua (CRA)

Parte del agua de la carne se pierde por evaporación durante el enfriamiento o por goteo tras el sacrificio. El agua que queda al final de esta fase, y a la cual se denomina humedad, se clasifica de la siguiente forma (Honikel y Hamm, 1999): a) el agua de constitución (0,1% del agua total), que se localiza entre las moléculas proteicas, b) el agua de interfase (10-15% del agua total), que está unida a la superficie de las proteínas generando varias capas, c) el agua de relleno o agua celular (90-95% del agua total), que es un agua libre, si bien su movimiento se rige por la atracción que ejercen sobre ella las proteínas. En todo caso, la capacidad de retención de agua de la carne se refiere exclusivamente al agua de relleno o celular.

El agua más fácil de extraer simplemente por gravedad o evaporación, originando el llamado "*drip loss*" o "pérdida por goteo" (Honikel y Hamm, 1999). Al aplicar fuerza sobre el sistema, parte del agua inmovilizada se libera como agua perdida. Esta agua liberada es lo que denominamos CRA por presión y está relacionada con la capacidad de las proteínas de ligar el agua (Grau y Hamm, 1953). En las "pérdidas

por cocinado", además, se tienen en cuenta las pérdidas por rotura de la membrana celular y por modificaciones de la estructura tridimensional de las proteínas.

La capacidad de retención de agua se ve claramente afectada por la oxidación lipídica, ya que dicho proceso provoca modificaciones de la fluidez, permeabilidad y estabilidad de la membrana celular como consecuencia de la oxidación de los fosfolípidos y el colesterol que forman la membrana celular (Guardiola, Codony, Addis, Rafecas y Boatella, 1996). Por otra parte, la oxidación de las proteínas situadas en la membrana celular también es causante de la reducción de la capacidad de retención de agua (Liu, Xiong y Chen, 2010; Lund, Lametsch, Hviid, Jensen y Skibsted, 2007; Xiong, Decker, Faustman y Lopez-Bote, 2000; Lund et al., 2011).

### *c) Características sensoriales u organolépticas*

Las características sensoriales u organolépticas son aquellas percibidas por los sentidos del consumidor y están relacionadas principalmente con los atributos de apariencia (color), flavor (olor y sabor) y textura (terneza, jugosidad, viscosidad).

#### Color

La CIE, (1986) define el color percibido "*como el atributo visual que se compone de una combinación cualquiera de contenidos cromáticos y acromáticos*". Para su valoración se utiliza la metodología CIELAB que mide el color de tal manera que el espacio del espectro visible se divide en los ejes cartesianos x, y, z los cuales se corresponden con los valores L\* (blanco-negro), a\* (rojo-verde) y b\* (amarillo-azul). Estos valores, a su vez, sirven para calcular los siguientes parámetros de color: luminosidad (L\*), tono (Hue) y saturación (Chroma).

El color es, sin duda, uno de los factores determinantes para el consumidor a la hora de seleccionar un producto cárnico. Habitualmente el consumidor valora positivamente una carne de color homogéneo, ni pálida ni oscura (Melton, Huffman,

Shogren y Fox, 1996), y relaciona el color rojo brillante con la frescura del producto (Dransfield, Zamora y Bayle, 1998). No obstante, es necesario precisar que en muchas ocasiones la elección del producto atendiendo al color no está relacionada con la calidad sino con la predilección personal.

El color de la carne es uno de los parámetros más afectados por la oxidación ya que depende en gran medida de la cantidad de mioglobina y de su estado de oxidación, aunque también influyen en menor medida la hemoglobina y el citocromo C (Mancini y Hunt, 2005). La mioglobina es una hemoproteína muscular encargada de almacenar oxígeno y capaz de aportar pigmentación a la carne. Estructuralmente está compuesta por una parte proteica unida a un grupo hemo con un átomo de hierro capaz de oxidarse o reducirse, En la superficie de la carne, suele encontrarse en forma de oximioglobina (oxigenada), lo que genera el color rojo brillante, pero puede oxidarse ( $Fe^{3+}$ ), dando lugar a una coloración parda (metamioglobina) o reducirse creando una coloración purpúrea (deoximioglobina) (Broudman, Ball y Stier, 1958). La proporción en la que se encuentran cada una de estas formas de la mioglobina en la carne da lugar al color final y a su evolución durante el almacenamiento, lo que es de gran importancia a nivel comercial. Así, radicales libres producidos durante el almacenamiento de la carne promueven la oxidación de los pigmentos (Gray, Goma y Buckley, 1996), dando lugar a la aparición de tonos marrones y verdes (metamioglobina). Si la proporción de metamioglobina supera el 30-40% del total de pigmentos hemínicos, la apariencia de la carne provoca el rechazo por parte del consumidor (Carpenter, Cornforth y Whittier, 2001). Además, a causa del incremento en la oxidación lipídica se produce una disminución del índice de saturación del color (Chroma) provocando la sensación de decoloración de la carne (McKenna et al., 2005).

## Textura

La textura es una cualidad sensorial de gran importancia para el consumidor, que la considera como la característica organoléptica más importante en la carne (Tornberg, 1996). Szczesniak, (1963) definió la textura como: *“Manifestación sensorial de la estructura del alimento y la forma en que esta estructura reacciona frente a la aplicación de fuerzas”*. La textura durante la masticación se valora atendiendo principalmente a tres factores: facilidad de la penetración de los dientes, facilidad de la fragmentación de la carne y cantidad de residuo generado al término de la masticación (Weir, 1960).

Los cambios provocados por la oxidación sobre la capacidad de retención de agua derivan principalmente en un deterioro de la jugosidad y la ternura de la carne, por lo que aquellos aspectos que afectan a este factor también inducen cambios en la textura. Además, la oxidación proteica ocasiona pérdidas de funcionalidad relacionadas con la gelatinización y emulsificación del colágeno, que también están relacionadas con modificaciones de la textura de la carne (Babji, Chin, Sen Chempaka y Alina, 1998).

Por otro lado la oxidación puede provocar la inactivación de la enzima  $\mu$ -calpaína reduciendo la proteólisis (Rowe, Maddock, Lonergan y Huff-Lonergan, 2004; Kim, Lonergan y Huff-Lonergan, 2010), o causar la formación de uniones entre entidades proteicas, lo que da lugar a un fortalecimiento de la estructura de la miofibrilla (Lund et al., 2007; Kim, Huff-Lonergan, Sebranek y Lonergan, 2010). En cualquier caso ambos mecanismos de acción provocan cambios indeseables en la textura de la carne como la pérdida de jugosidad o la disminución de la ternura de la carne (Wolff y Dean, 1986).

## Flavor

El flavor puede definirse como una cualidad organosensorial que resulta de la combinación de gusto y olor. La carne cruda posee generalmente un sabor salado,

metálico y sangriento con un gusto dulce. Sin embargo, el cocinado libera diversos precursores volátiles que dan lugar al flavor característico de cada tipo de carne. Básicamente los compuestos volátiles responsables del flavor en carne cocinada se forman mediante dos grupos de reacciones químicas: la reacción de Maillard (que forma compuestos hidrosolubles) y la degradación de lípidos (compuestos carbonílicos), siendo mayoritaria esta última.

En general la valoración del flavor inicial, si bien es útil para conocer si la alimentación animal produce sabores específicos no deseados en carne, no es tan importante como el estudio de los compuestos volátiles relacionados con la rancidez que surgen con motivo de la oxidación durante el almacenamiento. Al comienzo de la oxidación lipídica aparecen los hidroperóxidos, que son inodoros, pero la descomposición de los radicales alcoxilo da lugar a la formación de compuestos hidrocarbonados, aldehídos y alcoholes volátiles que son los responsables de la aparición de sabores desagradables en carne (Frankel, 1983). Dentro de estos compuestos hay que hacer especial referencia a los aldehídos, debido a su bajo umbral de percepción (Gray y Monahan, 1992). Es por ello que muchos autores utilizan la producción del aldehído más común en carne, el hexanal, como indicador del estado de oxidación lipídica de este producto (Shahidi y Pegg, 1994).

#### *d) Calidad higiénico-sanitaria*

Entendemos por calidad higiénica de la carne aquellas propiedades que aseguran su inocuidad y salubridad, especialmente en lo que se refiere a contaminación microbiana. La carne es un medio de cultivo excelente para muchos tipos de microorganismos. Es por ello que los agentes microbianos son, sin duda, una de las principales causas de deterioro de la carne y, por tanto, de la reducción de su periodo de vida útil (tiempo transcurrido desde su producción hasta que sus características se transforman en inaceptables). Además, a nivel comercial altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados implican una mayor oxidación lipídica, lo que también se

traduce en una reducción de la vida útil de la carne. En este caso podemos decir que los factores de oxidación y contaminación microbiana están interrelacionados puesto que la oxidación provoca rupturas que ayudan a los microorganismos a colonizar la carne y, a su vez, el deterioro microbiano también provoca una mayor exposición de las estructuras celulares a las ROS, por lo que incrementa la oxidación.

No obstante, el consumidor busca carnes “sanas” lo que se traduce en una carne con un bajo contenido en grasa y colesterol y con una proporción mayoritaria de ácidos grasos insaturados (Grundy y Denke, 1990; Grundy y Vega, 1988; Kris-Etherton et al., 1988). Esto se debe a que los ácidos grasos saturados se han relacionado principalmente con el desarrollo de problemas cardiovasculares. En lo relativo al colesterol, dado que es un componente estructural de las membranas celulares, parece complicado reducir su concentración en la carne. Una estrategia diferente podría ser limitar la oxidación que se produce de este compuesto durante el almacenado y cocinado de la carne, ya que parece que son precisamente los óxidos de colesterol (COPs), que se absorben a nivel intestinal en forma de quilomicrones (Emanuel, Hassel, Addis, Bergmann y Zavoral, 1991), los que actúan como agentes proaterogénicos, mutagénicos, carcinogénicos y citotóxicos (Addis, Emanuel, Bergmann y Zavoral, 1989; Guardiola, Codony, Addis, Rafecas y Boatella, 1996).

Entre todos estos efectos destaca la aterosclerosis, proceso inflamatorio crónico a nivel de la pared arterial cuyas consecuencias clínicas (enfermedad cardíaca coronaria y accidente cerebrovascular) son las principales causas de muerte no sólo en los países desarrollados, sino también en países con ingresos medios o bajos (Mathers y Loncar, 2006). La etiología de esta enfermedad es consecuencia de una lesión en el endotelio vascular, lo que reduce su capacidad de actuar como barrera y permite la penetración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y plaquetas. A su vez se liberan factores de crecimiento que inducen la proliferación y migración de células del músculo liso subintimal hacia el endotelio en el área afectada. A esta área del endotelio vascular se unen los monocitos circulantes, y estos se diferencian a

macrófagos que activan la respuesta inflamatoria y provocan la formación de células espumosas que conducen a la formación de la placa de ateroma (Ross, 1986).

El inicio del proceso no se conoce a ciencia cierta, pero una de las hipótesis relaciona el daño inicial con la acción de los COPs puesto que debido a sus propiedades son capaces de aumentar la permeabilidad del endotelio vascular (Ramasamy, Boissonneault y Hennig, 1992) permitiendo la penetración de LDL en la pared vascular (Boissonneault et al., 1991; Boissonneault, Hennig y Ouyang, 1991). Además, los COPs inhiben la síntesis de la prostaglandina prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) responsable de la integridad del endotelio vascular, ya que evita la formación de agregaciones plaquetarias (Peng, Hu, Peng y Morin, 1993). Los COPs (especialmente el 7-cetocolesterol, el colestaneetriol y el 25-hidroxicolesterol) actúan como citotóxicos (Vejux y Lizard, 2009) produciendo en el músculo liso de la pared lesiones ateroscleróticas (Hodis et al., 1994; Hughes, Mathews, Lenz y Guyton, 1994; Peng, Taylor, Hill y Morin, 1985; Taylor y Peng, 1985). Por último, también se ha observado que los COPs son capaces de modificar la funcionalidad de los receptores de membrana de LDL, dando lugar a un incremento de la acumulación de LDL en macrófagos y fibroblastos (Peng et al., 1985; Smith y Johnson, 1989; Taylor, Peng, Werthessen, Tham y Lee, 1979; Fornas, Martinez-Sales, Camanas y Baguena, 1984; Lorenzo, Allorio, Bernini, Corsini y Fumagalli, 1987). En consecuencia, implementar estrategias que permitan limitar la presencia de COPs en carne podría ser importante.

### **5.3 Factores que afectan a la oxidación**

Desarrollar estrategias destinadas a reducir la oxidación de la carne exige conocer los factores implicados. A este respecto, la oxidación de la carne depende, por una parte, de factores inherentes al animal y, por otra, de factores relacionados con su manejo y procesamiento.



### 5.3.1 Factores ante-mortem y perimortem

#### *a) Genética*

En monogástricos el perfil lipídico de la dieta refleja fielmente los cambios que se producen a nivel de carne (Erickson, 2008). En el caso de los rumiantes, excepto cuando se administran grasas protegidas “by pass”, esta relación no es tan directa puesto que en el rumen las bacterias ruminales provocan la biohidrogenación lipídica de las grasas insaturadas (Doreau y Ferlay, 1994), lo que ocasiona que la grasa de la carne se encuentre más saturada y que, por tanto, la carne de rumiantes presente una menor predisposición a sufrir procesos de oxidación en comparación con la de monogástricos (Park y Addis, 1987).

Otro de los factores que aumenta la susceptibilidad de la carne a la oxidación lipídica es la raza. Es bien conocido que en las razas precoces la deposición de grasa se produce de forma más temprana; así, por ejemplo, Beriain et al., (2000) observaron que, a igual tiempo de sacrificio, las ovejas de raza Lacha mostraban niveles más bajos de grasa intramuscular y proteína y niveles más altos de agua que la raza Rasa Aragonesa. Además, los valores de PUFA en la grasa subcutánea fueron más elevados en la raza Lacha pero no en la intramuscular. En consonancia, diversos autores (Wood et al., 2008; Fisher et al., 2000) afirman que aquellas razas o variedades genotípicas que presentan una menor concentración de lípidos totales en músculo suelen poseer una proporción de fosfolípidos más elevada que el resto, lo que da lugar a una carne más rica en PUFAs y por tanto más fácilmente oxidable. Por otro lado, dentro de la propia raza, también existen diferencias individuales, por ejemplo, a nivel de grasa intramuscular en ovejas que presentan la mutación A103G en el gen que codifica para la leptina (Boucher, Palin, Castonguay, Garipey y Pothier, 2006).

La proporción de mioglobina en carne y, por tanto, la disponibilidad de un mayor número de grupos hemo, está directamente relacionada con un mayor potencial

oxidativo. En este sentido, diversos autores han observado que, al igual que en el caso de la composición química, el color y, por tanto, la proporción de mioglobina de la carne de bovino es distinto entre los diferentes tipos genéticos en función principalmente de su grado de precocidad (Boccard y Bordes, 1986). Sin embargo, los estudios de los que disponemos en ovino no han mostrado diferencias importantes en el color de la carne entre razas precoces y tardías (Beriaín et al., 2000). En cuanto a la aptitud productiva, las razas de carne han sido seleccionadas por su muscularidad por lo que suelen presentar un mayor desarrollo de las fibras blancas (West, 1974).

Por otra parte, aunque existen estudios en pollos y cerdos que describen diferencias entre razas en lo que se refiere a la expresión y actividad génica de las enzimas encargadas del mantenimiento del equilibrio antioxidante/prooxidante en músculo (Azim y Farahat, 2009; Hernández, Zomeno, Ariño y Blasco, 2004), no se han encontrado datos al respecto en ovino.

#### *b) Sexo*

El sexo puede influir en la proporción de grasa y su perfil lipídico. Así, por ejemplo, Horcada, Beriaín, Purroy, Lizaso y Chasco, (1998) encontraron que las hembras de ovino presentaban un mayor contenido de grasa intramuscular que los machos, sin diferencias en el perfil lipídico. Sin embargo, Sañudo et al. (1998) observaron que las hembras presentaban en grasa subcutánea un porcentaje de ácidos grasos insaturados superior al de los machos. Así Tuluze y Celik (2006) observaron que la carne de las hembras de ovino generalmente presenta una mayor concentración de grasa con un contenido más elevado en PUFAs, por lo que podría mostrar una mayor tendencia a la oxidación .

#### *c) Edad y peso al sacrificio*

La edad y el peso al sacrificio también influyen en la oxidación lipídica de la carne, ya que son factores que afectan a la proporción, distribución y perfil lipídico de la

grasa. Martínez-Cerezos et al. (2002) observaron que el porcentaje de grasa se incrementaba de manera significativa con el peso al sacrificio. Esto se debe a que, a medida que se incrementa el peso del animal, también aumenta la proporción de grasa infiltrada en músculo (Keane y Allen, 1999; Nürnberg, Wegner y Ender, 1998; Pérez, Maino, Tomic, Mardones y Pokniak, 2002).

El aumento de peso y la edad del animal provocan un incremento del tamaño de las fibras musculares y de la concentración de mioglobina de las mismas (Jacobs, Field, Botkin, Riley y Roehrkasse, 1972). En consonancia, Sañudo, Santolaria, María, Osorio y Sierra (1996) encontraron que, en corderos de raza Rasa Aragonesa, los valores de  $a^*$  (carne más roja) se incrementaban al hacerlo el peso al sacrificio. Sin embargo, otros experimentos similares no han mostrado diferencias significativas en los niveles de  $a^*$  atribuibles al peso al sacrificio (Vergara, Molina y Gallego, 1999). Cabe señalar que a la corta edad y peso al cual los corderos son sacrificados en países mediterráneos las diferencias en el color de la carne debido al aumento del peso del animal podrían no ser importantes.

Un caso especial es el caso de los corderos lechales, puesto que durante este periodo los corderos son considerados prerrumiantes y, por ello, tanto las características de la canal como las estrategias frente a la oxidación que se pueden desarrollar en este tipo de corderos deben ser específicamente estudiadas.

#### *d) Tipo de músculo*

Los músculos oxidativos poseen un alto contenido en mioglobina (suelen denominarse músculos rojos). Por otro lado, debido a su tipo de metabolismo, disponen de un gran número de mitocondrias, las cuales tienen membranas fosfolípídicas (elevado porcentaje de PUFAs) con una mayor tendencia a la oxidación en comparación con los músculos glucolíticos.

Además, podrían existir diferencias en función del músculo en lo que respecta al nivel de actividad de las enzimas antioxidantes endógenas, así como en los niveles de antioxidantes endógenos no enzimáticos (p. ej., la vitamina E) (Devore, 1982; Renner, Dumont y Gatellier, 1996; Renner, Poncet, Mercier, Gatellier y Métro, 1999). No obstante, estos aspectos no se han estudiado en profundidad en el caso de la especie ovina.

#### *e) Alimentación*

La alimentación es el factor que afecta en mayor medida a la proporción de grasa del animal y a su perfil de ácidos grasos, y por tanto es uno de los factores que genera un mayor impacto sobre la oxidación. No obstante, a pesar de que un incremento en la saturación o bien una reducción de la presencia de grasas poliinsaturadas podría mejorar la estabilidad oxidativa de la carne, el consumo de ácidos grasos saturados se relaciona con una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares (Givens, 2005) por lo que nos encontramos ante un dilema. Actualmente parece que la solución a este dilema sería incrementar a nivel de la carne el contenido en ácidos grasos monoinsaturados, puesto que son mucho más estables que los poliinsaturados (Nawar, 1996), sin ser considerados especialmente aterogénicos o perjudiciales para la salud del consumidor (Kritchevsky, 2002).

Entre los factores relacionados con la alimentación podemos destacar en primer lugar la relación forraje: concentrado. Una dieta rica en forraje da lugar a una carne con un mayor contenido en PUFAs (Bessa, Portugal, Mendes y Santos-Silva, 2005; Elmore et al., 2005; Enser et al., 1998) y en pigmentos hemínicos (más oscura) susceptibles de oxidarse (Díaz et al., 2002), en relación con la carne procedente de animales alimentados con dietas concentradas. Sin embargo, a pesar de causar este incremento del sustrato de oxidación y de los catalizadores, las dietas ricas en forrajes frescos y henos de hierba o alfalfa son particularmente abundantes en antioxidantes, tanto vitamínicos como procedentes de fitoquímicos (carotenoides,

flavonoides, compuestos fenólicos...) (Daly, Young, Graafhuis, Moorhead y Easton, 1999; Gatellier, Mercier y Renerre, 2004; Wood y Enser, 1997), que ejercen un importante papel estabilizador. Además, Gatellier et al. (2004) observaron que la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa se veía incrementada en animales que consumían dietas basadas en pasto.

Puede existir, además, cierta relación entre el consumo de fenoles y el grado de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados en rumen, de manera que el consumo de compuestos fenólicos parece incrementar la deposición de ácidos grasos insaturados (Vasta et al., 2009).

El empleo de suplementos lipídicos con un elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados también puede modificar el perfil de ácidos grasos, aunque en menor magnitud que en especies monogástricas (Wood et al., 2004). En este sentido, en corderos lechales es relativamente sencillo modificar el perfil de ácidos grasos a través de la alimentación.

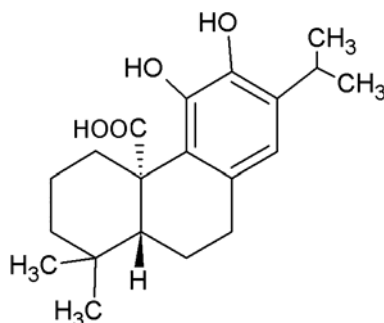
A pesar de ello Osorio, Zumalacárregui, Cabeza, Figueira y Mateo (2008) observaron que debido a la riqueza en antioxidantes incluidos en los lactorreemplazantes comerciales (habitualmente BHT y vitamina E) la carne de los corderos sometidos a lactancia artificial tenía una mayor estabilidad oxidativa.

Existe un gran número de estudios que indican que la oxidación lipídica en carne y productos derivados puede ser controlada o minimizada mediante la inclusión de antioxidantes (p. ej., vitamina E) en la ración de los animales (Cannon et al., 1996; Jensen et al., 1998; Kasapidou et al., 2012; Liu et al., 1995; Ripoll, Joy y Muñoz, 2011). A este respecto, existen estudios sobre las propiedades antioxidantes del romero incluido en la ración de animales de producción en forma de hojas de romero o bien como subproductos de dicha planta, en los que se han observado mejorías en la calidad y vida útil de carne en pavo y pollo (Botsoglou, Govaris, Giannenas,

Botsoglou y Papageorgiou, 2007; Botsoglou et al., 2002), ternera (O'Grady et al., 2006) y cordero (Nieto, Estrada, Jordán, Garrido y Bañón, 2011; Nieto et al., 2010; Bañón, Méndez y Almela, 2012; G. Nieto et al., 2008; Moñino et al., 2008).

A su vez la administración de un destilado obtenido a partir de hojas de romero a ovejas lactantes provocó una mayor estabilidad del índice de rojo ( $a^*$ ) en la carne de corderos lechales, una reducción de la presencia de metamioglobina tras 14 días de almacenamiento (Nieto et al., 2010) y una reducción de sabores relacionados con el enranciamiento (Nieto et al., 2011). Dichos efectos sobre el estatus antioxidante y la calidad de la carne han sido tradicionalmente atribuidos a los componentes de mayor actividad antioxidante in vitro del romero: el ácido carnósico y el ácido rosmarínico (Frankel, Huang, Aeschbach y Prior, 1996). En la actualidad se sabe que el ácido carnósico (Figura 4) es el compuesto que contribuiría en más del 90% a la capacidad antioxidante de esta planta (Erkan, Ayranci y Ayranci, 2008). Además, se ha comprobado que el principal compuesto fenólico acumulado en carne tras el consumo de romero es el ácido carnósico (Moñino et al., 2008). Por tanto, es lógico pensar que la mejora de la estabilidad oxidativa de la carne observada en animales alimentados con romero se deba a la acumulación de este compuesto a nivel muscular. No obstante, es importante tener en cuenta que la concentración de antioxidantes naturales varía dentro de la planta y entre diferentes plantas de la misma especie, sobre todo en función de las condiciones ambientales en las cuales se han desarrollado (Munné-Bosch, Mueller, Schwarz y Alegre, 2001). Por tanto, dado que los estudios existentes han empleado hoja de romero o diversos subproductos en la alimentación de los animales, es preciso llevar a cabo estudios encaminados a cuantificar la cantidad de ácido carnósico óptima que hay que incluir en la ración de los animales para conseguir el efecto deseado a nivel de la carne.

Figura 4: Estructura química del ácido carnósico.



Por último, merece la pena señalar que la suplementación con hojas de romero parece limitar el deterioro debido a la contaminación microbiana de la carne (Bañón et al., 2012; Nieto et al., 2010), efecto que algunos autores atribuyen a los componentes antioxidantes de origen fenólico (Raccach, 1984) y otros al contenido en antimicóticos y antimicrobianos como  $\alpha$ -pineno, bornilacetato, alcanfor y 1,8-cineol (Pintore et al., 2002; Daferera, Ziogas y Polissiou, 2000).

*f) Bienestar animal: estrés y manipulación pre-sacrificio*

El manejo de los animales previo al sacrificio (condiciones de transporte y manejo o tipo de sacrificio) puede tener importantes repercusiones sobre la vida útil de la carne y el enranciamiento en los productos cárnicos derivados (Juncher et al., 2001; Juncher et al., 2003). Diversos estudios, principalmente en la especie porcina, demuestran que factores cercanos al sacrificio como el manejo de los animales (Terlouw, 2005), la duración y densidad de animales durante el transporte (Mota-Rojas et al., 2006) afectan al estrés sufrido por los animales y, por tanto, a diversos parámetros relacionados con la calidad de la carne (pH, CRA...). De la misma forma, Linares, Berruga, Bórnez y Vergara (2007) y Sanchez y Alfonso (1998) demostraron que la manipulación y la técnica de aturdimiento utilizada para el sacrificio pueden modificar la estabilidad oxidativa en carne de cordero.

El estrés que sufren los animales durante el sacrificio está directamente relacionado con niveles de oxidación de la carne más altos (McClelland, 2004) y, por tanto, con una menor calidad de carne (Neville, 1999). De hecho, las condiciones que rodean al sacrificio, como el estrés, afectan de manera importante a la evolución del pH tras el sacrificio (Cañeque y Sañudo, 2005), presentándose en ocasiones dos tipos de carne poco aceptables para el consumo: las carnes PSE (*pale, soft and exudative*) y las DFD (*dark, firm and dry*), las primeras se producen en el sacrificio de animales de la especie porcina, concretamente en animales que han sido estresados previamente al sacrificio, dando lugar a una glucólisis postmortem acelerada que hace descender demasiado rápido el pH y origina carnes pálidas, blandas y exudativas, más susceptibles de sufrir altos grados de oxidación lipídica (O'Neill et al., 2003). Por el contrario, las carnes DFD (*dark, firm and dry*) son obtenidas de animales que han realizado grandes esfuerzos o ejercicio previamente al sacrificio, por lo que los niveles de glucólisis postmortem son tan bajos que se produce muy poco ácido láctico, originando un pH final elevado que da lugar a carnes oscuras, duras, secas y fácilmente colonizables por microorganismos, aunque muy resistentes a la oxidación (Ahn, Nam, Du y Jo, 2001).

El método de aturdimiento por el cual los animales han sido sacrificados también ha mostrado diferencias en lo que al estado oxidativo de la carne se refiere. Así, en corderos aturridos con CO<sub>2</sub>, en comparación con otros métodos habituales, se obtiene una carne con una vida útil más larga, seguramente debido a que se provoca una hipoxia en los tejidos y, por tanto, la menor presencia de oxígeno retrasa el proceso oxidativo (Linares et al., 2007).

### **5.3.2 Factores post-mortem**

Como se señaló anteriormente, los cambios bioquímicos producidos tras la conversión del músculo en carne provocan un desequilibrio en la balanza prooxidantes/antioxidantes, a favor de los primeros (Morrissey et al., 1998; Morrissey



y Kerry, 2010). Además, otros aspectos como, por ejemplo, la manipulación postmortem, así como el periodo y las condiciones de almacenamiento influyen de manera muy importante en los niveles de oxidación lipídica de la carne (Liu et al., 1995), tal y como se expone a continuación.

*a) Procesado de la carne*

Procesos como el deshuesado, fileteado, troceado o picado incrementan la superficie de exposición de la carne al oxígeno y, por tanto, los niveles de oxidación lipídica durante el almacenamiento (Decker y Xu, 1998).

*b) Exposición a la luz*

De la misma forma, un alto nivel de exposición a la luz durante el almacenado también parece ser un factor que afecta a la calidad de la carne debido al efecto de foto-oxidación (Luby, Gray, Harte y Ryan, 2006), especialmente a nivel de la superficie más expuesta (Hur, Park y Joo, 2007). Por tanto, la simple utilización de una barrera que limite la exposición a la luz, como el papel de aluminio, ayuda a prevenir la oxidación de la carne (Hur et al., 2007). De la misma forma, la irradiación con luz UV o rayos  $\gamma$  como tratamiento para inhibir la proliferación microbiana en carne y derivados aumenta la oxidación lipídica puesto que genera radicales e iones, principalmente por fotólisis de agua (Hwang y Maerker, 1993a; Hwang y Maerker, 1993b; Maerker y Jones, 1993). Por esta razón, no es un tratamiento recomendado cuando el objetivo final es reducir los niveles de oxidación lipídica.

*c) Envasado*

Las condiciones de envasado durante el almacenamiento son claves en el nivel de oxidación final que alcanza la carne. En este sentido, diversas metodologías de envasado que reducen tanto la disponibilidad de oxígeno en contacto con la carne como su exposición a la luz pueden limitar la oxidación de la carne y alargar su vida útil. El envasado al vacío es el sistema más efectivo en el control de la oxidación

lipídica puesto que elimina por completo la presencia de oxígeno en contacto con la carne, limitando la aparición de óxidos lipídicos (Berruga, Vergara y Gallego, 2005) y COPs, tanto en carne cruda como cocinada (Conchillo, Ansorena y Astiasaran, 2003; Conchillo, Ansorena y Astiasarán, 2005). Sin embargo, es menos útil que las atmósferas modificadas en el control de la contaminación microbiana (Berruga et al., 2005).

El almacenamiento de la carne en atmósferas modificadas (MAP) suele realizarse en presencia de oxígeno, llegando a un 60% en el caso de la carne de ternera con el fin de mantener la mioglobina en su estado de oximioglobina, que aporta un color rojo brillante a la carne, atractivo para el consumidor que adquiere el producto (Jeremiah, 2001). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que en el caso de la carne de cordero se pueden utilizar altas proporciones de CO<sub>2</sub> y bajas proporciones de O<sub>2</sub> manteniendo un color aceptable (Vergara y Gallego, 2001). Este tipo de atmósferas con bajos porcentajes de oxígeno permiten evitar los problemas derivados de la utilización de MAP ricas en O<sub>2</sub>, que incrementan la oxidación lipídica. A su vez este tipo de atmósferas suelen tener en su composición CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> que actúan como inhibidores del crecimiento bacteriano, haciendo de este tipo de envasado un sistema muy eficaz para limitar las dos causas principales del acortamiento de la vida útil (Berruga et al., 2005).

#### *d) Temperatura de almacenado*

Por otra parte, la temperatura de almacenamiento es un factor clave en el desarrollo de la oxidación lipídica. De hecho, Nawar (1996) confirmó que existe una clara relación entre temperatura de almacenamiento e incremento de reacción de las ROS sobre los lípidos. Experimentos realizados con salchichas demostraron que la presencia de COPs era significativamente más baja cuando este producto se almacenaba a 4º C en comparación con las que se habían mantenido a 15ºC (Wang, Jiang y Lin, 1995; Maca, Miller, Bigner, Lucia y Acuff, 1999). Además, Conchillo et al.,

(2005) demostraron que los niveles de COPs eran significativamente inferiores en carne almacenada congelada que en carne almacenada refrigerada. Por tanto, la congelación sería el proceso que más ralentiza la peroxidación lipídica (Eun, Boyle y Hearnberger, 1994), siendo un método muy utilizado para alargar la vida útil de la carne. Sin embargo, es importante tener en cuenta que en el proceso pueden aparecer cristales de hielo que, al romper la integridad de la fibra muscular, incrementan la actuación de los posibles oxidantes una vez descongelada (Martino y Zaritzky, 1988), por lo que en este caso es recomendable un consumo rápido.

#### *e) Cocinado*

Por último, hay que destacar los procesos de cocinado, que incrementan drásticamente los niveles de oxidación lipídica en carne y que pueden dar lugar al desarrollo de sabores de precalentado, denominados "*warmed-over flavor*" (WOF), cuando se almacena la carne cocinada en refrigeración (Tims y Watts, 1958). Esto se debe principalmente a que el tratamiento térmico provoca rupturas que permiten una mayor actuación del oxígeno (Igene, Yamauchi, Pearson, Gray y Aust, 1985), la desnaturalización de las proteínas y, por tanto, la desactivación de la posible actividad antioxidante a nivel enzimático (Lee, Mei y Decker, 1996; Mei, Crum y Decker, 1994). Además, el periodo de cocción y la temperatura máxima alcanzada afectan a los niveles de liberación de hierro catalíticamente activo de los pigmentos hemínicos, que actúa como prooxidante (Chen, Pearson, Gray, Fooladi y Ku, 1984). Así, en periodos de cocción largos con un calentamiento lento se ha visto un incremento de los niveles disponibles de hierro libre oxidable frente a los periodos de cocción cortos, caracterizados por un calentamiento rápido. Por tanto la estabilidad oxidativa de la carne en periodos de cocción largos es menor. En el caso de la temperatura máxima alcanzada, cuanto más exceda ésta de los 70°C más alta será la disrupción de hidroperóxidos en radicales libres y, por tanto, más elevados los niveles de oxidación lipídica (Kanner, 1994).

El cocinado es un factor de gran importancia a nivel de oxidación del colesterol puesto que puede incrementar hasta 10 veces la concentración de COPs en la carne (Morgan y Armstrong, 1992; Paniangvait, King, Jones y German, 1995; Park y Addis, 1985). Como se ha comentado con anterioridad los niveles de estos productos de oxidación previamente al cocinado son muy bajos y, en muchos casos, inexistentes, pero las condiciones de tiempo-temperatura y el método de cocinado influyen sobre los niveles finales de óxidos de colesterol en carne. Así, Park y Addis (1986) observaron cómo los niveles de 7-cetocolesterol se incrementaban de manera lineal con el tiempo de calentamiento pero no con la temperatura. Además, Nourooz-Zadeh y Appelqvist (1989) observaron cómo en corteza de cerdo sometida a fritura a 170°C se detectaban únicamente 7 $\alpha$  y 7 $\beta$ -hidroxicolesterol mientras que al elevar a 200°C la temperatura aparecían 5,6  $\alpha$ -epoxicolesterol, 7-cetocolesterol y 25-hidroxicolesterol. Respecto al tipo de cocinado, Gil (2002) demostró que la cantidad de oxisteroles en carne de cerdo cocinada a la plancha era significativamente inferior a la cuantificada en muestras sometidas a cocción o a asado en horno, seguramente debido a que los últimos tratamientos necesitan un periodo de cocción más largo.



---

## **OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar el efecto de la inclusión en la dieta de ácido carnósico sobre el bienestar animal y la calidad de la carne de cordero.

De forma más precisa enumeramos a continuación los objetivos concretos:

- Estudiar el efecto de la inclusión de ácido carnósico en la dieta de corderos sobre parámetros relacionados con la respuesta inmune.

- Determinar si el efecto antioxidante del ácido carnósico incluido en la dieta de corderos protege a los animales frente al estrés oxidativo provocado como consecuencia del transporte o de la utilización de dietas altamente acidogénicas.

- Determinar si la inclusión de ácido carnósico en la dieta de corderos mejora la estabilidad oxidativa de la carne.

- Estudiar el efecto de la inclusión de ácido carnósico en la dieta de corderos sobre la vida útil de la carne (color y microbiología).



## CAPÍTULO 1

*Antioxidants included in the diet of fattening lambs: Effects on immune response, stress, welfare and distal gut microbiota*

---



## Antioxidants included in the diet of fattening lambs: Effects on immune response, stress, welfare and distal gut microbiota

Lara Morán, Sonia Andrés\*, Raúl Bodas, Julio Benavides, Nuria Prieto, Valentín Pérez, F. Javier Giráldez

Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), Finca Marzanas. E-24346 Grulleros, León, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 August 2011

Received in revised form 18 January 2012

Accepted 20 January 2012

#### Keywords:

Carnosic acid

Vitamin E

Immune response

Welfare

Oxidative stress

Gut microbiota

### ABSTRACT

Thirty-two Merino lambs were fed barley straw plus a concentrate alone (CONTROL) or concentrate enriched with vitamin E (0.6 g/kg of concentrate, VITE006) or with one of two amounts of carnosic acid (0.6 g/kg of concentrate CARN006; 1.2 g/kg of concentrate, CARN012). Effects of these antioxidant compounds on the immune response, stress during road transport, and gut microbiota were assessed. After 7 weeks of being fed the experimental diets, blood samples were taken to measure blood lymphocyte subpopulations by flow cytometry and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) production; then, all lambs were subjected to a 4-h transportation–stress period to study the evolution of haematological and biological parameters during road transport. Finally, rumen and faeces samples were collected to study microbial diversity. Carnosic acid promoted changes in the faecal bacterial community ( $P < 0.001$ ), whereas vitamin E enhanced IFN- $\gamma$  production ( $P < 0.05$ ) and reduced tissue damage (creatinine phosphokinase,  $P < 0.05$ ) during road transport. Consequently, vitamin E showed some immunological properties and protection against tissue damage during road transport. This may contribute towards improving the welfare of these animals. Changes in the faecal bacterial community promoted by carnosic acid might be related to changes in the chemical composition of the meat. No immunological properties were observed for carnosic acid, and no changes in the faecal or ruminal bacterial communities were observed when vitamin E was supplemented to fattening lambs.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

An increasing number of consumers desire meat produced from animals reared according to high welfare standards. This growing demand has led to the search for natural compounds and additives of vegetable origin that may benefit animal health when supplied at low concentrations in the diet (Galyean et al., 1999; Wistuba et al., 2005). In this context, special attention has been paid to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), a herb that grows in southern Europe and which is widely used as a flavouring and medicinal plant around the world. The bioactive properties of this herb have been attributed to phenolic compounds present in rosemary plants (Hernandez-Hernandez et al., 2009). Carnosic acid, a phenolic diterpene

**Abbreviations:** BW, body weight; bp, base pairs; CPK, creatine phosphokinase; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; HPA, hypothalamic-pituitary-adrenal axis; IFN- $\gamma$ , interferon-gamma; LDH, lactate dehydrogenase; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; OD, optical density; PCA, principal components analysis; PHA, phytohaemagglutinin; PBSS, phosphate buffered saline solution; Prostaglandin E2, PGE<sub>2</sub>; RBC, red blood cells; TRFs, terminal restriction fragments; T-RFLP, terminal restriction fragment length polymorphism; ROS, reactive oxygen species; WBC, white blood cells.

\* Corresponding author. Tel.: +34 987 317 156; fax: +34 987 317 161.

E-mail address: [sonia.andres@eae.csic.es](mailto:sonia.andres@eae.csic.es) (S. Andrés).



that exhibits a considerable free-radical scavenging capacity (Rice-Evans et al., 1997), is an antioxidant that can be extracted from rosemary.

Feeding phenolic compounds to animals could be advantageous to welfare through reducing the deleterious effects of reactive oxygen species (ROS) on the highly reactive cells of the immune system, so phenolic compounds may have beneficial effects on certain inflammatory and immune parameters, particularly under oxidative stress conditions (Carroll and Forsberg, 2007; Hamer, 2007). Consequently, the administration of carnolic acid is of interest for animals whose immune response is stressed by high metabolic rates or other conditions (e.g., road transport) associated with intensive production systems. This in turn could reduce the need for antibiotics (either used in a prophylactic or therapeutic way) and decrease the risk of bacterial antibiotic resistance (Call et al., 2008).

Phenolic compounds also can modify gut microbiota, resulting in changes of the ruminal bacterial metabolism (López-Campos et al., 2010), less diarrhoeal incidence (Hara et al., 1995) or less obese individuals (Ley et al., 2006; Turnbaugh et al., 2006).

The objective of this study was to test whether carnolic acid had beneficial effects when included in a high concentrate fed to fattening lambs. Effects of carnolic acid on immune response (interferon-gamma production, blood lymphocytes populations) were measured. Also, changes in haematological and biochemical parameters related to the fatigue of animals when stressed by road transport. Microbial diversity of ruminal contents and faeces were studied. Vitamin E (a frequently used antioxidant) was included as a positive control.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and diets

Two weeks before commencement of the trial, 32 male Merino lambs were treated with ivermectin (Ivomec, Merial Labs, Barcelona, Spain) and vaccinated against enterotoxaemia (Miloxan, Merial Labs, Barcelona, Spain).

After stratification on the basis of body weight (average body weight (BW),  $15.2 \pm 0.75$  kg), the lambs were allocated randomly to four different groups: a control group (CONTROL), a group fed vitamin E ( $\alpha$ -tocopheryl acetate) at a rate of 0.6 g/kg of concentrate (VITE006, equivalent to 900 IU/kg of concentrate), a third group fed a single dose of carnolic acid (0.6 g/kg of concentrate, CARN006) of carnolic acid (Shaanxi Sciphar Biotechnology Co., Ltd., Xi'an, China; carnolic acid 470 g/kg dry matter (DM), FAD 12.65 g/kg DM, ash 16.13 g/kg DM) and a fourth group fed a double dose of carnolic acid (1.2 g/kg of concentrate, CARN012). Animals were then penned individually. All handling practices followed the recommendations of the European Council Directive 86/609/EEC for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, and all animals were able to see and hear other lambs.

The basal diet was composed of concentrate (50% barley, 20% soybean meal, 15% maize, 8% wheat, 4% molasses and 3% mineral premix; chemical composition: dry matter 888 g/kg, crude protein (CP) 178 g/kg DM, neutral detergent fibre (NDF) 134 g/kg DM, and ash 56 g/kg DM) and barley straw (DM 913 g/kg, CP 35 g/kg DM, NDF 757 g/kg DM, ash 55 g/kg DM). After 7 days of adaptation to the basal diet all of the lambs were fed barley straw plus corresponding concentrate feed no supplemented (CONTROL group) or supplemented with either vitamin E or carnolic acid for 7 weeks. The concentrate (35 g/kg BW/day) and forage (200 g/day) were weighed and supplied in separate feeding troughs at 9:00 am every day, and fresh drinking water was always available. The orts (<5% of the total diet) were weighed daily, and ort samples (concentrate and barley straw refused) were collected for subsequent analyses after mixing all of the concentrate or barley straw refused by each animal after a week.

### 2.2. Determination of blood lymphocyte subpopulations by flow cytometry

In order to quantify blood populations of CD4 and CD8<sup>+</sup>-lymphocytes, a single colour flow cytometric analysis was performed after 7 weeks of being fed the experimental diets. Blood samples were collected by jugular venipuncture into 10 ml vacutainers containing ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant, then immediately carried to the laboratory. Briefly, 100  $\mu$ l of blood were incubated for 20 min at 4 °C with ovine CD4 specific antibody (clone 17D1, VMRD, Washington, USA) or ovine CD8 specific antibody (clone VPM31, Serotec, UK) at a 1:100 dilution. Then, 1 ml of BD FACS Lysing Solution (BD, California, USA) was added and incubated at room temperature for 5 min, washed twice with phosphate buffered saline solution (PBSS, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) and then re-incubated for 20 min at 4 °C in the dark with 100  $\mu$ l fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated rabbit antimouse immunoglobulin (Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:50. After two further washes in PBSS, cells were fixed in 4% paraformaldehyde solution and kept at 4 °C until analysis on a FACScan flow cytometer (BD, California, USA) equipped with CellQuest software (BD, California, USA). Results were expressed as the percentage of positive stained cells in sample populations of 10 000 individual cells.

### 2.3. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) production assay

At the end of the experiment, the peripheral cellular immune response was assessed by an assay for the determination of IFN- $\gamma$  production. Four 1.4 ml aliquots of each blood sample were dispensed in each of four 1.5 ml Eppendorf safe-lock tubes. Each aliquot of blood was mixed with 100  $\mu$ l of either sterile PBSS (negative control) or 100  $\mu$ l of phytohaemagglutinin

(PHA, Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) dissolved in sterile saline solution (1 mg/ml). Blood cultures were incubated for 20 h at 37 °C in a humidified atmosphere. After centrifugation of the tubes, plasma harvested from on top of the sedimented blood cells was stored at –20 °C until analysed. The plasma samples then were assayed in duplicate for IFN- $\gamma$  using a commercial bovine enzyme immunoassay kit (Bovigam, Prionics AG, Zurich, Switzerland) that reacts with ovine IFN- $\gamma$ , according to the manufacturer's instructions. The optical density (OD) results were transformed to an index value by division of the mean OD of the plasma from the phytohaemagglutinin-stimulated blood by the mean OD of the same plasma incubated with sterile PBSS (negative control).

#### 2.4. Stress induction and blood sampling

Road transportation was used as a quantifiable source of stress (Averós et al., 2009). All animals were subjected to a 4 h-transportation period, at a space allowance of 0.30 m<sup>2</sup> per animal in a truck with a non-slip metal floor that was covered with straw bedding. Before the road transport (LOAD) and immediately after the 4 h-transportation period (UNLOAD) blood samples were collected by jugular venipuncture into two 10 ml vacutainers containing either no anticoagulant or EDTA. Biochemical (cortisol, glucose, creatine phosphokinase (CPK) and lactate dehydrogenase (LDH)) and haematological analyses were performed as explained by López-Campos et al. (2010).

#### 2.5. Characterisation of microbial diversity in ruminal contents and faeces

Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) is a technique used to rapidly distinguish bacterial communities based on the size of the terminal fragments of 16S rRNA genes following restriction endonuclease digestion. Samples of ruminal contents and faeces were collected in aseptic flasks, immediately frozen at –80 °C and then freeze-dried. The DNA was extracted and purified using the commercial QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd., Crawley, UK) and stored at –20 °C until analysis for microbial diversity by T-RFLP of genes encoding 16S rRNA (Liu et al., 1997).

Briefly, a fragment of the 16S rRNA gene was amplified by PCR using bacterial universal primers (Hongoh et al., 2003), including a fluorescein-labelled forward primer (FAM-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; CTTGTACACACCGCCCGT). Fluorescence-labelled PCR products were purified using the GFX PCR DNA kit and Gel Band Purification (GE Healthcare, Roosendaal, Netherlands). Then, the DNA was quantified and 100 ng of each sample was subjected to a restriction reaction with enzyme *HaeIII* (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) for 12 h at 37 °C. Fluorescence-labelled terminal restriction fragments (TRF) were analysed by capillary electrophoresis on an automatic sequence analyser Megabace 500 (GE Healthcare, Roosendaal, Netherlands) with internal Et-ROX-labelled DNA size standards (Amersham Biosciences, Fairfield, CT, USA).

#### 2.6. Statistical analyses

Feed intake and immunological parameters were subjected to analysis of variance using the GLM procedure of the SAS package (SAS, 1999), according to the model:

$$Y_{ij} = m + T_i + e_{ij},$$

where  $Y_{ij}$  = observation mean ( $j = 1-8$ ),  $\mu$  = the overall mean,  $T_i$  = the fixed effect of the treatment ( $i = 1-4$ : CONTROL, VITE006, CARN006, CARN012) and  $e_{ij}$  = the random error.

Data corresponding to biochemical and haematological parameters related to stress during road transport were analysed as a repeated measures design using the MIXED procedure of SAS with treatment, according to the following model:

$$Y_{ij} = m + T_i + A(T)_{ij} + S_k + e_{ijk},$$

where  $Y_{ij}$  = observation mean,  $\mu$  = the overall mean,  $T_i$  = the fixed effect of the treatment ( $i = 1-4$ : CONTROL, VITE006, CARN006, CARN012),  $A(T)_{ij}$  = the random effect of the animal ( $j = 1-8$ ) nested to the treatment,  $S_k$  = the fixed effect of sampling time ( $k = 1-2$ : LOAD and UNLOAD),  $(T \times S)_{ik}$  = the interaction between treatment and sampling time, and  $e_{ijk}$  = the random error. In all analyses different covariance matrixes were evaluated on the basis of Schwarz's Bayesian information model fit criteria. Least square means were generated and separated using the PDIF option of SAS for main or interactive effects, with the level of significance being determined at  $P < 0.05$ . Polynomial (linear and quadratic) contrasts for CONTROL, CARN006 and CARN012 groups and an orthogonal contrast (CONTROL vs. VITE006) were performed using the GLM procedure of SAS. Finally, the T-RFLP data (matrix showing the relative height of the peaks, i.e., the relative presence of bacterial species) obtained for each ruminal and faecal sample were analysed by principal components analysis (PCA), using the FACTOR procedure of SAS. Scores for the faecal samples obtained for principal components 1 and 2 were also subjected to one way analysis of variance with the animal nested to the treatment as residual error.

**Table 1**

Effects of carnosic acid (0.6 and 1.2 g/kg concentrate) and vitamin E (0.6 g/kg concentrate) added to the diet of fattening lambs on dry matter (DM) intake, average daily gain (ADG) and feed to gain ratio (FC).

	CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006	Sed	P-value	Lin <sup>a</sup>	Qua <sup>b</sup>	Ort <sup>c</sup>
Concentrate DM intake (g/day)	631	617	623	627	18.7	0.912	0.669	0.549	0.842
Straw DM intake (g/day)	37.3	34.2	36.2	44.7	9.58	0.715	0.678	0.185	0.450
ADG (g/day)	222	200	215	206	18.0	0.691	0.862	0.203	0.430
FC (g/g)	2.9	3.1	2.9	3.0	0.206	0.566	0.907	0.744	0.339

<sup>a</sup>Lin and <sup>b</sup>Qua = linear and quadratic contrasts (CONTROL, CARN006, CARN012).

<sup>c</sup> Ort = orthogonal contrast (CONTROL vs. VITE006).

**Table 2**

ELISA index for IFN- $\gamma$  production and lymphocytes counts obtained by flow cytometry in not supplemented fattening lambs (control) or supplemented either with carnosic acid (0.6 and 1.2 g/kg concentrate) or vitamin E (0.6 g/kg concentrate).

	CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006	Sed	P-value	Lin <sup>a</sup>	Qua <sup>b</sup>	Ort <sup>c</sup>
CD4 <sup>+</sup> (%)	18.8	22.9	22.8	25.7	2.82	0.144	0.176	0.393	0.025
CD8 <sup>+</sup> (%)	23.8	21.1	16.3	15.5	4.01	0.241	0.186	0.817	0.069
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	0.97	1.30	1.25	1.92	0.309	0.068	0.387	0.481	0.012
IFN- $\gamma$	2.29 <sup>b</sup>	2.46 <sup>b</sup>	2.24 <sup>b</sup>	7.06 <sup>a</sup>	1.897	0.042	0.935	0.691	0.018

<sup>a</sup>Lin and <sup>b</sup>Qua = linear and quadratic contrasts (CONTROL, CARN006, CARN012).

<sup>c</sup> Ort = orthogonal contrast (CONTROL vs. VITE006).

### 3. Results

#### 3.1. Intake, average daily gain (ADG) and feed-to-gain ratio (FC)

Table 1 summarises the production parameters of the lambs. There were no differences between the groups in terms of concentrate (P=0.912) or barley straw (P=0.715) intake. The body weight gain was not affected by the dietary treatment either (P=0.691 and 0.566 for average daily gain and feed to gain ratio, respectively).

#### 3.2. Determination of lymphocyte subpopulations by flow cytometry

The characterisation of lymphocytes obtained by flow cytometry in the lambs of the present study is summarised in Table 2. Higher percentages were detected in the VITE006 group for CD4<sup>+</sup> lymphocytes (orthogonal contrast CONTROL vs. VITE006 P=0.025), whereas CD8<sup>+</sup> percentages were numerically lower when compared to the CONTROL group. Consequently, a trend towards significance in the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio (P=0.068) was found between the VITE006 and CONTROL lambs, which became more apparent when the orthogonal contrast was performed (P=0.012).

#### 3.3. IFN- $\gamma$ production

The results of IFN- $\gamma$  production, a major cytokine mediator secreted by activated CD4<sup>+</sup> helper T cells of the Th1 (cell mediated) immune response, are presented in Table 2. Vitamin E supplementation in fattening lambs enhanced the production of IFN- $\gamma$  when phytohaemagglutinin (PHA) was added to the blood (P=0.042), whereas none of the carnosic acid groups was different from the CONTROL.

#### 3.4. Evolution of haematological and biochemical parameters during road transport

Tables 3 and 4 summarise the changes in red (RBC) and white blood cell (WBC) counts, respectively, in the lambs as a consequence of road transport. Before road transport, the linear (P=0.026) and orthogonal (P=0.012) contrasts revealed greater haematocrit for the lambs fed carnosic acid or vitamin E when compared to the CONTROL group, respectively (Table 3). Moreover, the size of erythrocytes (mean corpuscular volume (MCV)) was larger (P<0.05) and the haemoglobin concentration (mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC)) was lower (P<0.05) in two antioxidant groups (CARN012 and VITE006) compared to the CONTROL lambs (Table 3).

Amongst WBC, lower values of lymphocytes (P<0.05) were found in the VITE006 group compared to the groups fed carnosic acid before the road transport; the CONTROL lambs showed intermediate values (Table 4). The differential counts of WBCs were modified after the road transport, where higher monocyte counts (P<0.05) were found in the VITE006 and CARN012 groups when compared to the CONTROL. Likewise, granulocyte counts were increased (P<0.001) whereas a decrease in lymphocyte counts (P<0.001) was detected in all of the groups.

The evolution of biochemical parameters during road transport is summarised in Table 5. No effect of the diet on cortisol levels was detected before or after road transport. Likewise, the serum glucose concentration was not affected by dietary

**Table 3**

Evolution of red blood cells parameters during road transport in not supplemented fattening lambs (control) or supplemented either with carnosic acid (0.6 and 1.2 g/kg concentrate) or vitamin E (0.6 g/kg concentrate).

	CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006	Lin <sup>a</sup>	Qua <sup>b</sup>	Ort <sup>c</sup>	RSD <sup>d</sup>	P-value <sup>e</sup>		
									D	T	D × T
Red blood cells (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )											
Load	7.83	8.05	7.82	7.82	0.991	0.453	0.992	0.666	0.820	0.036	0.713
Unload	8.06	8.16	7.94	8.32	0.741	0.611	0.452				
Haematocrit (%)											
Load	29.8	31.5	32.4	32.7	0.026	0.733	0.012	2.80	0.135	0.002	0.436
Unload	32.3	33.0	33.3	35.3	0.602	0.933	0.078				
MCHC (pg)											
Load	35.3 <sup>b</sup>	32.5 <sup>a</sup>	32.1 <sup>a</sup>	31.3 <sup>a</sup>	<.0001	0.027	<.0001	1.36	<.0001	0.009	0.127
Unload	33.4 <sup>b</sup>	32.1 <sup>a</sup>	31.5 <sup>a</sup>	31.2 <sup>a</sup>	0.039	0.645	0.008				
MCV (μm <sup>3</sup> )											
Load	38.2 <sup>a</sup>	39.8 <sup>ab</sup>	41.4 <sup>b</sup>	41.2 <sup>b</sup>	0.005	0.948	0.005	2.10	0.024	0.052	0.261
Unload	40.1 <sup>a</sup>	39.9 <sup>a</sup>	41.9 <sup>ab</sup>	41.8 <sup>b</sup>	0.170	0.240	0.124				

<sup>a</sup>Lin and <sup>b</sup>Qua = linear and quadratic contrasts (CONTROL, CARN006, CARN012).

<sup>c</sup> Ort = orthogonal contrast (CONTROL vs. VITE006). MCHC: mean corpuscular haemoglobin concentration; MCV: mean corpuscular volume.

<sup>d</sup> RSD = residual standard deviation comparing all the possible combinations between diets or times.

<sup>e</sup> P-values for diet (D), time (T) and their interaction (D × T); Different superscripts in the same row or column indicate statistical differences (P<0.05) between diets or times.

treatment either (P>0.05). Regarding creatine phosphokinase, all of the antioxidant groups showed a trend (P=0.081) towards a lower concentration after road transport (UNLOAD) when compared to the CONTROL group, especially in the VITE006 group, where the effect became more apparent when the orthogonal contrast was calculated (CONTROL vs. VITE006; P=0.017; Table 5). Lactate dehydrogenase, another indicator of tissue damage (Jiang and Ames, 2003), numerically was slightly lower for the VITE006 and CARN012 groups after road transport.

### 3.5. Microbial diversity in the rumen and faeces

Similar to results of Ley et al. (2006), variability was high in the microbial diversity of individual faecal samples (Fig. 1). However, the principal component analysis of the T-RFLP data in the present study highlighted two clusters in the bacterial community of the faeces of fattening lambs that were correlated with carnosic acid consumption (Fig. 1). In fact, the scores for the first principal component (PC1) were different (P<0.001) when CARN006 and CARN012 groups were compared to CONTROL and VITE006 groups (Table 6), thus indicating that the discrimination observed in Fig. 1 was due to the PC1 scores

**Table 4**

Evolution of white blood cells parameters during road transport in not supplemented fattening lambs (control) or supplemented either with carnosic acid (0.6 and 1.2 g/kg concentrate) or vitamin E (0.6 g/kg concentrate).

	CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006	Lin <sup>a</sup>	Qua <sup>b</sup>	Ort <sup>c</sup>	RSD <sup>d</sup>	P-value <sup>e</sup>		
									D	T	D × T
White blood cells (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )											
Load	10.3 <sup>ab</sup>	10.7 <sup>b</sup>	10.9 <sup>b</sup>	8.8 <sup>a</sup>	0.395	0.937	0.046	1.51	0.037	0.327	0.671
Unload	10.2 <sup>ab</sup>	9.9 <sup>ab</sup>	10.7 <sup>b</sup>	8.8 <sup>a</sup>	0.646	0.486	0.111				
Granulocytes (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )											
Load	3.84	3.89	4.31	3.48	0.162	0.531	0.255	0.677	0.061	<0.001	0.705
Unload	4.06	4.59	4.93	4.01	0.044	0.692	0.958				
Lymphocytes (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )											
Load	5.62 <sup>b</sup>	6.13 <sup>b</sup>	5.64 <sup>b</sup>	4.38 <sup>a</sup>	0.968	0.283	0.026	0.914	0.011	<0.001	0.085
Unload	5.17 <sup>b</sup>	4.40 <sup>ab</sup>	4.44 <sup>ab</sup>	3.71 <sup>a</sup>	0.154	0.374	0.003				
Monocytes (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )											
Load	0.70 <sup>a</sup>	0.81 <sup>ab</sup>	0.96 <sup>bc</sup>	0.84 <sup>ab</sup>	0.004	0.791	0.108	0.206	0.003	0.005	0.040
Unload	0.68 <sup>a</sup>	0.85 <sup>ab</sup>	1.16 <sup>d</sup>	1.04 <sup>cd</sup>	0.002	0.439	0.006				
Granulocytes/lymphocytes											
Load	0.73 <sup>ab</sup>	0.63 <sup>a</sup>	0.77 <sup>ab</sup>	0.83 <sup>b</sup>	0.653	0.127	0.262	0.169	0.092	<0.001	0.005
Unload	0.81 <sup>ab</sup>	1.06 <sup>c</sup>	1.01 <sup>c</sup>	1.11 <sup>c</sup>	0.007	0.221	0.006				

<sup>a</sup>Lin and <sup>b</sup>Qua = linear and quadratic contrasts (CONTROL, CARN006, CARN012).

<sup>c</sup> Ort = orthogonal contrast (CONTROL vs. VITE006).

<sup>d</sup> RSD = residual standard deviation comparing all the possible combinations between diets or times.

<sup>e</sup> P-values for diet (D), time (T) and their interaction (D × T); Different superscripts in the same row or column indicate statistical differences (P<0.05) between diets or times.

**Table 5**

Evolution of biochemical parameters during road transport in not supplemented fattening lambs (control) or supplemented either with carnosic acid (0.6 and 1.2 g/kg concentrate) or vitamin E (0.6 g/kg concentrate).

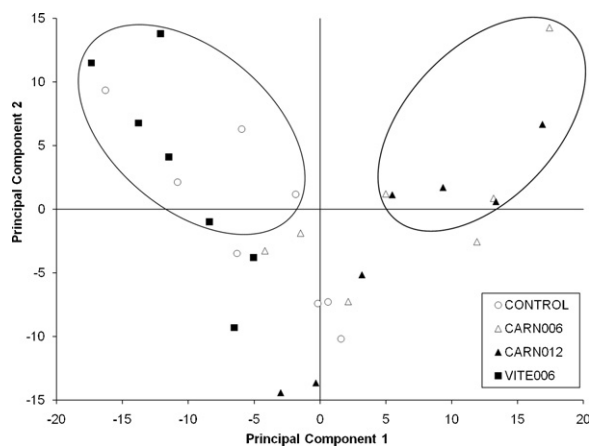
	CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006	Lin <sup>a</sup>	Qua <sup>b</sup>	Ort <sup>c</sup>	RSD <sup>d</sup>	P-value <sup>e</sup>		
									D	T	D × T
Cortisol (µg/dl)											
Load	1.49	1.66	0.94	1.23	0.111	0.132	0.437	0.864	0.939	<0.001	0.258
Unload	2.23	2.13	2.55	2.22	0.550	0.570	0.975				
Glucose (mg/dl)											
Load	91.3	87.0	83.4	85.5	0.136	0.951	0.248	11.25	0.188	0.719	0.882
Unload	92.1	82.4	82.4	86.2	0.137	0.384	0.349				
CPK (U/l)											
Load	201	170	211	160	0.691	0.078	0.099	98.0	0.081	<0.001	0.226
Unload	399	294	308	212	0.295	0.386	0.017				
LDH (U/l)											
Load	495	507	494	484	0.971	0.603	0.708	62.2	0.754	<0.001	0.177
Unload	579	571	546	538	0.335	0.767	0.226				

<sup>a</sup>Lin and <sup>b</sup>Qua = linear and quadratic contrasts (CONTROL, CARN006, CARN012).

<sup>c</sup> Ort = orthogonal contrast (CONTROL vs. VITE006). CPK: creatine phosphokinase; LDH: lactate dehydrogenase.

<sup>d</sup> RSD = residual standard deviation comparing all the possible combinations between diets or times.

<sup>e</sup> P-values for diet (D), time (T) and their interaction (D × T).



**Fig. 1.** Discriminant analysis (PCA) of microbial diversity in faeces performed on matrix data showing the relative height of peaks detected in T-RFLP profiles with HaeIII restriction enzyme. C: control lambs (not supplemented); C6: lambs supplemented with carnosic acid (0.6 g/kg concentrate); C12: lambs supplemented with carnosic acid (1.2 g/kg concentrate); V6: lambs supplemented with vitamin E (0.6 g/kg concentrate).

for each sample. Additionally, a lineal effect of the dose of carnosic acid supplemented was observed for PC1 scores (linear contrast  $P=0.003$ ; Table 6).

Fig. 2 shows the variables (terminal restriction fragments, TRFs) with high loadings (more eccentric) for the calculation of PC1 and PC2, whereas those under low loadings could be considered irrelevant for discrimination purposes. In other words, the TRFs with sizes of 264, 265, and 261 base pairs (bp) were responsible for the discrimination achieved by PC1 (Fig. 1), the TRF with 264 bp being inversely correlated to those of 261 and 264 bp (Fig. 2).

A theoretical assignment of these more eccentric TRFs to compatible bacterial species (Table 7) was performed using the tap-trFLP tool of the Ribosomal Data Project as described by Castillo et al. (2007). Table 7 also summarises the presence of these TRFs and the mean relative heights of the peaks (*i.e.*, the relative presence of bacterial species) in the samples correctly

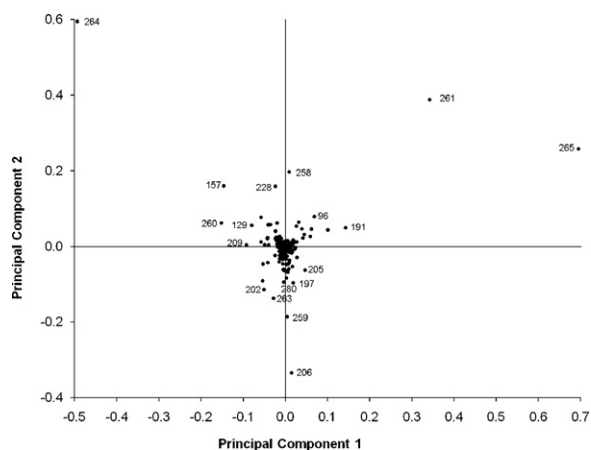
**Table 6**

Scores of the samples for the first and second principal components (PC1 and PC2) in the discriminant analysis (PCA) of microbial diversity in faeces (not supplemented fattening lambs (control) or supplemented either with carnosic acid (0.6 and 1.2 g/kg concentrate) or vitamin E (0.6 g/kg concentrate)).

	CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006	sed	P-value	Lin <sup>a</sup>	Quad <sup>b</sup>	Ort <sup>c</sup>
PC1 score	-4.90 <sup>a</sup>	6.28 <sup>b</sup>	8.74 <sup>b</sup>	-10.67 <sup>a</sup>	3.652	<0.001	0.003	0.242	0.139
PC2 score	-1.17	0.21	-1.78	3.16	3.879	0.627	0.874	0.629	0.291

<sup>a</sup>Lin and <sup>b</sup>Qua = linear and quadratic contrasts (CONTROL, CARN006, CARN012).

<sup>c</sup> Ort = orthogonal contrast (CONTROL vs. VITE006).



**Fig. 2.** Terminal restriction fragments (TRFs) loadings weights for the calculation of PC1 and PC2 in PCA analysis of faeces bacterial community (T-RFLP analysis).

classified by the PCA (Fig. 1). As can be seen, all of these TRFs were compatible with both Bacteroidetes and Firmicutes groups.

No clusters were observed in the T-RFLP results (data not shown) when studying microbial diversity in the rumen.

#### 4. Discussion

Lambs supplemented with vitamin E exhibited some modifications in the immunological parameters and less tissue damage during road transport when compared to the CONTROL lambs. Lambs consuming carnosic acid only showed changes in the gut microbiota at the large intestine level.

##### 4.1. Lymphocyte subpopulations and IFN- $\gamma$ production

The CD4 protein (receptor for major histocompatibility complex (MHC) class II molecules on antigen-presenting cells) is only found on T helper cells that can recognise processed exogenous antigens; the main function of T helper cells is to produce cytokines. In contrast, CD8 (a receptor for MHC class I molecules) is expressed only when cytotoxic T cells attack and kill cells, either tumoral or infected by an intracellular pathogen, mainly virus. A higher CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio implies either increased CD4<sup>+</sup> cells or decreased CD8<sup>+</sup> cells counts. Consequently, according to the data (Table 2), the VITE006 group might have shown higher number of CD4<sup>+</sup> lymphocytes when compared to the CONTROL lambs. In fact, vitamin E increases the number of CD4<sup>+</sup> lymphocytes in rats and broilers through positive selection of these cells during maturation in the thymus or spleen (Moriguchi et al., 1993; Erf et al., 1998).

In addition to their surface proteins, the lymphocytes were characterised by their responsiveness to PHA, a mitogen that primarily stimulates T cells, promoting their division and cytokine production. Vitamin E supplementation in fattening lambs enhanced IFN- $\gamma$  production when PHA was added to the blood ( $P < 0.05$ ), whereas the CARN006 and CARN012 groups showed no differences when compared to the CONTROL group (Table 2). Increases in IFN- $\gamma$  production have previously been related to vitamin E consumption (Zhu et al., 2003; Reiter et al., 2007; Nesaretnam et al., 2010). Vitamin E acts by inhibiting the production of prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>), which in turn inhibits the synthesis of IFN- $\gamma$  by Th1 cells, thus restoring, at least partially, the Th1 response when attenuated for some reason (Phipps et al., 1991). The high levels of IFN- $\gamma$  found in the VITE006 group would be in agreement with the trend towards the higher CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratios observed by flow cytometry (Table 2), as it could involve higher amounts of CD4<sup>+</sup> cells, source of this cytokine. Higher IFN- $\gamma$  levels in the VITE006

**Table 7**

Compatible faecal bacteria with the terminal restriction fragments (TRFs) allowing the discrimination of faeces samples by T-RFLP data.

Number of compatible bacteria	<i>In silico</i> fragment size (bp) <sup>a</sup>	Real fragment size (bp) <sup>b</sup>	Frequency <sup>c</sup>			
			CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006
Bacteroidetes (79), Firmicutes (113)	261	261.3	0	3(12.5)	3(12.6)	1(9.8)
Bacteroidetes (746), Firmicutes (86)	264	264.4	4(12.9)	0	1(4.3)	4(17.7)
Bacteroidetes (560), Firmicutes (70)	265	265.5	2(7.4)	3(14.4)	5(13.4)	0

<sup>a</sup> *In silico* restriction fragment size obtained using tap-tRFLP tool of the Ribosomal Data Project.

<sup>b</sup> Real restriction fragment size in the samples of the present study when digested with *HaeIII*.

<sup>c</sup> Number of samples in the present study showing the TRF; the average relative height (%) of each peak is shown in brackets.

group also might indicate a higher number of activated natural killer lymphocytes related to the natural immune response (Han et al., 2000). PHA is a non-specific mitogen activator of T cells and IFN- $\gamma$  has been the only cytokine measured in this experiment, so the biological meaning of these differences in fattening lambs remains to be determined.

#### 4.2. Evolution of haematological and biochemical parameters during road transport

The greater size of the erythrocytes (MCV) and the lower haemoglobin concentration (MCHC) in the groups fed antioxidants (CARN012 and VITE006) when compared to the CONTROL group may reflect immature erythrocytes (functional bone marrow) circulating in blood of the CARN012 and VITE006 groups. For CARN012 this might reflect reduced absorbance of bioavailable iron in the gut due to chelating properties by phenolic compounds added to the diet (Gnanamani et al., 2008). Likewise, in agreement with the results of the present study (Table 3), high doses of vitamin E have reduced total iron concentrations to normal levels in the brain of mice (Lan and Jiang, 1997). It must be stated, however, that all of these RBC counts were within normal physiological counts for ovine animals (Table 3). After road transport, the haematocrit and RBC counts were higher ( $P=0.036$ ), probably reflecting dehydration.

For WBCs, vitamin E consumption has been related to decreased lymphocyte counts in mice with induced nasal-allergy-like symptoms (type I hypersensitivity or immediate hypersensitivity as a consequence of an increased Th2 response; Zheng et al., 1999). However, increases in lymphocyte counts were reported in older mice and vitamin E-deficient animals (Reiter et al., 2007). In the present experiment, the responses to vitamin E were similar to those described by Zheng et al. (1999). Consequently, the response to dietary vitamin E appears to vary with biological characteristics of the animals treated.

The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sympatho-adrenal system were activated by stress during road transport, thus promoting a release of neutrophils (neutrophilia) from bone and redistribution of circulating lymphocytes (mainly T cells) into other lymphoid compartments (e.g., spleen, lymph nodes, thoracic duct, and bone marrow) in all of the groups (Table 4). These changes were more pronounced in animals that were fed antioxidants, as deduced from their higher granulocyte:lymphocyte ratios compared to the CONTROL group (Table 4). Higher monocytes counts also were detected in the VITE006 and CARN012 groups after road transport (Table 4). Further experiments could clarify whether these changes in the haematological profile of the antioxidants groups represent improved adaptation to the stress of road transport.

Changes in biochemical parameters during road transport indicated that all groups were stressed similarly as a consequence of this management practice (Table 5). Thus, no differences amongst diets on cortisol levels or serum glucose concentration (which is related to the activity of glucocorticoides and catecholamines) were apparent either before or after road transport. However, the trend ( $P=0.087$ ) towards a lower concentration of creatine phosphokinase in the antioxidant groups (especially in the VITE006 group) after road transport may indicate a lower level of tissue damage or physical fatigue of these animals (Kramer and Hoffmann, 1997). Consequently, the welfare of these animals during road transport might be improved by vitamin E supplementation.

#### 4.3. Characterisation of microbial diversity in ruminal contents and faeces

The relative presence of bacterial species corresponding to the Bacteroidetes and Firmicutes groups was modified as a consequence of carnosic acid being added to the diet (Table 7). These two groups of beneficial bacteria, that normally are dominant (92.6% of all 16S rRNA sequences) in the digestive tract of mammals (Ley et al., 2006; Turnbaugh et al., 2006) are modified by obesity (less Bacteroidetes, more Firmicutes) in humans or mice when compared to lean human or mice (more Bacteroidetes, less Firmicutes). Trillions of microbes live in the gut, helping to digest food components (sometimes otherwise indigestible). Thereby, composition of the microbial community in the gut may affect the amount of energy extracted from the diet (Ley et al., 2006; Turnbaugh et al., 2006). Differences in total energy availability might be related to differences found in the chemical compositions of the meat obtained from lambs in the CARN006 and CARN012 groups compared to the CONTROL and VITE006 lambs reported elsewhere (Morán et al., 2012).

Microbial diversity in the rumen was not affected by dietary treatment. Consequently, the pattern of ruminal fermentation presumably was not influenced by adding carnosic acid to the diet.

## 5. Conclusions

Vitamin E supplemented to fattening lambs exhibited some immunomodulator properties, although the biological significance of these effects remains to be determined. Additionally vitamin E supplementation tended to reduce the increments of blood tissue damage indicators during road transport, thus preserving the health of the animal under stress conditions. Finally, carnosic acid promoted changes in the faecal bacterial community that might be related to differences in feed digestion in the large intestines.

## Acknowledgements

Financial support received from 'Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León' (Project CS185B11-2) is gratefully acknowledged. Raúl Bodas, Nuria Prieto, Julio Benavides (JAE-Doc contracts) and Lara Morán (JAE pre-doc grant) were

supported by the programme 'Junta para la Ampliación de Estudios' from CSIC. All the authors contributed equally to the work. None of authors have any conflicts of interest to declare.

## References

- Averós, X., Herranz, A., Sánchez, R., Gosálvez, L.F., 2009. Effect of the duration of commercial journeys between rearing farms and growing–finishing farms on the physiological stress response of weaned piglets. *Livest. Sci.* 122, 339–344.
- Call, D.R., Davis, M.A., Sawant, A.A., 2008. Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. *Anim. Health Res. Rev.* 9, 159–167.
- Carroll, J.A., Forsberg, N.E., 2007. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Vet. Clin. Food Anim.* 23, 105–149.
- Castillo, M., Martín-Ortúe, S.M., Nafarrías, M., Manzaniilla, E.G., Gasa, J., 2007. Changes in caecal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. *Vet. Microbiol.* 124, 239–247.
- Erf, G.F., Bottje, W.G., Bersi, T.K., Headrick, M.D., Fritts, C.A., 1998. Effects of dietary vitamin E on the immune system in broilers: altered proportions of CD4 T cells in the thymus and spleen. *Poult. Sci.* 77, 529–537.
- Galyean, M.L., Perino, L.J., Duff, G.C., 1999. Interaction of cattle health/immunity and nutrition. *J. Anim. Sci.* 77, 1120–1134.
- Gnanamani, A., Sudha, M., Deepa, G., Sudha, M., Deivanai, K., Sadulla, S., 2008. Haematological and biochemical effects of polyphenolics in animal models. *Chemosphere* 72, 1321–1326.
- Hamer, M., 2007. The beneficial effects of tea on immune function and inflammation: a review of evidence from in vitro, animal and human research. *Nutr. Res.* 27, 373–379.
- Han, S.N., Wu, D., Ha, W.K., Beharka, A., Smith, D.E., Bender, B.S., Meydani, S.N., 2000. Vitamin E supplementation increases T helper 1 cytokine production in old mice infected with influenza virus. *Immunology* 100, 487–493.
- Hara, H., Orita, H., Hatano, S., 1995. Effect of tea polyphenols on fecal flora and fecal metabolic products of pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 57, 45–49.
- Hernandez-Hernandez, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M.E., Legarreta, I.G., 2009. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Sci.* 81, 410–417.
- Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M., Kudo, T., 2003. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 299–304.
- Jiang, Q., Ames, B.N., 2003. Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* 17, 816–822.
- Kramer, J.W., Hoffmann, W.E., 1997. Clinical enzymology. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, California, pp. 303–325.
- Lan, J., Jiang, D.H., 1997. Desferrioxamine and vitamin E protect against iron and MPTP-induced neurodegeneration in mice. *J. Neural Transm.* 104, 469–481.
- Ley, R., Turnbaugh, P., Klein, S., Gordon, J., 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516–4522.
- López-Campos, Ó., Bodas, R., Prieto, N., Giráldez, F.J., Pérez, V., Andrés, S., 2010. Naringin dietary supplementation at 15% rates does not provide protection against sub-clinical acidosis and does not affect the responses of fattening lambs to road transportation. *Animal* 4, 958–964.
- Morán, L., Rodríguez-Calleja, J.M., Bodas, R., Prieto, N., Giráldez, F.J., Andrés, S., 2012. Carnosic acid dietary supplementation at 0.12% rates slows down meat discoloration in *gluteus medius* of fattening lambs. *Meat Sci.* 90, 789–795.
- Moriguchi, S., Miwa, H., Okamura, M., Maekawa, K., Kishino, Y., Maeda, K., 1993. Vitamin E is an important factor in T cell differentiation in thymus of F344 rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 39, 451–463.
- Nesaretnam, K., Mahalingam, D., Radhakrishnan, A.K., Premier, R., 2010. Supplementation of tocotrienol-rich fraction increases interferon-gamma production in ovalbumin-immunized mice. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 531–536.
- Phipps, R.P., Stein, S.H., Roper, R.L., 1991. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol. Today* 12, 349–352.
- Reiter, E., Jiang, Q., Christen, S., 2007. Anti-inflammatory properties of alpha- and gamma-tocopherol. *Mol. Aspects Med.* 28, 668–691.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, 152–159.
- SAS, 1999. *Statistical Analysis Systems Statistical Software Package Version 8*. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy. *Nature* 444, 1027–1031.
- Wistuba, T.J., Kegley, E.B., Apple, J.K., Davis, M.E., 2005. Influence of fish oil supplementation on growth and immune system characteristics of cattle. *J. Anim. Sci.* 83, 1097–1101.
- Zheng, K., Adjei, A.A., Shinjo, M., Shinjo, S., Todoriki, H., Ariizumi, M., 1999. Effect of dietary vitamin E supplementation on murine nasal allergy. *Am. J. Med. Sci.* 318, 49–54.
- Zhu, M., Wesley, I.V., Nannapaneni, R., Cox, M., Mendonca, A., Johnson, M.G., Ahn, D.U., 2003. The role of dietary vitamin E in experimental *Listeria monocytogenes* infections in turkeys. *Poult. Sci.* 82, 1559–1564.





## CAPÍTULO 2

*Metabolic acidosis corrected by including antioxidants in diets of  
fattening lambs*

---



## Short communication

## Metabolic acidosis corrected by including antioxidants in diets of fattening lambs

Lara Morán, F. Javier Giráldez\*, Raúl Bodas<sup>1</sup>, Julio Benavides, Nuria Prieto, Sonia Andrés

Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), Finca Marzanas, E-24346 Grulleros, León, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 March 2012

Received in revised form 21 August 2012

Accepted 23 August 2012

Available online 16 September 2012

## Keywords:

Carnosic acid

Vitamin E

Acidosis

Oxidative stress

Lamb

## ABSTRACT

Thirty-two Merino lambs fed barley straw and a concentrate alone (CONTROL) or CONTROL enriched with vitamin E (0.6 g kg<sup>-1</sup> of concentrate, VITE006) or carnosic acid (0.6 g kg<sup>-1</sup> of concentrate CARN006; 1.2 g kg<sup>-1</sup> of concentrate, CARN012) were used to assess the effect of these antioxidant compounds on metabolic acidosis. After 7 wk of being fed the experimental diets, the pH of blood samples was lower ( $P = 0.012$ ) for the CONTROL lambs than groups fed antioxidants. Metabolic acidosis in fattening lambs was corrected by both antioxidants (carnosic acid and vitamin E).

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

With intensive production systems, animals may be stressed by acidogenic diets (Berkemeyer, 2009) fed to meet high metabolic demands. Under this situation, reactive oxygen species (ROS) production at the mitochondrial level might be increased, whereas the mitochondrial energy production (ATP) would be partially inhibited (Boveris et al., 2010). Therefore, pyruvate would be partially directed towards lactic acid production and converted to CO<sub>2</sub>; thus hypercapnia would be corrected by activation of the respiratory control system (Berkemeyer, 2009). However, experiments in rats have demonstrated that high levels of ROS might disrupt the respiratory control (Mulkey et al., 2003), avoid compensation for hypercapnia and worsen metabolic acidosis promoted by the diet. To our knowledge, no studies have been carried out in ruminants. Consequently, the aim of the present study was to

determine if including antioxidants (vitamin E or carnosic acid, a potent antioxidant extracted from *Rosmarinus officinalis* L., an herb which is commonly used as a flavouring and medicinal plant widely around the world) in the diet for fattening lambs might neutralize the negative consequences of ROS, thus correcting the metabolic acidosis caused by the high-grain diets.

## 2. Materials and methods

## 2.1. Animals and diets

After stratification on the basis of body weight (mean body weight (BW), 15.2 ± 0.749 kg), 32 male Merino lambs were allocated randomly to four different groups: a control group (CONTROL), a group fed vitamin E (α-tocopheryl acetate) at a rate of 0.6 g kg<sup>-1</sup> of concentrate (VITE006, equivalent to 900 IU of vitamin E kg<sup>-1</sup> of concentrate), a third group fed the same dose (0.6 g kg<sup>-1</sup> of concentrate, CARN006) of carnosic acid (Shaanxi Sciphar Biotechnology Co., Ltd., Xi'an, China) and a fourth group fed double the low dose of carnosic acid (1.2 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of concentrate, CARN012). The animals were individually penned. All handling practices followed the recommendations of the European Council Directive 86/609/EEC for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

The basal diet was composed of concentrate [dry matter (DM) 888 g kg<sup>-1</sup>, crude protein (CP) 178 g kg<sup>-1</sup> DM, neutral detergent fibre (NDF) 134 g kg<sup>-1</sup> DM, and ash 56 g kg<sup>-1</sup> DM] and barley straw (DM

\* Corresponding author. Tel.: +34 987 317 156; fax: +34 987 317 161.  
E-mail address: [j.giraldez@eae.csic.es](mailto:j.giraldez@eae.csic.es) (F.J. Giráldez).

<sup>1</sup> Present address: Instituto Tecnológico Agrario, Junta de Castilla y León, Finca Zamadueñas, Ctra. Burgos, km. 119, 47071 Valladolid, Spain.

**Table 1**

Blood gases, acid–base profile and liver antioxidant status (TBARS) in not supplemented fattening lambs (CONTROL) or supplemented either with carnosic acid (0.6 and 1.2 g kg<sup>-1</sup> concentrate) or vitamin E (0.6 g kg<sup>-1</sup> concentrate).

Parameter <sup>a</sup>	Dietary treatment (n = 8)				sed	Orthogonal contrasts <sup>b</sup>		
	CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006		C vs. AO	VE vs. CA	C06 vs. C12
pH (ven)	7.38	7.42	7.42	7.41	0.013	0.001	0.482	0.635
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ven) (mmol/L)	25.3	26.8	25.2	26.3	0.74	0.218	0.581	0.045
pCO <sub>2</sub> (ven) (mmHg)	46.6	44.1	42.3	44.6	1.37	0.022	0.246	0.194
Anion gap (mmol/L)	15.4	13.5	14.0	13.3	0.67	0.004	0.382	0.468
tCO <sub>2</sub> (ven) (mmol/L)	26.7	28.1	26.4	27.7	0.77	0.295	0.521	0.045
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	146	147	145	145	0.7	0.484	0.217	0.042
K <sup>+</sup> (mmol/L)	4.87	4.56	4.38	4.38	0.126	0.001	0.418	0.176
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	110	111	110	110	0.6	0.944	0.095	0.214
TBARS (μg MDA g <sup>-1</sup> liver)	1.65	1.58	1.21	0.77	0.244	0.053	0.010	0.207

<sup>a</sup> CO<sub>3</sub><sup>-</sup>: bicarbonate; pCO<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub> pressure; tCO<sub>2</sub>: total CO<sub>2</sub>.

<sup>b</sup> Orthogonal contrasts: C vs. AO = CONTROL vs. CARN006 + CARN012 + VITE006; VE vs. CA = VITE006 vs. CARN006 + CARN012; C06 vs. C12 = CARN006 vs. CARN012.

913 g kg<sup>-1</sup>, CP 35 g kg<sup>-1</sup> DM, NDF 757 g kg<sup>-1</sup> DM, ash 55 g kg<sup>-1</sup> DM). After 7 days of adaptation to the basal diet (barley straw and the concentrate with no antioxidants), all lambs were fed barley straw plus one of the four concentrates above for 7 wk. The concentrate (35 g kg<sup>-1</sup> BW day<sup>-1</sup>) and forage (200 g day<sup>-1</sup>) were weighed and supplied in separate feeding troughs at 9:00 h every day; fresh drinking water was always available. The orts (<5% of the total diet) were weighed daily. The lack of significant differences in feed intake and performance of the animals [concentrate ( $P=0.912$ ) or barley straw ( $P=0.715$ ) intake; average daily gain ( $P=0.691$ ) and feed to gain ratio ( $P=0.566$ )] is addressed in Morán et al. (2012a).

## 2.2. Blood, liver and rumen sampling

After 7 wk of being fed the experimental diets blood samples collected by jugular venipuncture into lithium heparin tubes were assayed in a Stat Profile pHox Plus blood analyser (Nova Biomedical, Waltham, MA, USA) for pH, bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), CO<sub>2</sub> pressure (pCO<sub>2</sub>), anion gap, total CO<sub>2</sub> (tCO<sub>2</sub>), and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> concentrations an hour after being sampled. Finally, all lambs underwent food withdrawal during 6 h before being slaughtered, then they were weighed, stunned, slaughtered by exsanguination from the jugular vein, eviscerated and skinned (Morán et al., 2012b). A piece of liver was excised and held at -80 °C for TBARS analysis (Bodas et al., 2012). Rumen fluid was strained through four layers of cheesecloth and pH was determined immediately. Two pieces of the rumen wall [posterior dorsal (PDR) and anterior ventral (AVR) areas] were placed in 10% formalin for further anatomical study (López-Campos et al., 2010).

## 2.3. Statistical analysis

Data were subjected to one-way analysis of variance with the fixed effect of treatment as the only source of variation, using the GLM procedure of the SAS package. Orthogonal contrasts were performed to test the effects of antioxidants supplementation (CONTROL vs. CARN006 + CARN012 + VITE006), vitamin E vs. carnosic acid (VITE006 vs. CARN006 + CARN012) and level of carnosic acid (CARN006 vs. CARN012).

## 3. Results

### 3.1. Blood gases, acid–base parameters and liver antioxidant status (TBARS)

Table 1 presents the blood gases, acid–base profile and liver antioxidant status (TBARS) of the lambs. The lambs in the CONTROL group had lower blood pH values when compared to the lambs fed antioxidants ( $P=0.012$ ). Differences ( $P<0.05$ ) between the CONTROL and the antioxidants groups also were observed for pCO<sub>2</sub>, anion gap, K<sup>+</sup> and TBARS. In addition, lambs fed antioxidants had higher blood pH and lower pCO<sub>2</sub>, anion gap and K<sup>+</sup> when compared to

the CONTROL group. Lambs fed vitamin E had lower TBARS than the average of lambs fed carnosic acid. Compared to the low level of carnosic acid (CARN006), the high level decreased blood HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, tCO<sub>2</sub> and Na<sup>+</sup>.

### 3.2. Ruminal pH and anatomopathological study of ruminal wall

The ruminal pH values (overall mean values  $5.52 \pm 0.082$ ) reflected ruminal acidosis for all of the animals of the present study. Moreover, the interior of the rumen wall was grey to dark in all of the animals (characteristic of parakeratosis). This lack of effect of antioxidants on inflammation of ruminal epithelium was corroborated by the lack of differences in the mucose (AVR, overall mean values  $0.68 \pm 0.253$  mm; PDR, overall mean values  $0.82 \pm 0.161$  mm) and submucose thickness (AVR, overall mean values  $0.69 \pm 0.099$  mm; PDR, overall mean values  $0.71 \pm 0.115$  mm) and the anastomosis and number of papillae (AVR, overall mean values  $81.1 \pm 4.80$  papillae cm<sup>-2</sup>; PDR, overall mean values  $95.9 \pm 8.10$  papillae cm<sup>-2</sup>).

## 4. Discussion

Feeding high-grain diets to growing lambs to achieve maximum growth rates often is associated with ruminal acidosis (local), as was apparent for all the lambs in the present study (anatomopathological study of the ruminal wall). Absorbed into the bloodstream, the acid (H<sup>+</sup>) reduces blood pH (normal range of 7.36–7.44) to a more acidic state (metabolic acidosis, which is not local but systemic), so blood pH can be considered as an indicator of ruminal acidosis (Horn et al., 1979). In the present study only the lambs of the CONTROL group showed latent metabolic acidosis (Table 1), that is to say, a blood pH constantly at the low end of the normal range and a high anion gap (Berkemeyer, 2009). In contrasts, lambs fed antioxidants, despite ruminal acidosis, did not exhibit metabolic acidosis (Table 1). These results are consistent with those of Vestweber et al. (1974) who reported mean blood pH of 7.44 and 7.36, respectively, before and after producing acute acidosis in sheep.

Reduction in liver TBARS for lambs receiving CARN012 and VITE006 highlights the ability of these compounds

to improve the antioxidant status (Table 1). The relationship between metabolic acidosis and oxidative stress (Mobbs, 2007) is apparent from a mitochondrial point of view; the electron transport chain and the oxidative phosphorylation ( $O_2$  is consumed to produce  $H_2O$  and ATP) are coupled by a proton ( $H^+$ ) gradient across the inner mitochondrial membrane known as the proton-motive force ( $\Delta p$ ). This gradient is used by the  $F_0F_1$  ATP-synthase complex to make ATP via oxidative phosphorylation. However, 1% of the mitochondrial electron flow leads to the formation of ROS ( $O_2^{\bullet-}$ ) under normal physiological conditions. This percentage is increased when  $H^+$  leakage (passive diffusion of  $H^+$  with no ATP production) increases due to accumulation of  $H^+$  (Boveris et al., 2010), as happens during metabolic acidosis. In acidosis,  $O_2$  is channelled to ROS production, which reacts with various cellular targets changing membrane excitability, synaptic transmission, gene induction and cellular metabolism.

As a result, ATP production is reduced when  $H^+$  leaks during metabolic acidosis (Berkemeyer, 2009). Pyruvate is diverted towards lactate production and most of the lactate is converted into  $CO_2$ , promoting hypercapnia and respiratory acidosis. To compensate for this situation, the hypoxic/hypercapnic chemoreflex is activated; however, if hyperventilation takes place (as happens when ROS are augmented, as will be explained below), the binding tenacity of haemoglobin for oxygen increases, and less oxygen is released for cells (the Bohr effect). Consequently, cells produce lactic acid and the body continues to be exposed to organic acid with no recovery (lactic acid trap; Berkemeyer, 2009). These effects would explain the high  $pCO_2$  (hypercapnia) and low pH (latent acidosis) observed in the CONTROL lambs (Table 1).

As previously stated, hypercapnia is one stimulus but not the only for the respiratory control system (Mulkey et al., 2003). In fact, the respiratory control might be disrupted by oxidation stress of the brain stem respiratory control centre (possibly  $CO_2/H^+$  chemosensitive neurons). For example, hyperoxia (Mulkey et al., 2003) and chemical oxidants (Lipton et al., 2001) increase respiration rate, whereas antioxidants can block the effects of hyperoxia (Mulkey et al., 2003). Consequently the lambs in the CONTROL group presumably suffered from hyperventilation (lactic acid trap), while antioxidant fed lambs would have neutralized the negative effects of ROS at the respiratory control centre.

The low concentrations of plasma  $K^+$  in the antioxidant groups when compared to the CONTROL corroborate this theory (Table 1). Neurons are stimulated by a free radical-dependent mechanism, possibly inhibiting a  $K^+$  channel taking charge of maintaining low extracellular potassium concentrations, which are necessary to preserve potassium gradients across cell membranes (essential for nerve excitation) (Hoshi and Heinemann, 2001; Mulkey et al., 2003). Specifically, the oxidation of methionine to methionine sulphoxide during ROS production is one of the main factors involved in the inactivation process of the

ion channels (Hoshi and Heinemann, 2001). Thus, the high concentration of plasma potassium in the CONTROL group may indicate that cell uptake of potassium was impaired by ROS production. On the other hand, the normal values of pH, anion gap,  $pCO_2$  and  $K^+$  in the lambs fed antioxidants indicate that these compounds helped to detoxify ROS, and attenuate the deleterious consequences of metabolic acidosis.

## 5. Conclusions

Including antioxidants in the diet of fattening lambs had no detectable effect on ruminal acidosis. However, metabolic acidosis was corrected when either carnosis acid or vitamin E was added to the concentrate being fed. Consequently, supplements of both compounds should help preserve acid–base status of fattening lambs fed high-grain diets.

## Acknowledgments

Financial support received project AGL2010-19094 is gratefully acknowledged. Raúl Bodas, Nuria Prieto, Julio Benavides (JAE-Doc contracts) and Lara Morán (JAE pre-doc grant) were supported by the programme 'Junta para la Ampliación de Estudios' (CSIC-European Social Fund).

## References

- Berkemeyer, S., 2009. Acid–base balance and weight gain: are there crucial links via protein and organic acids in understanding obesity? *Med. Hypotheses* 73, 347–356.
- Bodas, R., Prieto, N., Jordán, M.J., López-Campos, Ó., Giráldez, F.J., Morán, L., Andrés, S., 2012. The liver antioxidant status of fattening lambs is improved by naringin dietary supplementation at 0.15% rates but not meat quality. *Animal* 6, 863–870.
- Boveris, A., Carreras, M.C., Poderoso, J.J., 2010. The regulation of cell energetics and mitochondrial signaling by nitric oxide. In: Ignarro, L.J. (Ed.), *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 441–482.
- Horn, G.W., Gordon, J.L., Prigge, E.C., Owens, F.N., 1979. Dietary buffers and ruminal and blood parameters of subclinical lactic acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 48, 683–691.
- Hoshi, T., Heinemann, S.H., 2001. Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J. Physiol.* 531, 1–11.
- Lipton, A.J., Johnson, M.A., McDonald, T., Lieverman, M.W., Gozal, D., Gaston, B., 2001. S-nitrosothiols signals the ventilatory response to hypoxia. *Nature* 413, 171–174.
- López-Campos, Ó., Bodas, R., Prieto, N., Giráldez, F.J., Pérez, V., Andrés, S., 2010. Naringin dietary supplementation at 15% rates does not provide protection against sub-clinical acidosis and does not affect the responses of fattening lambs to road transportation. *Animal* 4, 958–964.
- Mobbs, C., 2007. Molecular responses to oxidative stress and acidosis. In: Finck, G. (Ed.), *Encyclopedia of Stress*. Academic Press, San Diego, CA, p. 49.
- Morán, L., Andrés, S., Bodas, R., Benavides, J., Prieto, N., Pérez, V., Giráldez, F.J., 2012a. Antioxidants included in the diets of fattening lambs: effects on immune response, stress, welfare and distal gut microbiota. *Anim. Feed Sci. Technol.* 173, 177–185.
- Morán, L., Andrés, S., Bodas, R., Prieto, N., Giráldez, F.J., 2012b. Meat texture and antioxidant status are improved when carnosis acid is included in the diet of fattening lambs. *Meat Sci.* 91, 430–434.
- Mulkey, D.K., Henderson, R.A., Putnam, R.W., Dean, J.B., 2003. Hyperbaric oxygen and chemical oxidants stimulate  $CO_2/H^+$ -sensitive neurons in rat brain stem slices. *J. Appl. Physiol.* 95, 910–921.
- Vestweber, J.G.E., Leipold, H.W., Smith, J.E., 1974. Ovine ruminal acidosis: clinical studies. *Am. J. Vet. Res.* 35, 1587–1590.



### **CAPÍTULO 3**

*Carnosic acid dietary supplementation at 0.12% rates slows down meat discoloration in gluteus medius of fattening lambs*

---



## Carnosic acid dietary supplementation at 0.12% rates slows down meat discoloration in *gluteus medius* of fattening lambs

L. Morán <sup>a,\*</sup>, J.M. Rodríguez-Calleja <sup>b</sup>, R. Bodas <sup>a</sup>, N. Prieto <sup>a</sup>, F.J. Giráldez <sup>a</sup>, S. Andrés <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), Finca Marzanas, E-24346 Grulleros, León, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, E-24071 León, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 March 2011

Received in revised form 31 May 2011

Accepted 2 November 2011

#### Keywords:

Microbial spoilage

Color

Sensory evaluation

Water holding capacity

Carnosic acid

Rosemary

### ABSTRACT

Thirty-two Merino lambs fed barley straw and a concentrate alone (CONTROL) or enriched with vitamin E (VITE006) or carnosic acid (CARN006; CARN012) were used to assess the effect of these antioxidant compounds on meat quality attributes. The animals were slaughtered after being fed for at least 5 weeks with the experimental diets. The *longissimus lumborum* samples of VITE006, CARN006 and CARN012 groups showed higher values ( $P < 0.001$ ) of  $L^*$  (lightness) through the complete storage period under modified atmosphere when compared to the CONTROL group. Moreover, the VITE006 and CARN012 samples revealed lower discoloration when compared to the CONTROL group, these differences being more apparent in a less color stable muscle such as *gluteus medius* ( $P < 0.05$  for hue after 14 days of refrigerated storage). Meat sensory traits were not significantly affected by carnosic acid and microbiological analyses were not conclusive at the doses administered.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The shelf life of meat and meat products is seriously shortened by two main factors: microbial spoilage and color stability, the last one being closely related to lipid peroxidation (Young & West, 2001). Therefore, any finding focused on delaying either of these processes is highly relevant for the meat industry. However, the high quality meat demanded by the consumer in developed countries (Boleman et al., 1997) must be free of chemically synthesized additives, so the addition of synthetic food stabilizers to meat in order to extend the shelf life of these products in the market does not seem to be the best choice. A suitable alternative is the inclusion of natural compounds (plant origin) in animal feedstuff, thus avoiding any further manipulation of the meat.

In this context, especial attention has been paid to the antimicrobial and antioxidant effects promoted by rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), an herb commonly used as a flavoring agent. The bioactive properties of this herb have been attributed to the phenolic compounds in rosemary plants (Hernández-Hernández, Ponce-Alquicira, Jaramillo-Flores, & Legarreta, 2009). These compounds have demonstrated antimicrobial and antioxidant activities when added to food as additives (McBride, Hogan, & Kerry, 2007), but they have also

shown beneficial effects on eggs, milk and meat products when rosemary is included in the diet of the animal (Botsoglou, Govaris, Giannenas, Botsoglou, & Papageorgiou, 2007; Galobart, Barroeta, Baucells, Codony, & Ternes, 2001; Jordán, Moñino, Martínez, Lafuente, & Sotomayor, 2010; Nieto, Díaz, Bañón, & Garrido, 2010). In this last sense, the main phenolic compound retained in animal tissues after the consumption of rosemary is carnosic acid (Moñino, Martínez, Sotomayor, Lafuente, & Jordán, 2008), so it can be hypothesized that the antimicrobial and antioxidant properties observed in meat quality are mainly due to the increment of this phenolic compound at this level. However, the amount of carnosic acid which must be fed to the animals to have beneficial effects on meat quality has not yet been quantified. It must also be considered that the concentration of phenolic compounds in the plants varies depending on the maturity stage or climatic conditions, mainly conditions of drought (Munné-Bosch, Mueller, Schwarz, & Alegre, 2001). This is the reason why feeding rosemary extracts with a known richness of carnosic acid instead of intact plants will allow recommendations to be established about the amount of rosemary which should be fed to the animals according to its levels of carnosic acid.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the shelf-life extension of meat (antimicrobial properties and color stabilization) when two different doses of carnosic acid (from rosemary extract) were included in the diet of lambs. Likewise, vitamin E (one of the most frequently used antioxidants in animal nutrition) was included in another group as a positive control.

\* Corresponding author. Tel.: +34 987 317 156; fax: +34 987 317 161.  
E-mail address: [laramoran@eae.csic.es](mailto:laramoran@eae.csic.es) (L. Morán).

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and diets

Two weeks before the commencement of the trial, 32 male Merino lambs were treated with Ivermectin (Ivomec, Merial Labs, Barcelona, Spain) and vaccinated against enterotoxaemia (Miloxan, Merial Labs, Barcelona, Spain).

After random stratification on the basis of body weight (average body weight (BW),  $15.2 \pm 0.749$  kg), the lambs were allocated to four different groups: a control group (CONTROL), a group fed vitamin E ( $\alpha$ -tocopheryl acetate) at a rate of  $0.6 \text{ g kg}^{-1}$  of feed concentrate (VITE006, equivalent to 900 IU of vitamin E  $\text{kg}^{-1}$  of feed concentrate), a third group fed a similar dose as the previous group ( $0.6 \text{ g carnosisic acid kg}^{-1}$  of feed concentrate, CARNO06) of carnosisic acid (Shaanxi Sciphar Biotechnology Co., Ltd, Xi'an, China) and the fourth group fed a double dose of carnosisic acid ( $1.2 \text{ g carnosisic acid kg}^{-1}$  of feed concentrate, CARNO12). The animals were then individually penned. All handling practices followed the recommendations of the European Council Directive 86/609/EEC for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, and all of the animals were able to see and hear other lambs.

After 7 days of adaptation to the basal diet comprised concentrate (50% barley, 20% soybean meal, 15% maize, 8% wheat, 4% molasses and 3% mineral premix; chemical composition: dry matter (DM)  $888 \text{ g kg}^{-1}$ , crude protein (CP)  $178 \text{ g kg}^{-1}$  DM, neutral detergent fiber (NDF)  $134 \text{ g kg}^{-1}$  DM, and ash  $56 \text{ g kg}^{-1}$  DM) and barley straw (DM  $913 \text{ g kg}^{-1}$ , CP  $35 \text{ g kg}^{-1}$  DM, NDF  $757 \text{ g kg}^{-1}$  DM, ash  $55 \text{ g kg}^{-1}$  DM), all of the lambs were fed barley straw and the corresponding concentrate feed alone (CONTROL group) or supplemented with either vitamin E or carnosisic acid. The concentrate ( $35 \text{ g kg}^{-1}$  BW  $\text{day}^{-1}$ ) and forage ( $200 \text{ g day}^{-1}$ ) were weighed and supplied in separate feeding troughs at 9:00 a.m. every day, and fresh drinking water was always available.

### 2.2. Slaughter procedure, packaging, storage and sampling

The animals were slaughtered on four different days, two lambs per group each day. The lambs were selected each day according to their weight (25 kg intended body weight) and slaughtered by stunning and exsanguination from the jugular vein; they were then eviscerated and skinned. The hot carcass of each lamb was weighed, chilled at  $4^\circ\text{C}$  for 24 h and weighed again. The pH value from the *longissimus thoracis* muscle at the sixth rib was determined in triplicate at 0 h, 45 min and at 24 h post-mortem before the muscle was removed from the carcass, using a pH meter equipped with a penetrating glass electrode (pH meter Metrohm® 704, Switzerland).

The left hind leg was removed and stored at  $-30^\circ\text{C}$  until sensory evaluation. Moreover, the *longissimus thoracis* (LT) *et lumborum* (LL) and *gluteus medius* (GM) muscles were removed from the right and left carcass sides. The LT samples were used for chemical analysis in accordance with the methods described by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2003), whereas the LL and GM muscles were cut into slices 2.5 cm thick, placed on impermeable polypropylene trays and wrapped with ML40-G bags (Krehalon; Proveedora Hispano Holandesa S.A., Barcelona, Spain), which were immediately modified-atmosphere packaged (MAP) using a tabletop Multivac A300 packaging machine (Multivac Verpackungsmaschinen, Wolfertschwenden, Germany). The air in the bags was replaced by a commercial gas blend intended for red and poultry meats consisting of 35%  $\text{CO}_2$ , 35%  $\text{O}_2$  and 30%  $\text{N}_2$ , with a gas:meat volume ratio of about 2:5:1. The ML40-G bags had  $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$  transmission rates of 20 and  $100 \text{ ml m}^{-2} 24 \text{ h}^{-1}$ , respectively, at  $23^\circ\text{C}$  and 80% relative humidity. All packages were stored under simulated retail display conditions [12 h daily fluorescent illumination (34 W) and  $3 \pm 1^\circ\text{C}$ ] and the air temperature was monitored using a Testo175-T2 data

logger (Instrumentos Testo S.A., Cabrils, Barcelona, Spain). The meat in these polypropylene trays was used to study the extract-release volume (ERV, on LT muscle), microbial spoilage (on LT muscle), the rate of discoloration (on LL and GM muscles) and the water holding capacity (WHC, on LL muscle).

### 2.3. Color, extract release volume (ERV) and water holding capacity (WHC)

On each sampling day, the concentrations of  $\text{CO}_2$  and  $\text{O}_2$  inside each tray were determined using a CheckMate 9900 (PBI Dansensor, Denmark). After opening the packages, a slice of fresh meat from each muscle was measured for color parameters on days 0, 3, 7, 9 and 14. The  $L^*$  (lightness),  $a^*$  (redness) and  $b^*$  (yellowness) values (CIE, 1986) were used to determine the meat color of the muscles using a chromameter (Minolta® Chroma Meter 2002, Germany). The hue angle ( $h^*$ ), which defines color ( $0^\circ$  is red;  $90^\circ$  is yellow), was calculated as arctangent ( $b^*/a^*$ ), and the chroma ( $C^*$ ), a measure of color intensity (0 is dull; 60 is vivid), was computed as  $\sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$  (Young & West, 2001). Also, the extract release volume (ERV) was measured (on days 0, 7 and 14) as previously described (Rodríguez-Calleja, Santos, Otero, & García-López, 2004). Briefly, minced lamb (15 g) was mixed with 60 ml of the extraction reagent (0.2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 0.2 M NaOH; pH 5.8) and homogenized for 2 min. The homogenate was filtered through Whatman no. 1 paper and the ERV was recorded as the volume collected in 15 min.

The water holding capacity (WHC) was measured on LL muscle via cooking losses, according to Honikel (1998).

### 2.4. Microbiological analysis

Twenty-five grams of LL muscle from each tray (0, 7 and 14 days) was placed into sterile Stomacher bags, rinsed with peptone water (1:5 dilution) and the rinsate was then diluted tenfold. The numbers of total viable bacteria at  $4.5^\circ\text{C}$  (TVB), *Pseudomonas* spp., lactic acid bacteria (LAB) and *Enterobacteriaceae* (EC) were determined and confirmed as described elsewhere (Rodríguez-Calleja, García-López, Santos, & Otero, 2005; Rodríguez-Calleja et al., 2004). Briefly, TVB were determined by the pour plate technique on Plate Count Agar (PCA; Oxoid, Basingstoke, UK) incubated at  $4.5^\circ\text{C}$  for 14 days. *Pseudomonas* spp. numbers were determined after 2 days of incubation at  $25^\circ\text{C}$  on a *Pseudomonas* agar base (Oxoid) to which a CFC (cetrimide, fucidin, cephaloridine; Oxoid) supplement was added. The oxidase test (Oxidase Touch sticks, Oxoid) was performed on randomly selected colonies and only oxidase-positive colonies were counted as *Pseudomonas* spp. The LAB colonies were enumerated on overlaid plates of MRS (de Man, Rogosa and Sharpe; Oxoid) agar following 3 days of incubation at  $30^\circ\text{C}$ . *Brochothrix thermosphacta* was enumerated on streptomycin sulfate cycloheximide thallose acetate agar (STAA, Oxoid) after incubation for 2 days at  $25^\circ\text{C}$ . Overlaid plates of Violet Red Bile Glucose agar (VRBGA, Oxoid) were used for EC counts after 24 h incubation at  $37^\circ\text{C}$ .

### 2.5. Sensory evaluation

The muscle *vastus intermedius* (VI) of the left hind leg was chosen for sensory evaluation because it is considered a high value retail cut—lamb leg roast, chump (Johansen, Aastveit, Egelandsdal, Kvaal, & Røe, 2006). Sensory analysis was carried out by 24 consumers. The left hind leg was defrosted at  $4^\circ\text{C}$  for 48 h and the VI was dissected and cut into steaks 20 mm thick. The steaks were cooked a pre-warmed clam-shell grill to an internal temperature of  $74^\circ\text{C}$  in the geometric center of the steak (measured by a Digi-Sense thermocouple probe, Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, USA), after which all fat and connective tissue were trimmed and the muscle cut into blocks of  $2 \times 1 \times 1 \text{ cm}$ . The blocks were wrapped in pre-labeled foil (the blocks from each animal were coded with the same alphabetical letter), placed in a

heated incubator and then given to the assessors in a random order chosen by a random number generator. Two triangle tests (ISO 4120, 1983) were carried out to discriminate between meat from the lambs fed (1) CONTROL vs. CARN012, and (2) CARN006 vs. VITE006 diets. In the triangle test, the assessors were requested to identify which two of three products were most alike and hence to indicate which product was the most different from the other two. Additionally, all consumers participated in two blind preference tests in which they received two meat samples on a coded paper plate. Each consumer tasted and evaluated their preferences for the meat samples from lambs fed (1) CONTROL vs. CARN012, and (2) CARN006 vs. VITE006 diets, and provided the reasons for their choices.

### 2.6. Statistical analysis

Microbiological counts were transformed and expressed as log CFU g<sup>-1</sup>. The basic descriptive statistics for each parameter (mean and standard deviation) were calculated. The pH data from different times were analyzed by a one-way analysis of variance. The ERV, WHC, microbial population and color parameter data (L\*, C\* and h\*) were subjected to a two-way analysis of variance, with treatment and day as the main factors. The Tukey's honestly significant difference test was used to compare means where the main effects were significant (P<0.05). All analyses were performed using the GLM procedure of the SAS package (SAS, 1999). Data from the sensorial analysis were analyzed using the chi-square test (Stone & Sidel, 1993) of the FREQ procedure in SAS (SAS, 1999).

## 3. Results and discussion

A previous study (López-Bote, Daza, Soares, & Berges, 2001) described a significant positive effect with low supplementation levels of vitamin E (270 mg kg<sup>-1</sup> diet) on lipid oxidation in meat; however, the protection effects at different storage times, and particularly the effect on meat surface redness, were optimized at a dietary inclusion of 550–625 mg α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> diet. Consequently, in the present study, vitamin E was supplied at a rate of 0.6 g kg<sup>-1</sup> of feed concentrate (VITE006 group). The same dose of carnosic acid was supplied to another experimental group (CARN006) to compare the effectiveness of both components. The last group was fed a double dose of carnosic acid (CARN012) in order to clarify whether this substance could show a dose-dependent effect at the meat level.

### 3.1. Chemical composition

The mean and standard deviation (SD) of the chemical data corresponding to the lamb meat samples (LT) are summarized in Table 1.

As can be observed, chemical composition of LT meat samples seemed to be affected by carnosic acid added to the diet, thus giving rise to higher levels of crude protein content when compared to the VITE006 group (Table 1).

**Table 1**  
Chemical composition of longissimus thoracis muscle (g kg<sup>-1</sup> meat).

	CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006	P-value
Ash	11.3 ± 0.28	11.9 ± 0.65	11.9 ± 0.81	12.0 ± 0.52	0.080
CP	196.8 <sup>ab</sup> ± 4.28	201.2 <sup>a</sup> ± 7.54	201.7 <sup>a</sup> ± 4.56	194.3 <sup>b</sup> ± 3.27	0.020
EE	23.8 ± 6.26	26.3 ± 4.51	24.7 ± 7.86	26.6 ± 4.30	0.753
DM	233.5 ± 6.34	239.5 ± 7.67	238.4 ± 9.50	236.1 ± 4.46	0.373

Mean ± standard deviation; CONTROL group (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); CARN012 (1.2 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); VITE006 (0.6 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); CP, crude protein; EE, ether extract; DM, dry matter; <sup>a,b,c</sup>: different superscripts in the same row indicate statistical differences (P<0.05) among treatments.

### 3.2. Color parameters

Table 2 summarizes the results of LL and GM muscles when the color stability was studied after packaging in a controlled gas mixture for 14 days. These muscles have been described in bovine as high (LL) and medium (GM) color-stable muscles (McKenna et al., 2005) due to the different values observed in their metmyoglobin reductase activity (MRA) and oxygen-consumption rate (OCR) parameters (McKenna et al., 2005; Young & West, 2001).

As can be observed (Fig. 1a), antioxidant treatments (CARN006, CARN012 and VITE006) showed higher L\* values in the LL muscle throughout the complete storage period when compared to the CONTROL (P<0.05). However, no differences in L\* values were detected among CARN006, CARN012 and VITE006 groups (Fig. 1a and Table 2). It has been previously demonstrated that phenolic-rich extracts are iron chelating agents (Samman et al., 2001) thus promoting either lower red blood cell counts or low hemoglobin levels. In fact, lower levels of hemoglobin content were measured in the blood of CARN006, CARN012 and VITE006 lambs when compared to the CONTROL group (data not shown). The inhibition of iron absorption caused by phenolic compounds in the diet of the lambs of the present experiment might have caused lower myoglobin contents and hence higher values of L\* in CARN006 and CARN012 groups when compared to the CONTROL lambs. High doses of vitamin E have also demonstrated to be effective in reducing total iron concentrations to normal levels in the brain of mice (Lan & Jiang, 1997). The evidence observed by Lan and Jiang (1997) would be in accordance with the low L\* values in the LL of the VITE006 group.

Moreover, oxygenation (which involves oxymyoglobin formation) reduces L\* values while oxidation (which involves metmyoglobin formation) had an opposite effect, suggesting that lightness is also affected by the state of the myoglobin (Fernández-López, Pérez-Álvarez, Sayas-Barberá, & Aranda-Catalá, 2000; Linares, Bórnez, & Vergara, 2008). This last argument might be the reason why L\* was increased in the GM (medium color-stable muscles) of the CONTROL lambs after 7 days of refrigerated storage (Fig. 1b), whereas this parameter was quite stable in the GM of the lambs being fed antioxidants (Fig. 1b). Regarding LL muscle, L\* was also very steady even in the CONTROL group (Fig. 1a), probably due to the high color stability of this muscle.

As far as C\* is concerned, the evolution of this parameter during refrigerated storage under MAP was similar in both muscles (Fig. 2). Thus, C\* evolution could be fitted successfully to a second order polynomial function in all of the treatments either on LL (R<sup>2</sup> = 0.77–0.95) or GM (R<sup>2</sup> = 0.77–0.98) muscles. Consequently, the first derivative was calculated for each curve in order to know when the most intense color (C\*<sub>max</sub>) was reached for each muscle in each group (Fernández-López et al., 2000). Thus, in LL muscle C\*<sub>max</sub> was reached after 6.8 days of refrigerated storage in the CONTROL lambs, and slightly later in the antioxidant groups (7.3, 7.4 and 7.6 days for CARN006, CARN012 and VITE006 groups, respectively). Thereafter, LL discoloration took place, with CARN006, CARN012 and VITE006 groups showing no differences in C\* when compared to the CONTROL lambs after 14 days of refrigerated storage (Fig. 2a).

The previous statement is in agreement with the higher values (although not significant) of the h\* parameter in the LL muscle after 14 days of refrigerated storage in the CONTROL and CARN006 groups (Fig. 3a), which also indicated that the meat becomes dull faster in these lambs when compared to VITE006 and CARN012 samples (Young & West, 2001). However, it must be stressed that none of these differences in C\* and h\* values reached a level of significance in LL samples. This might have been due to either a lack of effect of treatment or the high color stability of LL muscle.

On the contrary, once again a medium color-stable muscle such as GM showed more promising results when antioxidants were fed to the lambs. Thus, in GM muscle C\*<sub>max</sub> was reached after 5.5 days of



**Table 2**  
Color parameters for each treatment and storage day at 4 °C under modified atmosphere package (35% CO<sub>2</sub>, 35% O<sub>2</sub> and 30% N<sub>2</sub>).

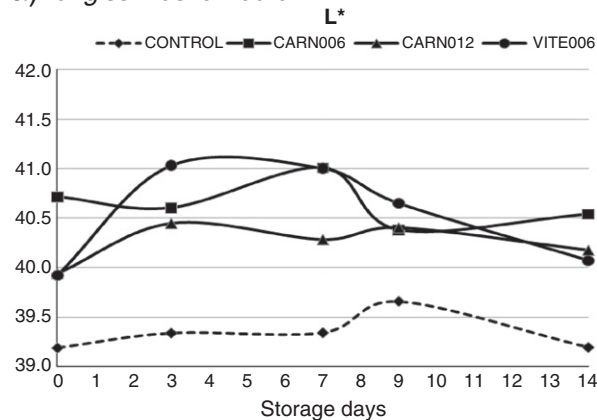
		<i>Longissimus lumborum</i>			<i>Gluteus medius</i>		
		L*	a*	b*	L	a*	b*
Treatment	CONTROL	39.3 <sup>b</sup> ± 1.63	10.3 ± 1.41	9.9 <sup>a</sup> ± 1.08	41.4 ± 1.65	9.8 ± 1.50	10.8 <sup>a</sup> ± 0.85
	CARN006	40.6 <sup>a</sup> ± 2.19	10.2 ± 1.45	10.3 <sup>b</sup> ± 1.21	41.7 ± 1.43	9.9 ± 1.45	11.0 <sup>a</sup> ± 1.12
	CARN012	40.3 <sup>a</sup> ± 1.50	10.2 ± 1.30	9.8 <sup>a</sup> ± 1.18	41.4 ± 1.71	10.1 ± 1.28	10.6 <sup>a</sup> ± 0.94
	VITE006	40.5 <sup>a</sup> ± 2.08	10.2 ± 0.85	9.7 <sup>a</sup> ± 1.25	41.3 ± 1.48	10.1 ± 0.87	10.2 <sup>b</sup> ± 1.09
Day	0	39.9 ± 2.27	9.9 <sup>b</sup> ± 1.07	8.6 <sup>b</sup> ± 1.14	41.1 ± 1.70	10.3 <sup>a</sup> ± 1.31	9.6 <sup>b</sup> ± 1.09
	3	40.4 ± 1.83	10.7 <sup>a</sup> ± 1.17	10.2 <sup>a</sup> ± 0.56	41.8 ± 1.36	10.3 <sup>a</sup> ± 1.07	10.9 <sup>a</sup> ± 0.93
	7	40.4 ± 1.55	10.8 <sup>a</sup> ± 0.85	10.5 <sup>a</sup> ± 0.60	41.4 ± 1.58	10.5 <sup>a</sup> ± 0.78	10.9 <sup>a</sup> ± 0.78
	9	40.3 ± 1.89	10.4 <sup>ab</sup> ± 0.96	10.2 <sup>a</sup> ± 0.71	41.5 ± 1.39	10.0 <sup>a</sup> ± 0.82	11.0 <sup>a</sup> ± 0.59
	14	40.0 ± 2.07	9.2 <sup>c</sup> ± 1.55	10.1 <sup>a</sup> ± 1.60	41.5 ± 1.77	8.9 <sup>b</sup> ± 1.67	10.9 <sup>a</sup> ± 1.09
P-value	Treatment	0.014	0.956	0.021	0.720	0.542	0.001
	Day	0.821	<0.0001	<0.0001	0.585	<0.0001	<0.0001
	Treatment*Day	0.999	0.404	0.293	0.432	0.153	0.940

Mean ± standard deviation; CONTROL group (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnolic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); CARN012 (1.2 g carnolic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); VITE006 (0.6 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); <sup>a,b,c</sup>: different superscripts in the same column indicate statistical differences (P<0.05) among treatments or days.

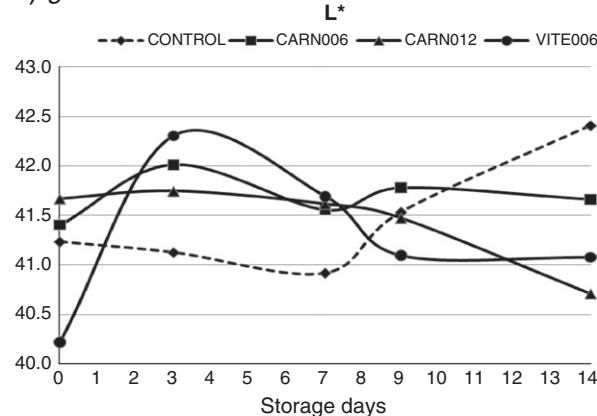
refrigerated storage in the CONTROL lambs, and after 5.9, 7.6 and 7.5 days in CARN006, CARN012 and VITE006 groups, respectively. According to these data meat discoloration would be delayed at least 2 days in medium-color stable muscles from lambs being fed the highest antioxidant doses. Thereafter, a more pronounced decrease in C\* values was observed in CONTROL samples, thus indicating a faster rate of metmyoglobin accumulation in this group when compared to the others (Fig. 2b). This is in agreement with the lower values in h\*

(P<0.05) observed in VITE006 and CARN012 groups (more intense redness) when compared to the CONTROL and CARN006 groups after 14 days of refrigerated storage (Fig. 3b). However it must be stated that at the same doses (CARN006 vs. VITE006), carnolic acid showed a less potent effect than vitamin E on color of GM muscle, and only the highest dose of carnolic acid (CARN012) tended to show similar effects than vitamin E.

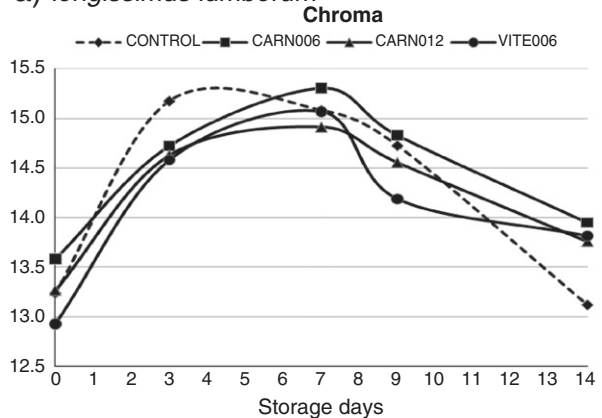
a) *longissimus lumborum*



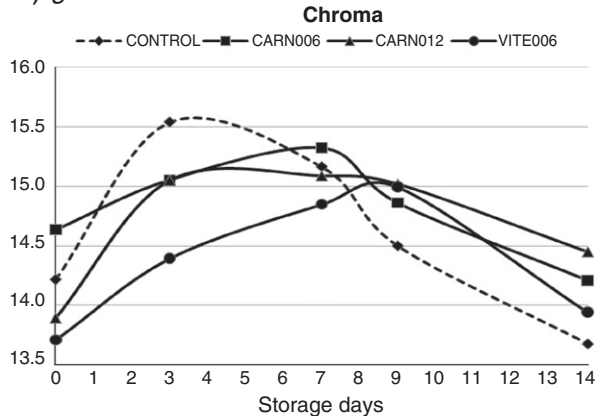
b) *gluteus medius*



a) *longissimus lumborum*

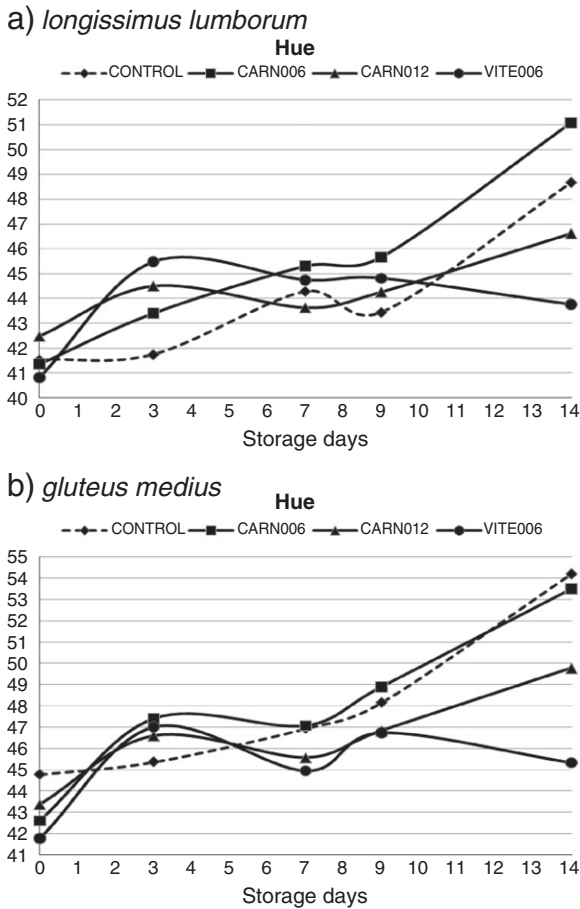


b) *gluteus medius*



**Fig. 1.** Evolution of L\* parameter in *longissimus lumborum* and *gluteus medius* muscles stored at 4 °C under modified atmosphere package (35% CO<sub>2</sub>, 35% O<sub>2</sub> and 30% N<sub>2</sub>). CONTROL group (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnolic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); CARN012 (1.2 g carnolic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); VITE006 (0.6 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of feed concentrate).

**Fig. 2.** Evolution of chroma (C\*) in *longissimus lumborum* and *gluteus medius* muscles stored at 4 °C under modified atmosphere package (35% CO<sub>2</sub>, 35% O<sub>2</sub> and 30% N<sub>2</sub>). CONTROL group (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnolic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); CARN012 (1.2 g carnolic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); VITE006 (0.6 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of feed concentrate).



**Fig. 3.** Evolution of hue ( $h^*$ ) in *longissimus lumborum* and *gluteus medius* muscles stored at 4 °C under modified atmosphere package (35% CO<sub>2</sub>, 35% O<sub>2</sub> and 30% N<sub>2</sub>). CONTROL group (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); CARN012 (1.2 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); VITE006 (0.6 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of feed concentrate).

3.3. pH, ERV and WHC

The pH values of the meat samples are summarized in Table 3. As expected, the pH values significantly decreased in all of the groups ( $P < 0.001$ ) after 45 min and 24 h post-mortem; however, no significant differences ( $P > 0.05$ ) between the groups were detected at any time. Accordingly, no differences in WHC among the groups due to pH variations were expected.

Table 4 summarizes the ERV values throughout the refrigerated storage period. As can be observed, the ERV values became significantly reduced during the storage period ( $P < 0.001$ ) in all the groups, probably due to increases in the bacterial populations (Jay, 1966). However, no differences among groups were detected at any time.

**Table 3**  
pH values at 0 h, 45 min and 24 h post-slaughter in *longissimus thoracis* muscle.

	pH 0 h	pH 45 min	pH 24 h
CONTROL	6.79 <sup>a</sup> ± 0.198	6.43 <sup>b</sup> ± 0.159	5.84 <sup>c</sup> ± 0.040
CARN006	6.87 <sup>a</sup> ± 0.178	6.49 <sup>b</sup> ± 0.192	5.76 <sup>c</sup> ± 0.061
CARN012	6.74 <sup>a</sup> ± 0.371	6.47 <sup>b</sup> ± 0.211	5.82 <sup>c</sup> ± 0.088
VITE006	6.77 <sup>a</sup> ± 0.308	6.55 <sup>b</sup> ± 0.139	5.83 <sup>c</sup> ± 0.060

Mean ± standard deviation; CONTROL group (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); CARN012 (1.2 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); VITE006 (0.6 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); <sup>a,b,c</sup>: different superscripts in the same row indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ) among measuring times.

**Table 4**  
Extract release volume (ERV, ml) of lamb meat samples from *longissimus thoracis* muscle stored at 4 °C under modified atmosphere package (35% CO<sub>2</sub>, 35% O<sub>2</sub> and 30% N<sub>2</sub>) during 14 days.

	0 days	7 days	14 days
CONTROL	36.5 <sup>a</sup> ± 3.42	26.4 <sup>b</sup> ± 7.65	18.6 <sup>c</sup> ± 3.66
CARN006	31.5 <sup>a</sup> ± 5.21	23.4 <sup>b</sup> ± 6.72	18.3 <sup>b</sup> ± 3.99
CARN012	35.6 <sup>a</sup> ± 8.72	21.1 <sup>b</sup> ± 4.49	18.3 <sup>b</sup> ± 4.17
VITE006	33.1 <sup>a</sup> ± 10.20	21.9 <sup>b</sup> ± 2.75	16.6 <sup>b</sup> ± 2.83

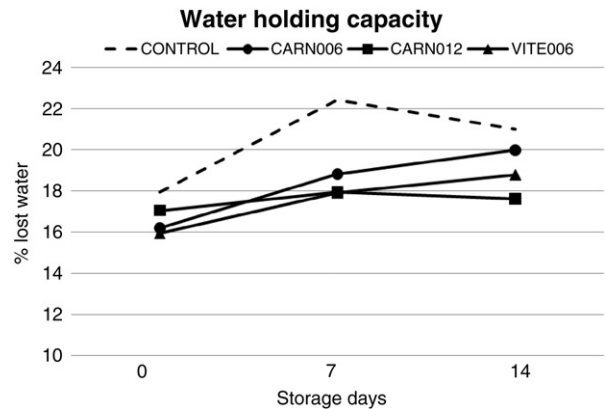
Mean ± standard deviation; CONTROL group (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); CARN012 (1.2 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); VITE006 (0.6 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); <sup>a,b,c</sup>: different superscripts in the same row indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ) among measuring times.

Regarding WHC (Fig. 4), the loss of water in the CONTROL group (20.4%) was not statistically different from that measured in the VITE006 (17.5%) and CARN012 (17.5%) groups after 7 days of refrigerated storage. However, the endogenous proteases (μ-calpain and m-calpain) have been suggested to be protected by antioxidants against post-mortem oxidation, thus allowing their activity (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005), so the water expelled from the intramyofibrillar spaces would be kept within the cells thus reducing drip production (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005). Consequently, the no significant differences in the present study might have been due to either the lack of treatment effect or the high intra-group variability observed in WHC values.

3.4. Microbiological analysis

All of the counts of *B. thermosphacta* were under the detection level ( $< 1.4 \log \text{CFU g}^{-1}$ , data not shown). The means of *Pseudomonas* spp., EC, TVB (4.5 °C) and LAB for each storage time in each treatment are shown in Table 5.

In agreement with the lack of significant differences in ERV (Table 4), microbiological growth for *Pseudomonas* spp., EC (Gram-negative), LAB (Gram-positive) and TVB (4.5 °C) did not seem to be significantly affected by dietary carnosic or vitamin E supplementation. It must be stressed that *Pseudomonas* spp. counts have been found to decrease when rosemary extract is directly added to the meat (Zhang, Kong, Xiong, & Sun, 2009), thus indicating antimicrobial properties of rosemary extract against one of the common meat spoilage bacteria at refrigerated temperatures, i.e. *Pseudomonas* spp. However, it must be considered that *Pseudomonas* spp. is among the most sensitive species to CO<sub>2</sub> (Jay, Loessner, & Golden, 2005), so the MAP used in the present study might have inhibited this microorganism,



**Fig. 4.** Evolution of water holding capacity (WHC) in *longissimus lumborum* muscle stored at 4 °C under modified atmosphere package (35% CO<sub>2</sub>, 35% O<sub>2</sub> and 30% N<sub>2</sub>). CONTROL group (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); CARN012 (1.2 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); VITE006 (0.6 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of feed concentrate).

**Table 5**

Effects of carnosic acid and vitamin E on microbial populations in lamb meat samples from *longissimus thoracis* muscle stored at 4 °C under modified atmosphere package (35% CO<sub>2</sub>, 35% O<sub>2</sub> and 30% N<sub>2</sub>) during 14 days.

		Day 0	Day 7	Day 14
Pseudomonas	CONTROL	2.69 ± 0.905	3.05 ± 1.053	4.40 ± 1.403
	CARN006	2.02 ± 1.110	2.97 ± 0.472	2.97 ± 1.417
	CARN012	1.54 <sup>a</sup> ± 0.660	2.60 <sup>ab</sup> ± 0.521	3.66 <sup>b</sup> ± 0.999
	VITE006	1.29 <sup>a</sup> ± 0.681	2.59 <sup>b</sup> ± 0.683	3.64 <sup>b</sup> ± 0.830
EC	CONTROL	1.04 ± 0.614	1.35 ± 0.296	2.06 ± 1.030
	CARN006	1.18 ± 0.512	1.05 ± 0.287	1.78 ± 0.409
	CARN012	1.42 <sup>ab</sup> ± 0.688	1.01 <sup>a</sup> ± 0.380	2.10 <sup>b</sup> ± 0.378
	VITE006	1.09 <sup>a</sup> ± 0.269	1.21 <sup>a</sup> ± 0.387	2.23 <sup>b</sup> ± 0.440
TVB at 4.5 °C	CONTROL	2.20 <sup>a</sup> ± 1.137	2.54 <sup>b</sup> ± 0.795	3.20 <sup>b</sup> ± 1.797
	CARN006	1.97 ± 0.959	2.70 ± 0.477	3.47 ± 1.815
	CARN012	1.81 <sup>a</sup> ± 0.845	2.53 <sup>ab</sup> ± 0.611	4.03 <sup>b</sup> ± 1.446
	VITE006	1.66 ± 0.893	2.17 ± 0.506	3.60 ± 1.123
LAB	CONTROL	2.74 ± 1.227	2.74 ± 1.233	2.99 ± 2.202
	CARN006	2.54 ± 0.900	2.34 ± 0.707	3.05 ± 1.261
	CARN012	1.89 ± 0.410	2.39 ± 0.390	3.27 ± 1.951
	VITE006	1.71 ± 0.279	1.97 ± 0.839	2.88 ± 2.212

Mean ± standard deviation; CONTROL group (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); CARN012 (1.2 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); VITE006 (0.6 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); <sup>a,b,c</sup>: different superscripts in the same row indicate statistical differences (P<0.05) among refrigerated storage days; Enterobacteriaceae (EC), total viable bacteria (TVB), lactic acid bacteria (LAB).

thus hindering a possible effect of carnosic acid. In any case, the lack of significant differences in the counts of the rest of microorganisms (EC, LAB and TVB, Table 5) also suggests that other compounds (but not carnosic acid) might be responsible for the antimicrobial properties of rosemary (Pintore et al., 2002).

### 3.5. Sensory evaluation

When meats from the lambs fed the CONTROL and CARN012 diets were compared, most of the consumers (17 out of 24, 70.8%, P<0.05, Table 6) could not distinguish between the treatments. Moreover, 62.5% of the consumers preferred the CONTROL samples describing them as more tender and juicy, but this percentage was not statistically different from the percentage of consumers who preferred the CARN012 samples (P>0.05). When meats from lambs fed the CARN006 and VITE006 diets were compared, only eight correct judgments (33.3%) were given. Therefore, the consumers could not distinguish between these samples (P<0.10, Table 6). Likewise, the CARN006 samples were preferred in 10 out of 24 cases (P>0.05), and the VITE006 samples were judged as more tender and tasty. Hence, in both cases, the meat samples from lambs fed carnosic acid (CARN006 and CARN012) were neither clearly distinguished nor preferred by the consumers when they were compared with those from lambs fed either the CONTROL or VITE006 diet.

**Table 6**

Results from sensory analysis carried out to discriminate between cooked meat samples from lambs fed 1) CONTROL and CARN012 and 2) CARN006 and VITE006.

Triangle test	Correct judgments (n = 24)	P-value
CONTROL vs. CARN012	7	0.041
CARN006 vs. VITE006	8	0.100
Preference test	Preferences for B (n = 24)	P-value
CONTROL (A) vs. CARN012 (B)	9	0.221
VITE006 (A) vs. CARN006 (B)	10	0.414

CONTROL group (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); CARN012 (1.2 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of feed concentrate); VITE006 (0.6 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of feed concentrate).

## 4. Conclusion

At the doses used in the present study, it can be concluded that carnosic acid shows a lower antioxidant activity when compared to vitamin E but it seems to be useful to protect meat from discoloration after a long period of time under MAP at refrigerated storage, particularly in low color stable muscles such as *gluteus medius*. Moreover, carnosic acid does not significantly affect meat sensory traits. The microbiological analyses were not conclusive at the doses administered in the present study. Future experiments should include higher rates of carnosic acid in the diet of fattening lambs to check the potential of this compound in further delaying the microbial spoilage of meat.

## Acknowledgments

Financial support received from 'Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León' (Project GR158) is gratefully acknowledged. Raúl Bodas and Nuria Prieto have a JAE-Doc contract and Lara Morán was supported by a JAE-Predoc grant from the CSIC under the program 'Junta para la Ampliación de Estudios'. We would also like to thank M. J. Jordán from IMIDA (Murcia, Spain) for the carnosic acid quantification by HPLC of the rosemary extract used in the study.

## References

- AOAC (2003). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (17th ed.). Gaithersburg, MD: AOAC International.
- Boleman, S. J., Boleman, S. L., Miller, R. K., Taylor, J. F., Cross, H. R., Wheeler, T. L., et al. (1997). Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. *Journal of Animal Science*, 75, 1521–1524.
- Botsoglou, N. A., Govaris, A., Giannenas, I., Botsoglou, E., & Papageorgiou, G. (2007). The incorporation of dehydrated rosemary leaves in the rations of turkeys and their impact on the oxidative stability of the produced raw and cooked meat. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(4), 312–320.
- CIE (1986). *CIE Colorimetry Publication CIE 1 15, 2*. (2nd ed.). Vienna, Austria: Central Bureau of the Commission Internationale l'Eclairage.
- Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., Sayas-Barberá, E., & Aranda-Catalá, V. (2000). Characterization of the different states of myoglobin in pork using color parameters and reflectance ratios. *Journal of Muscle Foods*, 11(3), 157–167.
- Galobart, J., Barroeta, A. C., Baucells, M. D., Codony, R., & Ternes, W. (2001). Effect of dietary supplementation with rosemary extract and alpha-tocopheryl acetate on lipid oxidation in eggs enriched with omega3-fatty acids. *Poultry Science*, 80(4), 460–467.
- Hernández-Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M. E., & Legarreta, I. G. (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and color of model raw pork batters. *Meat Science*, 81(2), 410–417.
- Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49(4), 447–457.
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71(1), 194–204.
- ISO 4120 (1983). *Sensory analysis—Methodology—Triangle test*.
- Jay, J. M. (1966). Response of the extract-release volume and water-holding capacity phenomena to microbiologically spoiled beef and aged beef. *Applied Microbiology*, 14(4), 492–496.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology* (7 ed.). New York: Springer Science+Business Media.
- Johansen, J., Aastveit, A. H., Egelandsdal, B., Kvaal, K., & Røe, M. (2006). Validation of the EUROP system for lamb classification in Norway; repeatability and accuracy of visual assessment and prediction of lamb carcass composition. *Meat Science*, 74(3), 497–509.
- Jordán, M. J., Moñino, M. I., Martínez, C., Lafuente, A., & Sotomayor, J. A. (2010). Introduction of distillate Rosemary leaves into the diet of the Murciano-Granadina goat: Transfer of polyphenolic compounds to goats' milk and the plasma of suckling goat kids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8265–8270.
- Lan, J., & Jiang, D. H. (1997). Desferrioxamine and vitamin E protect against iron and MPTP-induced neurodegeneration in mice. *Journal of Neural Transmission*, 104(4), 469–481.
- Linares, M. B., Bórnez, R., & Vergara, H. (2008). Effect of stunning systems on meat quality of Manchego suckling lamb packed under modified atmospheres. *Meat Science*, 78(3), 279–287.
- López-Bote, C. J., Daza, A., Soares, M., & Berges, E. (2001). Dose-response effect of dietary vitamin E concentration on meat quality characteristics in light-weight lambs. *Animal Science*, 73(3), 451–458.

- McBride, N., Hogan, S. A., & Kerry, J. P. (2007). Comparative addition of rosemary extract and additives on sensory and antioxidant properties of retail packaged beef. *International Journal of Food Science and Technology*, *42*(10), 1201–1207.
- McKenna, D. R., Mies, P. D., Baird, B. E., Pfeiffer, K. D., Ellebracht, J. W., & Savell, J. W. (2005). Biochemical and physical factors affecting discoloration characteristics of 19 bovine muscles. *Meat Science*, *70*(4), 665–682.
- Moñino, I., Martínez, C., Sotomayor, J., Lafuente, A., & Jordán, M. (2008). Polyphenolic transmission to Segureño lamb meat from ewes' diet supplemented with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(9), 3363–3367.
- Munné-Bosch, S., Mueller, M., Schwarz, K., & Alegre, L. (2001). Diterpenes and antioxidative protection in drought-stressed *Salvia officinalis* plants. *Journal of Plant Physiology*, *158*(11), 1431–1437.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S. L., & Garrido, M. D. (2010). Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Influence on lamb meat quality. *Meat Science*, *84*(1), 23–29.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., et al. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oil from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, *17*(1), 15–19.
- Rodríguez-Calleja, J. M., García-López, M. L., Santos, J. A., & Otero, A. (2005). Development of the aerobic spoilage flora of chilled rabbit meat. *Meat Science*, *70*(2), 389–394.
- Rodríguez-Calleja, J. M., Santos, J. A., Otero, A., & García-López, M. L. (2004). Microbiological quality of rabbit meat. *Journal of Food Protection*, *67*(5), 966–971.
- Samman, S., Sandstrom, B., Toft, M. B., Bukhave, K., Jensen, M., Sorensen, S. S., et al. (2001). Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *73*(3), 607–612.
- SAS (1999). *1999 SAS, SAS/STAT(R) user's guide (version 8), previous term*. Cary, NC, USA: SAS Publishing.
- Stone, H., & Sidel, J. L. (1993). *Sensory evaluation practices*. San Diego, CA: Academic Press Talmant.
- Young, O. A., & West, J. (2001). Meat color. In Y. H. Huy, W. Nip, R. W. Rogers, & O. A. Young (Eds.), *Meat science and applications* (pp. 36–69). New York: Marcel Dekker Inc.
- Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y. L., & Sun, X. (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science*, *81*(4), 686–692.



## **CAPÍTULO 4**

*Meat texture and antioxidant status are improved when carnosic acid is included in the diet of fattening lambs*

---



## Meat texture and antioxidant status are improved when carnosic acid is included in the diet of fattening lambs

Lara Morán, Sonia Andrés\*, Raúl Bodas, Nuria Prieto, F. Javier Giráldez

Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), Finca Marzanas, E-24346 Grulleros, León, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 November 2011

Received in revised form 23 February 2012

Accepted 25 February 2012

#### Keywords:

Antioxidant

Texture

Protein carbonyl

Oxysterol

Carnosic acid

Rosemary

### ABSTRACT

Thirty-two Merino lambs fed barley straw and a concentrate alone (CONTROL group) or enriched with carnosic acid [0.6 g kg<sup>-1</sup> dry matter (DM), CARN006 group; 1.2 g kg<sup>-1</sup> DM, CARN012 group] or vitamin E (0.6 g kg<sup>-1</sup> DM, VITE006 group) were used to assess the effect of these antioxidant compounds on meat quality. After being fed the experimental diets for at least 5 weeks, the animals were slaughtered with the 25 kg intended body weight and the different muscles (*longissimus lumborum*; LL, *gluteus medius*; GM) were sliced and kept refrigerated under modified atmosphere packaging during 0, 7 and 14 days. The results indicate that carnosic acid seemed to be useful to delay lipid peroxidation in a medium colour-stable muscle such as GM, but this effect was lower than that observed when vitamin E was supplemented to fattening lambs. On the contrary, meat texture and protection against cholesterol oxidation were equally improved with both compounds.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The shelf life of meat and meat products is seriously shortened by two main factors: microbial spoilage and lipid peroxidation. Therefore, any finding focused on delaying either of these processes is relevant for the meat industry. The high quality meat demanded by the consumer in developed countries (Boleman et al., 1997) must be tender and free of chemically synthesised additives, so the inclusion of natural compounds (plant origin) in animal feedstuff, thus avoiding any further manipulation of the meat, is suitable to improve all these quality attributes.

In this context, special attention has been paid to the effects promoted by rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), an herb commonly used as a flavouring agent. The bioactive properties of this herb have been attributed to the phenolic compounds in rosemary plants (Hernández-Hernández, Ponce-Alquicira, Jaramillo-Flores, & Legarreta, 2009). These compounds have demonstrated antimicrobial and antioxidant activities when added to food as additives (McBride, Hogan, & Kerry, 2007), but they have also shown beneficial effects on eggs, milk and meat products when included in the diet of the animal (Botsoglou, Govaris, Giannenas, Botsoglou, & Papageorgiou, 2007; Galobart, Barroeta, Baucells, Codony, & Ternes, 2001; Jordán, Moñino, Martínez, Lafuente, & Sotomayor, 2010; Nieto, Díaz, Bañón, & Garrido, 2010). The main phenolic compound retained in animal tissues after the

consumption of rosemary is carnosic acid (Moñino, Martínez, Sotomayor, Lafuente, & Jordán, 2008), so it can be hypothesised that the antioxidant properties on meat quality are mainly due to the increased concentration of this phenolic compound in the muscle. However, the amount of carnosic acid which must be fed to the animals to have beneficial effects on meat quality have not been quantified. It must also be considered that the concentration of phenolic compounds in the plants varies with maturity stage or climatic conditions, mainly drought (Munné-Bosch, Mueller, Schwarz, & Alegre, 2001). This is why feeding rosemary extracts with a known richness of carnosic acid, instead of intact plants will allow recommendations to be established about the amount of rosemary which should be fed to animals according to its level of carnosic acid.

The aim of the present study was to investigate the texture and antioxidant properties of meat when two different doses of rosemary extract (48% carnosic acid) were included in the diet of lambs. Likewise, vitamin E (one of the most frequently used antioxidants in animal nutrition) was included in another group as a positive control.

### 2. Material and methods

#### 2.1. Animals and diets

Before the commencement of the trial, 32 male merino lambs, aged a month and a half were treated with ivermectin (Ivomec, Merial Labs, Barcelona, Spain) and vaccinated against enterotoxaemia (Miloxan, Merial Labs, Barcelona, Spain).

\* Corresponding author. Tel.: +34 987 307 05; fax: +34 987 317 161.  
E-mail address: [sonia.andres@eae.csic.es](mailto:sonia.andres@eae.csic.es) (S. Andrés).

After stratification on the basis of body weight (average BW,  $15.2 \pm 0.749$  kg), the lambs were allocated randomly to four different groups (8 lambs per treatment): a control group (CONTROL), a second group fed a single dose ( $0.6$  g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate, CARN006) of carnosic acid (Shaanxi Sciphar Biotechnology Co., Ltd, Xi'an, China; carnosic acid  $470$  g/kg dry matter (DM), FAD  $12.65$  g/kg DM, ash  $16.13$  g/kg DM), a third group fed a double dose of carnosic acid ( $1.2$  g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate, CARN012), and a fourth group fed vitamin E ( $\alpha$ -tocopheryl acetate  $50\%$ , Industrias de Alimentación Animal, Spain) at a rate of  $0.6$  g  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate (VITE006, equivalent to  $900$  IU of vitamin E  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate). Animals were then penned individually. All handling practises followed the recommendations of the European Council Directive 86/609/EEC for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (EEC, 1986), and all of the animals were able to see and hear other lambs.

After 7 days of adaptation to the basal diet comprised of concentrate ( $50\%$  barley,  $20\%$  soybean meal,  $15\%$  maize,  $8\%$  wheat,  $4\%$  molasses and  $3\%$  mineral premix; DM  $888$  g  $\text{kg}^{-1}$ , CP  $178$  g  $\text{kg}^{-1}$  DM, NDF  $134$  g  $\text{kg}^{-1}$  DM, and ash  $56$  g  $\text{kg}^{-1}$  DM) and barley straw (DM  $913$  g  $\text{kg}^{-1}$ , CP  $35$  g  $\text{kg}^{-1}$  DM, NDF  $757$  g  $\text{kg}^{-1}$  DM, ash  $55$  g  $\text{kg}^{-1}$  DM), all the lambs were fed barley straw and the corresponding concentrate feed alone (CONTROL group) or supplemented either with vitamin E or carnosic acid  $48\%$  (the carnosic acid richness of the extract was measured by HPLC according to Moñino et al., 2008) during 7 weeks. Concentrate ( $35$  g  $\text{kg}^{-1}$  BW  $\text{day}^{-1}$ ) and forage ( $200$  g  $\text{day}^{-1}$ ) were weighed and supplied in separate feeding troughs at 9:00 a.m. every day, and fresh drinking water was always available. The orts were also weighed daily, and samples were collected for subsequent analyses.

## 2.2. Slaughter procedure, packaging, storage and sampling

The animals were slaughtered on four different days, two lambs per group each day. The lambs were selected each day according to their weight ( $25$  kg intended body weight) and slaughtered by stunning and exsanguination from the jugular vein; they were then eviscerated and skinned. The hot carcass of each lamb was weighed, chilled at  $4$  °C for 24 h and weighed again. The *longissimus lumborum* (LL) and *gluteus medius* (GM) muscles were removed from the right and left carcass sides.

The LL and GM muscles were cut into slices  $2.5$  cm thick, placed on impermeable polypropylene trays (a tray per opening day containing both LL and GM slices from only one animal) and wrapped with ML40-G bags (Krehalon; Proveedora Hispano Holandesa S.A., Barcelona, Spain), which were immediately modified-atmosphere packaged (MAP) using a tabletop Multivac A300 packaging machine (Multivac Verpackungsmaschinen, Wolfertschwenden, Germany). The air in the bags was replaced by a commercial gas blend intended for red and poultry meats consisting of  $35\%$   $\text{CO}_2$ ,  $35\%$   $\text{O}_2$  and  $30\%$   $\text{N}_2$ , with a gas: meat volume ratio of about  $2.5:1$ . The ML40-G bags had  $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$  transmission rates of  $20$  and  $100$   $\text{mL m}^{-2} 24 \text{ h}^{-1}$ , respectively, at  $23$  °C and  $80\%$  relative humidity. All packages were stored under simulated retail display conditions ( $12$  h daily illumination and  $3 \pm 1$  °C) and the air temperature was monitored using a Testo175-T2 data logger (Instrumentos Testo S.A., Cabrils, Barcelona, Spain). These trays were opened after 0, 7 and 14 days. On each sampling day, the concentrations of  $\text{CO}_2$  and  $\text{O}_2$  inside each tray were determined using a CheckMate 9900 (PBI Dansensor, Denmark). LL and GM raw meat samples were frozen for thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) analysis and protein oxidation.

## 2.3. TBARS analysis

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined on pre-thawed, raw LL and GM samples aged for 0, 7 and 14 days under MAP according to the following procedure. The acid hydrolysis

of TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane) was performed, thus yielding malondialdehyde (main product of lipid peroxidation) to construct the standard curve. Meat samples were thawed and a piece of  $2.5$  g was cut and homogenised for 30 s at  $13,000$  rpm with  $20$  mL of distilled water using a T25 digital Ultraturrax provided with a 18 G dispersing tool (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Germany). Thereafter,  $5$  mL of  $25\%$  trichloroacetic acid (TCA) were added, and then centrifuged at  $12,100 \times g$  during 15 min at  $4$  °C, filtered and  $3.5$  mL transferred to a  $10$  mL screw cap tube with  $1.5$  mL of thiobarbituric acid ( $0.6\%$ ). Samples were heated at  $70$  °C for 30 min and, after being cooled in ice for 10 min absorbance was measured at  $532$  nm (Schimadzu 160-UV). The results were expressed as  $\mu\text{g MDA g}^{-1}$  meat.

## 2.4. Protein and cholesterol oxidation

Protein oxidation (P-OX) was performed on raw LL samples aged for 7 days under MAP. This procedure was carried out by the dinitrophenylhydrazine (DNPH) method using the protein carbonyl enzyme immunoassay kit provided by Deltaclon S.L. (Spain).

From each opened tray another slice of GM was cooked in a grill at  $180$  °C; a temperature probe was inserted in the core of the samples, and the sample then cooked to an internal temperature of  $70$  °C. Finally, GM samples were cooled at  $4$  °C for 30 min, and then freeze-dried for oxysterols analysis. Cholesterol oxidation products (COPs), also called oxysterols, were determined according to Grau, Codony, Grimpa, Baucells, and Guardiola (2001) on cooked GM samples aged for 7 days under MAP. Briefly, lipids were extracted from  $1$  g of cooked and freeze-dried GM samples using a mixture chloroform/methanol ( $2:1$ , v/v) (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957).  $19$ -hydroxycholesterol ( $19$ -HC) was used as an internal standard. Ten mL of  $1.5$  methanolic KOH was then added and the mixture was kept in an orbital shaker for 20 h at room temperature under  $\text{N}_2$  atmosphere and darkness to complete the cold saponification. The unsaponifiable material was extracted three times with diethyl ether in a separating funnel, and then purified by solid-phase extraction (SPE) according to Guardiola, Codony, Rafecas, and Boatella (1995). COPs were derivatised to trimethylsilyl (TMS) ethers prior to gas chromatographic (GC) analysis on an Agilent 7890 Series gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) provided with a FID detector by splitless injection into a VF-5ms CP8947 capillary column ( $50 \text{ m} \times 250 \mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m}$ , Varian, Palo Alto, CA, USA). Chromatographic conditions were as follows: injection volume  $1.5 \mu\text{l}$ ; initial oven temperature  $75$  °C, to  $250$  °C at  $30$  °C/min, to  $290$  °C at  $8$  °C/min, and to  $292$  °C at  $0.05$  °C/min; injector and detector temperatures were  $250$  and  $280$  °C, respectively. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of  $1$  mL/min. The oxysterols  $7\alpha$ -hydroxycholesterol ( $7\alpha$ -HC),  $7\beta$ -hydroxycholesterol ( $7\beta$ -HC),  $5,6\alpha$ -epoxycholesterol ( $\alpha$ -CE),  $5,6\beta$ -epoxycholesterol ( $\beta$ -CE), cholestanetriol (CT),  $25$ -hydroxycholesterol ( $25$ -HC) and  $7$ -ketocholesterol ( $7$ -KC) were identified by comparing their retention times with those of authentic standards (Steraloids, Inc., UK) and quantified with the internal standard.

## 2.5. Texture (Slice Shear Force, SSF)

From each opened tray another slice of LL was cooked in a grill at  $180$  °C; a temperature probe was inserted in the core of the samples, and the sample cooked to an internal temperature of  $70$  °C. Finally, LL samples were cooled at  $4$  °C for 30 min, and then frozen at  $-30$  °C until texture analysis. LL cooked slices aged during 0, 7 and 14 days under MAP were used to measure the texture values. A slice  $1$ -cm thick,  $5$ -cm long parallel to the muscle fibres was cut and placed in the single-beam Lloyd Texture Analyser (Lloyd Instruments, UK) so that the blade shears perpendicular to the muscle fibres along the  $5$ -cm dimension of the slice. Maximum shear force was interpolated by plotting the force-time curve and measuring the peak shear force. The peak force was the Slice Shear Force (SSF) for the sample

(McKenna, King, & Savell, 2004; Shackelford, Wheeler, & Koohmaraie, 1999).

## 2.6. Statistical analysis

All the data were subjected to one-way analysis of variance with diet as the only source of variation using the GLM procedure of SAS package (SAS, 1999).

## 3. Results

### 3.1. TBARS analysis

Fig. 1 summarises the results of LL and GM muscles when lipid oxidation (TBARS) was studied after packaging in a controlled gas mixture for 0, 7 or 14 days.

The group being fed vitamin E (positive control) showed significantly lower TBARS values when compared to the CONTROL group in both LL and GM muscles at all storage periods (0, 7, and 14 days of refrigerated storage under a high oxygen MAP). As far as carnosic acid is concerned, a significant decrease ( $P < 0.05$ ) only in the LL of the CARN012 group was observed after 14 days of refrigerated storage when compared to the CONTROL group, whereas no significant effect ( $P > 0.05$ ) on TBARS values in LL muscle was detected at any storage time in the CARN006 group. In the GM muscle TBARS values were lower in both groups fed carnosic acid after 7 and 14 days when compared to the CONTROL group.

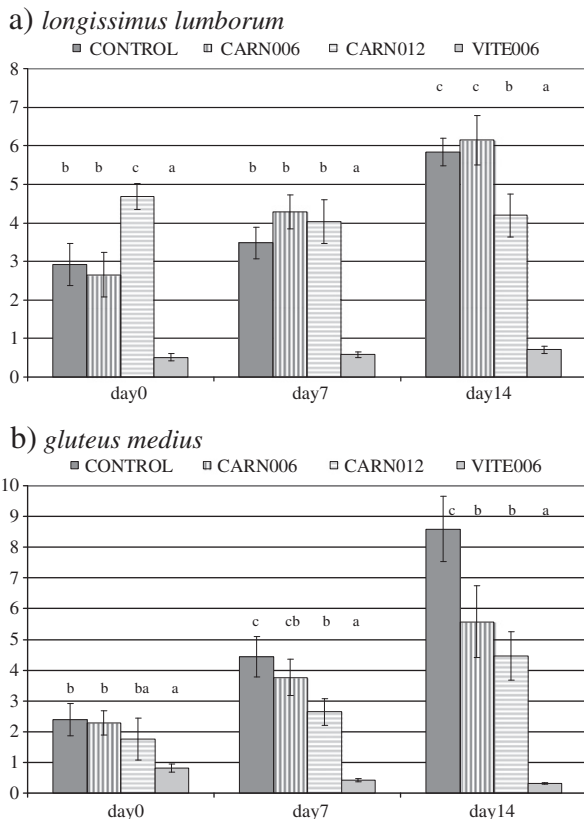


Fig. 1. Mean values  $\pm$  standard error of the mean for TBARS ( $\mu\text{g MDA g}^{-1}$  meat) after 0, 7 and 14 days of refrigerated storage at 4 °C under modified atmosphere package (35%  $\text{CO}_2$ , 35%  $\text{O}_2$  and 30%  $\text{N}_2$ ). CONTROL group (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate); CARN012 (1.2 g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate); VITE006 (0.6 g  $\alpha$ -tocopheryl acetate  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate); <sup>a, b, c</sup>: different superscripts in the same day indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ) between treatments.

### 3.2. Protein and cholesterol oxidation

Table 1 summarises the P-OX results when the protein carbonyl content was measured by the dinitrophenylhydrazine (DNPH) method. As can be observed, the diet had no significant effect on this parameter for raw LL samples aged for 7 days under MAP.

Regarding cholesterol oxidation products (COPs, Table 1), significantly higher values ( $P < 0.05$ ) were observed for 7 $\alpha$ -HC, 7 $\beta$ -HC,  $\alpha$ -CE, 7-KC and total COPs in the CONTROL samples when compared to the antioxidant groups. On the contrary,  $\beta$ -CE and CT showed no significant differences between groups, whereas 25-HC was not detected. The low levels of the most atherogenic compounds (CT and 25-HC) in all of the cooked meat samples, even in the CONTROL group, are remarkable.

### 3.3. Texture

Fig. 2 shows the texture values in samples aged for 0, 7 and 14 days under MAP.

Significantly lower values ( $P < 0.0001$ ) for SSF were detected when antioxidant groups (CARN006, CARN012 and VITE006) were compared to the CONTROL at all sampling times (0, 7 and 14 days), with no significant differences between CARN006, CARN012 or VITE006 samples.

## 4. Discussion

A previous study (López-Bote, Daza, Soares, & Berges, 2001) has described a significant positive effect on lipid oxidation in meat at low supplementation levels of vitamin E (270 mg  $\text{kg diet}^{-1}$ ); however, the protective effects at different storage times were optimised at a dietary inclusion level of 550–625 mg  $\alpha$ -tocopheryl acetate  $\text{kg}^{-1}$  diet. Consequently, in the present study vitamin E was supplied at 0.6 g  $\text{kg}^{-1}$  of concentrated feed (VITE006 group). A similar dose of carnosic acid was supplied to another group (CARN006) to compare the effectiveness of both components. The last group was fed a double dose of carnosic acid (CARN012) in order to clarify if this substance showed a dose dependent effect at meat level.

### 4.1. TBARS analysis

Faustman and Cassens (1990) reported a strong relationship between lipid oxidation and myoglobin oxidation. This is the reason why TBARS analysis was performed in two muscles with different

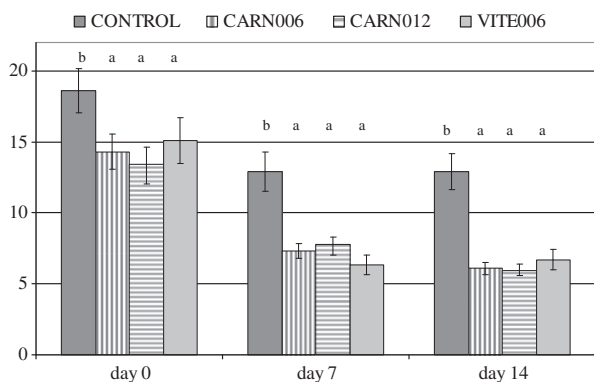
Table 1

Carbonyl protein content (P-OX; nmol  $40 \text{ mg}^{-1}$  raw meat; *longissimus lumborum*) and oxysterols content ( $\mu\text{g g}^{-1}$  cooked meat; *gluteus medius*) in meat samples after 7 days of refrigerated storage at 4 °C under modified atmosphere package (35%  $\text{CO}_2$ , 35%  $\text{O}_2$  and 30%  $\text{N}_2$ ).

	CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006	sed	p-value
P-OX	0.689	0.679	0.687	0.741	0.0830	0.873
7 $\alpha$ -HC	0.486 <sup>b</sup>	0.310 <sup>a</sup>	0.261 <sup>a</sup>	0.232 <sup>a</sup>	0.0608	0.023
7 $\beta$ -HC	0.630 <sup>b</sup>	0.405 <sup>a</sup>	0.324 <sup>a</sup>	0.343 <sup>a</sup>	0.0722	0.018
Unknown	0.377 <sup>b</sup>	0.114 <sup>a</sup>	0.076 <sup>a</sup>	0.145 <sup>a</sup>	0.0443	<0.001
$\beta$ -CE	0.626	0.474	0.493	0.483	0.0921	0.481
$\alpha$ -CE	0.290 <sup>b</sup>	0.134 <sup>a</sup>	0.144 <sup>a</sup>	0.139 <sup>a</sup>	0.0482	0.042
CT	0.055	0.040	0.049	0.036	0.0283	0.962
25-HC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	–	–
7-KC	1.116 <sup>b</sup>	0.306 <sup>a</sup>	0.345 <sup>a</sup>	0.300 <sup>a</sup>	0.2034	0.018
$\Sigma$ COPs	3.022 <sup>b</sup>	1.706 <sup>a</sup>	1.666 <sup>a</sup>	1.428 <sup>a</sup>	0.2606	<0.001

7 $\alpha$ -HC, 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol; 7 $\beta$ -HC, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol;  $\alpha$ -CE, 5,6 $\alpha$ -epoxycholesterol;  $\beta$ -CE, 5,6 $\beta$ -epoxycholesterol; CT, cholestanetriol; 25-HC, 25-hydroxycholesterol; 7-KC, 7-ketocholesterol; COPs, cholesterol oxidation products; CONTROL group (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate); CARN012 (1.2 g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate); VITE006 (0.6 g  $\alpha$ -tocopheryl acetate  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate); <sup>a, b</sup>: different superscripts in the same row indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ) between treatments; n.d., non-detectable.





**Fig. 2.** Mean values  $\pm$  standard error of the mean for Slice Shear Force (SSF,  $\text{kg cm}^{-2}$ ) in cooked *longissimus lumborum* samples after 0, 7 and 14 days of refrigerated storage at 4 °C under modified atmosphere package (35%  $\text{CO}_2$ , 35%  $\text{O}_2$  and 30%  $\text{N}_2$ ). CONTROL group (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnosis acid  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate); CARN012 (1.2 g carnosis acid  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate); VITE006 (0.6 g  $\alpha$ -tocopheryl acetate  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate); <sup>a, b</sup>; different superscripts in the same day indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ) between treatments.

colour stability: a high (LL) and medium (GM) colour-stable muscle (McKenna et al., 2005). The increments in lipid oxidation as a consequence of display time could be reduced by the highest dose of carnosis acid (CARN012) in a medium colour stable muscle, GM (days 7 and 14, Fig. 1b), whereas this effect was only significant after 14 days in a high colour stable muscle, LL (day 14, Fig. 1a). No explanation can be found for the high levels in TBARS values observed from the beginning of refrigerated storage in the LL muscle of the CARN012 group (day 0, Fig. 2).

#### 4.2. Protein and cholesterol oxidation

Existing literature suggests that the oxidation of proteins does not follow the same pattern as lipid oxidation. Thus, some phenolic-rich plant (rosemary) and fruit (apple) extracts have been shown to inhibit protein carbonylation in meat, but the antioxidant effect was in general lower than that displayed against lipid oxidation (Estévez, 2011). Additionally, some polyphenols have been reported to promote protein carbonylation (Estévez, 2011). However, the present results differ from those observed by other authors when vitamin E was supplemented to cows (Rowe, Maddock, Lonergan, & Huff-Lonergan, 2004). These authors reported a significant correlation between total protein carbonyls and the instrumental texture (Warner-Bratzler shear force) of vacuum-packed beef muscles. Therefore, in the present experiment the lack of significant differences between treatments (even between CONTROL and VITE006) might indicate that proteins were highly oxidised after 7 days of refrigerated storage under a high oxygen MAP, which holds a potential risk for protein oxidation (Lund, Hviid, & Skibsted, 2007; Zakrys, O'Sullivan, Allen, & Kerry, 2009). Consequently, any initial difference promoted by the antioxidants might have been hidden by the long period of time under this high oxygen MAP.

Regarding oxysterol content in meat samples, these compounds can be absorbed through the intestinal tract into the blood stream, thus increasing the susceptibility of the consumer to coronary heart disease. Since the main source of oxysterols in meats is heat processing, these substances were determined in cooked meat samples (cooked *gluteus medius* samples after 7 days of refrigerated storage under MAP). Vitamin E supplemented either to pigs (Eder, Müller, Kluge, Hirche, & Brandsch, 2005) or chickens (Grau et al., 2001) has been demonstrated to be effective in reducing oxysterol content in cooked meat samples. This is in agreement with the results observed in the present study, where both vitamin E and carnosis acid seemed to protect cholesterol against oxidation. Broncano, Petró, Parra, and

Timón (2009) reported similar levels of oxysterol content in pork; however they are not fully comparable to the results of the present study since they were obtained in cooked meat with lower lipid oxidation (these meat samples were not kept in refrigerated storage for several days). It must be remarked, however, that oxysterol levels were much lower in the present study when compared to those reported for pigs fed unsaturated fats whose meat was cooked after being stored at 4 °C for 9 days (Rey et al., 2001). All the samples (even those of the CONTROL group) showed very low levels of CT and 25-HC (Table 1).

It has been suggested that hydroperoxides of polyunsaturated fatty acids formed during lipid oxidation might be necessary to initiate cholesterol oxidation, so oxysterol content might be synergistically increased by unsaturated fat (Smith, 1987). In this sense, biohydrogenation in the rumen undergone by the unsaturated fatty acids consumed by the lambs might have protected their meat against cholesterol oxidation during refrigerated storage and later on during cooking. This is particularly important for the consumer concerned with healthier meat products, since many COPs, and especially CT and 25-HC, have been described as atherogenic oxysterols, responsible for acute injury to the endothelium (Peng, Taylor, Hill, & Morin, 1985; Taylor, Peng, Werthessen, Tham, & Lee, 1979).

#### 4.3. Texture

The lower values ( $P < 0.0001$ ) for SSF in all the antioxidant groups when compared to the CONTROL (Fig. 2) might have been due to the protection exerted by both vitamin E and carnosis acid against the oxidation of endogenous proteases during the aging process. In this sense, the proteolysis of key cytoskeletal proteins (such as desmin) can reduce the amount of water forced from the intra- and extramyofibrillar spaces of the cell as rigour progresses (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005). These cytoskeletal and other myofibrillar proteins are known  $\mu$ -calpain substrates, an enzyme highly susceptible to oxidation due to histidine and SH-containing cysteine residues at its active site (similar to m-calpain). Therefore the higher values of SSF for CONTROL samples when compared to the antioxidant groups might have been partially due to a reduced functionality of  $\mu$ -calpain and m-calpain as a consequence of the oxidation undergone by the post-mortem muscle during the aging process, which might have reduced the juiciness and tenderness of the meat (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005; Xiong, 2000). These results agree with the higher water holding capacity reported for the meat of the antioxidant groups (Morán et al., 2012). At the same time, these results (Fig. 2) do not disagree with the lack of significant differences in P-OX after 7 days of refrigerated storage (Table 1), since endogenous proteases were expected to catalyse reactions during the first days of the aging process; thereafter, they also might have been oxidised.

A second mechanism to explain the toughening of meat is related to the oxidation of myofibrillar proteins, which promotes aggregation and cross-linking (Estévez, 2011; Huff Lonergan, Zhang, & Lonergan, 2010). Consequently, carnosis acid accumulated in the muscle during the feeding of the lambs might have delayed this oxidation process. However, it must be noted that this has not been confirmed.

#### 5. Conclusion

At the doses used in the present study, it can be concluded that carnosis acid supplemented to fattening lambs seems to protect meat from lipid peroxidation after a long period of time under MAP at refrigerated storage, particularly in medium colour stable muscles such as *gluteus medius*. It must be noted, however, that this effect is lower than that observed when vitamin E is supplemented. Texture and protection against cholesterol oxidation seem to be equally improved by both compounds.

## Acknowledgements

Financial support received from project AGL2010-19094 is gratefully acknowledged. Raúl Bodas and Nuria Prieto have a JAE-Doc contract and Lara Morán was supported by a JAE-Predoc grant from the CSIC under the programme 'Junta para la Ampliación de Estudios' (CSIC-European Social Fund). We would also like to thank M. J. Jordán from IMIDA (Murcia, Spain) for the carnosic acid quantification by HPLC of the rosemary extract used in the study and Dave Ross from SAC (Edinburgh, UK) for his technical support to measure texture.

## References

- Boleman, S. J., Boleman, S. L., Miller, R. K., Taylor, J. F., Cross, H. R., Wheeler, T. L., et al. (1997). Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. *Journal of Animal Science*, 75(6), 1521–1524.
- Botsoglou, N. A., Govaris, A., Giannenas, I., Botsoglou, E., & Papageorgiou, G. (2007). The incorporation of dehydrated rosemary leaves in the rations of turkeys and their impact on the oxidative stability of the produced raw and cooked meat. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(4), 312–320.
- Broncano, J. M., Petrón, M. J., Parra, V., & Timón, M. L. (2009). Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of free cholesterol oxidation products (COPs) in Latissimus dorsi muscle of Iberian pigs. *Meat Science*, 83(3), 431–437.
- Eder, K., Müller, G., Kluge, H., Hirche, F., & Brandsch, C. (2005). Concentrations of oxysterols in meat and meat products from pigs fed diets differing in the type of fat (palm oil or soybean oil) and vitamin E concentrations. *Meat Science*, 70(1), 15–23.
- EEC (1986). Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*, L358, 1.29.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyl in meat systems: A review. *Meat Science*, 89(3), 259–279.
- Faustman, C., & Cassens, R. G. (1990). The biochemical basis for discoloration in fresh meat: A review. *Journal of Muscle Foods*, 1(3), 217–243.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Galobart, J., Barroeta, A. C., Baucells, M. D., Codony, R., & Ternes, W. (2001). Effect of dietary supplementation with rosemary extract and alpha-tocopheryl acetate on lipid oxidation in eggs enriched with omega3-fatty acids. *Poultry Science*, 80(4), 460–467.
- Grau, A., Codony, R., Grimpa, S., Baucells, M., & Guardiola, F. (2001). Cholesterol oxidation in frozen dark chicken meat: Influence of dietary fat source, and alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Meat Science*, 57(2), 197–208.
- Guardiola, F., Codony, R., Rafecas, M., & Boatella, J. (1995). Comparison of three methods for the determination of oxysterols in spray-dried egg. *Journal of Chromatography. A*, 705(2), 289–304.
- Hernández-Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M. E., & Legarreta, I. G. (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, 81(2), 410–417.
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71(1), 194–204.
- Huff Lonergan, E., Zhang, W., & Lonergan, S. M. (2010). Biochemistry of postmortem muscle; lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, 86(1), 184–195.
- Jordán, M. J., Moñino, M. I., Martínez, C., Lafuente, A., & Sotomayor, J. A. (2010). Introduction of distillate Rosemary leaves into the diet of the Murciano-Granadina goat: Transfer of polyphenolic compounds to goats' milk and the plasma of suckling goat kids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8265–8270.
- López-Bote, C. J., Daza, A., Soares, M., & Berges, E. (2001). Dose-response effect of dietary vitamin E concentration on meat quality characteristics in light-weight lambs. *Animal Science*, 73(3), 451–458.
- Lund, M. N., Hviid, M. S., & Skibsted, L. H. (2007). The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Science*, 76(2), 226–233.
- McBride, N., Hogan, S. A., & Kerry, J. P. (2007). Comparative addition of rosemary extract and additives on sensory and antioxidant properties of retail packaged beef. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(10), 1201–1207.
- McKenna, D. R., King, D. A., & Savell, J. W. (2004). Comparison of clam-shell cookers and electric broilers and their effects on cooking traits and repeatability of Warner-Brazler shear force values. *Meat Science*, 66(1), 225–229.
- McKenna, D. R., Mies, P. D., Baird, B. E., Pfeiffer, K. D., Ellebracht, J. W., & Savell, J. W. (2005). Biochemical and physical factors affecting discoloration characteristics of 19 bovine muscles. *Meat Science*, 70(4), 665–682.
- Moñino, I., Martínez, C., Sotomayor, J., Lafuente, A., & Jordán, M. (2008). Polyphenolic transmission to Segureño lamb meat from ewes' diet supplemented with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3363–3367.
- Morán, L., Rodríguez-Calleja, J. M., Bodas, R., Prieto, N., Giráldez, F. J., & Andrés, S. (2012). Carnosic acid dietary supplementation at 0.12% rates slows down meat discoloration in *gluteus medius* of fattening lambs. *Meat Science*, 90(3), 789–795.
- Munné-Bosch, S., Mueller, M., Schwarz, K., & Alegre, L. (2001). Diterpenes and antioxidative protection in drought-stressed *Salvia officinalis* plants. *Journal of Plant Physiology*, 158(11), 1431–1437.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S. L., & Garrido, M. D. (2010). Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Influence on lamb meat quality. *Meat Science*, 84(1), 23–29.
- Peng, S.-K., Taylor, C. B., Hill, J. C., & Morin, R. J. (1985). Cholesterol oxidation derivatives and arterial endothelial damage. *Atherosclerosis*, 54(2), 121–133.
- Rey, A. I., Kerry, J. P., Lynch, P. B., López-Bote, C. J., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (2001). Effect of dietary oils and alpha-tocopheryl acetate supplementation on lipid (TBARS) and cholesterol oxidation in cooked pork. *Journal of Animal Science*, 79(5), 1201–1208.
- Rowe, L. J., Maddock, K. R., Lonergan, S. M., & Huff-Lonergan, E. (2004). Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. *Journal of Animal Science*, 82(3), 785–793.
- SAS (1999). *SAS/STAT(R) user's guide (version 8)*. Cary, NC, USA: SAS Term Publishing previous.
- Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., & Koohmaraie, M. (1999). Evaluation of slice shear force as an objective method of assessing beef longissimus tenderness. *Journal of Animal Science*, 77(10), 2693–2699.
- Smith, L. L. (1987). Cholesterol autooxidation 1981–1986. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44(2–4), 87–125.
- Taylor, C., Peng, S., Werthessen, N., Tham, P., & Lee, K. (1979). Spontaneously occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 32(1), 40–57.
- Xiong, Y. L. (2000). Protein oxidation and implications for muscle food quality. In E. Decker, & C. Faustman (Eds.), *Antioxidants in muscle foods* (pp. 85–111). Chichester: John Wiley & Sons.
- Zakrys, P. I., O'Sullivan, M. G., Allen, P., & Kerry, J. P. (2009). Consumer acceptability and physicochemical characteristics of modified atmosphere packed beef steaks. *Meat Science*, 81(4), 720–725.



## **CAPÍTULO 5**

*Effect of dietary carnosic acid on the fatty acid profile and flavour stability of meat from fattening lambs*

---



## Effect of dietary carnosic acid on the fatty acid profile and flavour stability of meat from fattening lambs

Lara Morán<sup>a,\*</sup>, F. Javier Giráldez<sup>a</sup>, Sara Panseri<sup>b</sup>, Noelia Aldai<sup>c</sup>, M. José Jordán<sup>d</sup>, Luca M. Chiesa<sup>b</sup>, Sonia Andrés<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC-Universidad de León, Finca Marzanas, E-24346 Grulleros, León, Spain

<sup>b</sup> Department of Veterinary Sciences and Public Health, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milan, Italy

<sup>c</sup> Food Science and Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain

<sup>d</sup> Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca, Murcia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 August 2012

Received in revised form 21 November 2012

Accepted 11 December 2012

Available online 29 December 2012

#### Keywords:

Fatty acids

Volatiles

Vitamin E

Rosemary

HS-SPME

GC/MS

### ABSTRACT

Thirty-two lambs were fed with barley straw supplemented by a concentrate alone, or a concentrate enriched with either vitamin E (VITE006: 0.6 g kg<sup>-1</sup> feed concentrate) or carnosic acid (CARN006: 0.6 g kg<sup>-1</sup> feed concentrate; or CARN012: 1.2 g kg<sup>-1</sup> feed concentrate). In order to elucidate the influence of the dietary supplementation of carnosic compared with a reference diet antioxidant (vitamin E), the animals were slaughtered and the *longissimus thoracis* were lyophilised to determine the FAs profile and the phenolic compounds. In addition, *longissimus lumborum* slices were stored in a modified atmosphere package for 3 days and then grilled to determine volatile compounds. Dietary carnosic acid did not modify the FAs profile, but had a clear effect on the production of volatile compounds, in a dose-dependent manner. These results have implications for the food industry, since dietary carnosic acid seems to extend the shelf life of lamb meat.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Meat is considered a highly nutritious and valued food because it is a source of high biological value proteins and micronutrients (for example, vitamins A, B6, B12, D and E; iron, zinc and selenium). However, over the last 20 years, perceptions that red meat contains high amounts of fat, which is rich in saturated fat, and associations between red meat and cancer, have overshadowed these positive attributes. The relationship between dietary fat and the incidence of lifestyle diseases, particularly coronary heart disease, are well-established. Consequently, consumers from developed countries are currently looking for meat products with added health qualities (Scollan et al., 2006).

The fatty acids (FAs) profile of lamb is characterised by a low polyunsaturated/saturated FAs ratio (PUFA/SFA) (Enser et al., 1998). Consequently, numerous studies have attempted to increase the proportion of PUFA and conjugated linoleic acid (CLA) in the final product, by means of different feeding strategies (Castro, Manso, Mantecón, Guirao, & Jimeno, 2005). More recent studies have looked for new dietary supplements, such as phenolic compounds

(Patra & Saxena, 2009), some of which also have the ability to modify rumen microbiota and hence PUFA metabolism (i.e. biohydrogenation) at the rumen level. Thus, the inclusion of phenolic compounds in the diet may favourably modify the fatty acids profile in lamb meat samples (Lourenco, Ramos-Morales, & Wallace, 2010).

Fatty acid composition also affects other important meat qualities, such as colour, texture and flavour. For example, PUFAs are susceptible to oxidation, and lipid peroxidation plays a key role in colour changes and undesirable flavour development, thus reducing product shelf life (Elmore, Mottram, Enser, & Wood, 1999). Hence, the antioxidant properties of phenolic compounds may provide a good alternative, protecting PUFAs from lipid peroxidation.

In this context, special attention has been paid to carnosic acid, a diterpenic phenol with antioxidant properties that has been shown to be retained in the meat of animals fed with rosemary (Moñino, Martínez, Sotomayor, Lafuente, & Jordán, 2008). Previous studies with carnosic acid have demonstrated improvements in meat quality (Morán et al., 2012a; Morán, Andrés, Bodas, Prieto, & Giráldez, 2012b).

Therefore, the aim of the present study was to investigate the FAs profile and the occurrence of undesirable off-flavours in meat when two different doses of rosemary extract (47% carnosic acid)

\* Corresponding author. Tel.: +34 987 307 054; fax: +34 987 317 161.

E-mail address: [laramoran@eae.csic.es](mailto:laramoran@eae.csic.es) (L. Morán).

were included in the diet of lambs. Likewise, vitamin E (one of the most frequently-used antioxidants in animal nutrition) was examined in another group, in order to provide a positive control.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and diets

Two weeks before commencement of the trial, 32 male Merino lambs were treated with ivermectin (Ivomec, Merial Labs, Barcelona, Spain) and vaccinated against enterotoxaemia (Miloxan, Merial Labs, Barcelona, Spain).

After stratification on the basis of body weight (average BW = 15.2 ± 0.749 kg), lambs were penned individually and allocated randomly to one of four different groups (eight lambs per treatment): a control group was fed barley straw (BS) and concentrate alone (CONTROL); a second group was fed BS and concentrate with a single dose of carnosic acid (CARN006: 0.6 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> concentrate); a third group was fed BS and concentrate with a double dose of carnosic acid (CARN012: 1.2 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> concentrate); and a fourth group was fed BS and concentrate with vitamin E (50% α-tocopheryl acetate) at a rate of 0.6 g kg<sup>-1</sup> concentrate (VITE006, equivalent to 900 IU vitamin E kg<sup>-1</sup> concentrate). The carnosic acid was supplied by Shaanxi Sciphar Biotechnology Company Ltd. (China; carnosic acid 470 g kg<sup>-1</sup> dry matter), while the 50% α-tocopheryl acetate was obtained from Industrias de Alimentación Animal (Spain).

Concentrate (35 g kg<sup>-1</sup> BW day<sup>-1</sup>) and forage (200 g barley straw day<sup>-1</sup>) were weighed and supplied in separate feeding troughs at 9:00 a.m. each day. Fresh drinking water was always available. The orts were also weighed daily, and feed samples were collected for chemical and FAs composition analysis. The ingredients of the concentrate and chemical composition of both concentrate and forage have been previously described by Morán et al. (2012a). Additionally the lipid profile of the concentrate total fat (25 g kg<sup>-1</sup> dry matter) was analysed (linoleic acid 50.6%, palmitic acid 21%, oleic acid 20%, linolenic acid 4.6%, stearic acid 3.5% and others 0.3%).

All handling practices followed the recommendations of European Council Directive 86/609/EEC for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, and all of the animals were able to see and hear other lambs.

### 2.2. Slaughter, packaging, storage and sampling procedures

The animals were slaughtered on four different days, two lambs per group on each of these days. On each occasion, the lambs were selected according to their weight (25 kg target body weight) and slaughtered by stunning and exsanguination from the jugular vein, prior to being eviscerated and skinned. After 24 h at 4 °C, the *longissimus thoracis* (LT) and *lumborum* (LL) muscles were removed from both sides of the carcass.

The LT muscles from the right and left sides were lyophilised and frozen at -80 °C for further fatty acids profile determination. The LL from the right and left carcass sides, were cut into 2.5 cm thick slices, placed on impermeable polypropylene trays and packaged on modified atmosphere (MAP) and stored on the conditions previously described by Morán et al. (2012a). The packages were opened after 3 days and the meat samples were grilled at 180 °C, with a temperature probe inserted into the core of the samples in order ensure a maximum internal temperature of 70 °C was reached. Finally, the LL samples were cooled at 4 °C for 30 min and then frozen at -20 °C until analysis of the volatile compounds profile.

### 2.3. Fatty acid analysis

All details regarding the methods and equipment (lipid extraction, derivatisation, gas chromatography (GC) separation and conditions, and standard mixtures) utilised to determine the fatty acids composition of the lamb meat samples have been previously described by Aldai, Lavín, Kramer, Jaroso, and Mantecón (2012). In-keeping with the objectives of the present study, no complementary separation technique (i.e. high-performance liquid chromatography (HPLC) or ionic GC column was used to determine the CLA isomers and, therefore, the total CLA content has been provided.

A quantitative procedure was used, adding 1 ml internal standard (1 mg ml<sup>-1</sup> 23:0 methyl ester; N-23-M, supplied by Nu-Chek Prep Inc., Elysian, MN, USA) prior to methylation. The fatty acid methyl esters (FAMES) contents were expressed as mg 100 g<sup>-1</sup> fresh meat, and quantified (on a weight basis) as a percentage (%) of the total FAMES.

Some nutritionally-interesting indexes were also calculated, according to Ulbricht and Southgate (1991):

$$\text{Saturation index (S/P)} = (\text{C14} + \text{C16} + \text{C18}) / (\sum \text{MUFA} + \sum \text{PUFA})$$

$$\text{Atherogenic index (AI)} = (\text{C12} + 4 \times \text{C14} + \text{C16}) / (\sum \text{MUFA} + \sum n - 6 + \sum n - 3)$$

$$\text{Thrombogenic index (IC)} = (\text{C14} + \text{C16} + \text{C18}) / [(0.5 \times \sum \text{MUFA} + 0.5 \times \sum n - 6 + 3 \times \sum n - 3) / (\sum n - 6)]$$

### 2.4. Volatile compounds analysis

All samples were prepared by placing 10 ± 0.5 g finely-cut cooked meat in a 20 ml glass vial fitted with a cap equipped with a silicon/PTFE septa (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and adding 1 ml internal standard (2 µg ml<sup>-1</sup> 4-methyl-2-pentanone) solution to water. For headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), 10 °C was the selected temperature for both equilibration and extraction, in order to prevent possible matrix alterations and hydroperoxide decomposition (Panseri, Soncin, Chiesa, & Biondi, 2011).

To keep the temperature constant during analysis, the vials were maintained at 10 °C on a cooling plate (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). At the end of the sample equilibration time (1 h), a CAR/PDMS fibre (Supelco) was exposed to the sample headspace for analyte extraction (180 min) using a CombiPAL system injector autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland).

Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analyses were performed using a Trace GC Ultra coupled to a quadrupole mass spectrometer Trace DSQII (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and equipped with an Rtx-Wax column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film thickness; Restek, Bellefonte, PA, USA).

The oven temperature program was as follows: from 35 °C, hold 8 min; increase to 60 °C at 4 °C min<sup>-1</sup>; increase to 160 °C at 6 °C min<sup>-1</sup>; and finally increase to 200 °C at 20 °C min<sup>-1</sup>. The carrier gas was helium, at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. The samples were injected in splitless mode using an 8 min splitless time. Carry over and peaks originating from the fibre were regularly assessed by running blank samples. After each analysis, fibres were immediately thermally desorbed in the GC injector for 5 min at 250 °C to prevent contamination.

Ion source and transfer line temperatures were set at 250 °C and 210 °C, respectively. The mass spectra were obtained using a mass selective detector with an electronic impact of 70 eV, a multiplier voltage of 1456 V and a data collecting rate of 1.48 scan s<sup>-1</sup> over

the  $m/z$  range of 30–350. Compounds were identified by comparison of the retention times of the chromatographic peaks with those of authenticated compounds analysed under the same conditions (when available) or with the Kovats index (it was appropriate to calculate Kovats, since two formulae are available: one for isothermal oven conditions and one for programmed oven temperatures). The identification of MS fragmentation patterns was performed either by comparison with those of pure compounds or by using the National Institute of Standards and Technology (NIST) MS spectral database.

The results were expressed as ng IS equivalent [area of compounds (arbitrary units/IS area) \* ng IS] in order to provide semi-quantitative results. All analyses were done in duplicate.

### 2.5. Phenolic quantification in meat samples

In the case of phenolic quantification, freeze-dried samples (1.5 g) were extracted using 150 ml methanol in a Soxhlet extractor (B-811; Büchi, Flawil, Switzerland) for 2 h in a nitrogen atmosphere. Methanolic extracts were taken to dryness at 40 °C under vacuum conditions in an evaporator system (Syncore Polyvap R-96; Büchi, Flawil, Switzerland). The residue was re-dissolved in methanol and made up to 5 ml. The extracts were kept in vials at –80 °C until their corresponding analysis.

HPLC analysis followed a method adapted from Moñino et al. (2008) performed using a reverse-phase ZORBAX SB-C18 column (4.6 × 250 mm, 5 µm internal particle diameter [IPD]; Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) with a guard column (ZORBAX SB-C18 4.6 × 125 mm, 5-µm IPD; Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) at room temperature. Extracts were passed through a 0.45 µm filter (Millipore SAS, Molsheim, France) and 30 µL was injected into a Hewlett Packard (Germany) system equipped with a G1311A quaternary pump and G1315A diode array detector (DAD). The mobile phase was acetonitrile (A) and acidified water containing 5% formic acid (B). The gradient was as follows: 0 min, 30% A; 10 min, 55% A; 12 min, 55% A; 15 min, 70% A; 20 min, 80% A; 30 min, 100% A; 37 min, 30% A; and then held for 10 min before returning to the initial conditions. The flow rate was 1.0 ml min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was set at 280 nm. The identification of carnosic acid was made by comparison with the retention time and spectra of a commercially-available

standard compound. Linear regression models were performed for quantification using standard dilution techniques. The linear regression equation calculated for the standard was  $y = 3559 \times 0.0083$  ( $R^2 = 0.9845$ ). Samples were run in triplicate.

### 2.6. Statistical analysis

Fatty acid profile and data of volatiles were subjected to one-way analysis of variance, with the dietary treatment as the only source of variation, using the general linear models (GLM) procedure of the SAS package. Moreover, in order to perform a discrimination analysis, the fatty acids profiles and volatiles data were analysed by principal components analysis (PCA) using The Unscrambler software (version 7.0; CAMO, Trondheim, Norway).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Fatty acid composition

Table 1 represents the overall fatty acid groups and the nutritionally most important ratios and indexes of the intramuscular fat of the LT muscles of the lambs. No significant differences were observed in most of these parameters.

It is known that the fatty acids profile affects oxidative stability during processing and retail display, since a high content of PUFAs, which are highly susceptible to oxidation processes, can reduce the shelf-life of retail meat. On the other hand, a high content of PUFAs with a low  $\omega$ -6 (n-6)/ $\omega$ -3 (n-3) PUFA ratio is recommended, due to its cardioprotective properties and other positive bioactive effects in humans (Department of Health, 1984). In previous experiments, where animal diets were supplemented with the whole rosemary plant, a reduction in the n-6/n-3 ratio was observed (Nieto, Bañón, & Garrido, 2011). However, in the present study, no significant differences were observed in lambs fed the carnosic acid extract as opposed to the whole rosemary plant.

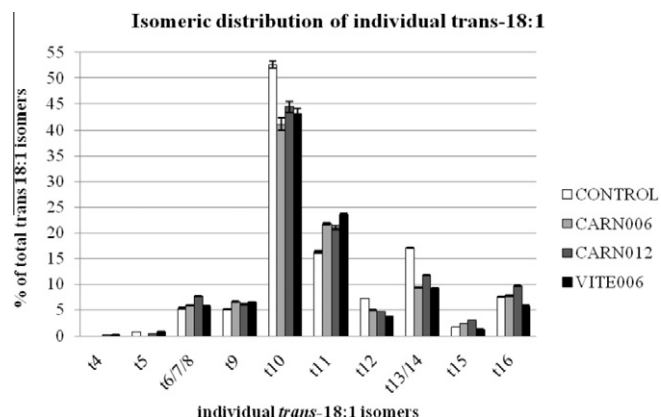
Regarding *trans*-18:1 isomers, *t*10-18:1 has been reported to accumulate in concentrate-fed animals (Bessa, Portugal, Mendes, & Santos-Silva, 2005), while ruminic acid (c9,*t*11-18:2) and its precursor vaccenic acid (*t*11-18:1) have been found to accumulate in forage-finished ruminants (Dugan et al., 2007). The relationship between major *t*-18:1 isomers can be considered an important factor

**Table 1**

Absolute content (mg 100 g<sup>-1</sup> meat) of total FAMES and summary of FAMES together with some nutritionally interesting ratios and indexes in the *longissimus thoracis* muscle of lambs ( $n = 8$  per group).

Fatty acids (mg 100 g <sup>-1</sup> meat)	CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006	sed	P-value
FAMES	2069	2040	1855	2219	255.4	0.595
SFA	950	919	847	1010	130.9	0.840
MUFA	838	863	753	927	110.5	0.505
<i>cis</i> -MUFA	748	767	664	815	113.5	0.459
<i>trans</i> -MUFA	90.5	95.5	89.2	112	20.88	0.546
PUFA	193	174	173	191	16.6	0.789
n-6 PUFA	171	155	153	169	14.3	0.751
n-3 PUFA	22.0	20.1	20.1	21.7	2.76	0.974
n-6 HUFA	47.1	44.1	46.8	49.3	3.32	0.615
n-3 HUFA	14.6	13.7	14.1	15.1	1.87	0.943
CLA	12.3	13.8	11.8	13.8	1.97	0.646
<i>Nutritional index</i>						
n-6/n-3 HUFA	3.36	3.25	3.36	3.45	0.282	0.926
n-6/n-3 PUFA	8.16	7.75	7.70	8.06	0.584	0.869
P/S	0.21	0.19	0.22	0.18	0.028	0.565
11 <i>t</i> -18:1/10 <i>t</i> -18:1	0.34	0.53	0.64	0.62	0.232	0.487
(AI)	0.73	0.71	0.68	0.68	0.050	0.812
(S/P)	0.39	0.39	0.40	0.40	0.023	0.802
(TI)	1.51	1.51	1.49	1.53	0.077	0.989

FAMES, fatty acid methyl esters; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; HUFA, highly unsaturated fatty acid; CLA, conjugated linoleic acid; n-6,  $\omega$ -6 fatty acids; n-3,  $\omega$ -3 fatty acids; P/S, PUFA/SFA; AI, atherogenic index; S/P, saturation index; TI, thrombogenic index; CONTROL group, no antioxidants; CARN006, 0.6 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of concentrate; CARN012, 1.2 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of concentrate; VITE006, 0.6 g  $\alpha$ -tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of concentrate.



**Fig. 1.** Relative isomeric distribution of individual *trans*-18:1 isomers of *longissimus* muscle from fattening lambs. CONTROL (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate); CARN012 (1.2 g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate); VITE006 (0.6 g  $\alpha$ -tocopheryl acetate  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate).

for human health, since *t*10-18:1 has been associated with increased atherogenicity in animal models, while *t*11-18:1 has been linked with a number of potential health benefits (Bauchart et al., 2007). In the present study, *t*10-18:1 was the major isomer, as expected for concentrate-fed ruminants (Fig. 1). However, the CONTROL group showed numerically higher *t*10-18:1 and lower *t*11-18:1 relative proportions, when compared with the other groups (Fig. 1). These variations in the *t*11/*t*10-18:1 ratio, which were not even statistically significant, were in line with previous studies of dietary vitamin E inclusion undertaken on beef cattle (Juárez et al., 2011; Mapiye et al., 2012). Pottier et al. (2006) attributed these changes to the properties of vitamin E, as an inhibitor of *t*10-18:1, producing microorganisms at a ruminal level, or as an electron acceptor for *Butyrivibrio fibrisolvens*, the principal promoter of *t*11-18:1. In the current investigation, no differences in rumen microorganisms were found (Morán et al., 2012c) that could explain the lack of significant variations in the *trans*-18:1 isomeric profile. Other authors have hypothesised that oxidative stress is an important factor on the production of *trans* fatty acids (Härtig, Loffhagen, & Harms, 2005), so the groups being fed antioxidants may, therefore, have been protected against this effect (Morán et al., 2012c).

The main individual fatty acids observed in each group (% of total FAs) are summarised in Table 2. The FAs included in Table 2 were those with a presence greater than 0.1%. In agreement with Castro et al. (2005), the most abundant FAs in the lamb meat samples from the current investigation were oleic acid (c9-18:1), palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0). In general terms, very few significant differences in individual FAs were observed between treatments. The percentage of total CLA was low, as was that of rumenic acid, which overlapped with the second most abundant isomer (*t*7c9-18:2). These two isomers represented a combined average amounting to 80% of the total CLA content (data not shown).

It should be noted the trend toward significant differences between dietary treatments regarding docosahexaenoic acid (DHA) content (Table 2). Lamb meat obtained from the high dietary carnosic acid treatment (CARN012) tended to have higher levels of DHA in comparison to the other carnosic acid and vitamin E treatments. This is *a priori* an interesting finding, bearing in mind that lamb meat is very low in highly unsaturated FAs. However, as yet we have been unable to provide an explanation for these results, as no differences in other long-chain n-3 FAs were observed.

### 3.2. Volatile compounds

Table 3 summarises the volatile compounds from lipid autoxidation in the cooked meat samples following 3 days of refrigerated

**Table 2**

Content (percentages of total fatty acids) of total FAMES in the *longissimus thoracis* of lambs ( $n = 8$  per group).

Total FA (%)	CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006	sed	P-value
<b>SFA</b>						
12:0	0.38	0.32	0.32	0.24	0.075	0.395
14:0	3.35	3.32	3.02	2.94	0.499	0.818
16:0	22.6	22.4	21.6	22.3	0.60	0.479
17:0	2.30	1.76	2.05	2.06	0.269	0.334
18:0	15.9	16.2	17.1	17.0	0.83	0.505
19:0	0.14	0.15	0.18	0.18	0.020	0.204
20:0	0.11	0.11	0.12	0.12	0.007	0.597
22:0	0.04	0.04	0.04	0.03	0.004	0.186
<b>MUFA</b>						
c9-14:1	0.10	0.09	0.09	0.07	0.014	0.543
c9-16:1	1.40	1.39	1.26	1.33	0.069	0.188
c9-17:1	1.05	0.87	0.91	0.97	0.121	0.538
c9-18:1 <sup>A</sup>	30.7	32.7	30.9	32.0	1.08	0.291
c11-18:1	1.43	1.34	1.39	1.42	0.096	0.830
c9-19:1	0.08 <sup>ab</sup>	0.07 <sup>b</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.014	0.034
<b>Non conjugated 18:2</b>						
tt	0.09	0.07	0.07	0.08	0.011	0.481
t9t12	0.04	0.03	0.03	0.04	0.007	0.240
c9t13+t8c12	0.23	0.22	0.21	0.22	0.019	0.726
t8c13	0.09	0.10	0.11	0.09	0.022	0.819
t11c15	0.18	0.15	0.16	0.15	0.027	0.640
<b>CLA</b>						
c9t11 <sup>B</sup>	0.47	0.51	0.50	0.52	0.052	0.818
<b>n-6</b>						
18:2n-6	6.19	5.44	6.09	5.31	0.689	0.545
18:3n-6	0.10	0.10	0.11	0.10	0.007	0.464
20:2n-6	0.05	0.05	0.06	0.05	0.010	0.958
20:3n-6	0.18	0.17	0.23	0.16	0.028	0.141
20:4n-6	2.01	1.79	2.30	1.91	0.306	0.412
22:4n-6	0.20	0.19	0.21	0.18	0.046	0.894
<b>n-3</b>						
18:3-n-3	0.35	0.32	0.33	0.29	0.036	0.486
20:5n-3	0.18	0.19	0.23	0.17	0.039	0.490
22:5n-3	0.42	0.38	0.41	0.42	0.076	0.962
22:6n-3	0.14	0.11	0.20	0.11	0.037	0.094

SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acid; n-6,  $\omega$ -6 fatty acids; n-3,  $\omega$ -3 fatty acids; CLA, conjugated linoleic acid; CONTROL group, no antioxidants; CARN006, 0.6 g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate; CARN012, 1.2 g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate; VITE006, 0.6 g  $\alpha$ -tocopheryl acetate  $\text{kg}^{-1}$  of concentrate. Means with different superscripts in capital letters (a, b, c) indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ).

<sup>A</sup> Coelution with c10-18:1.

<sup>B</sup> Coelution with t7c9-1:1.

storage, whereas Table 4 presents those from carbohydrate and amino acid degradation. The boundaries between the classes of compounds described above are not clear for substances with multiple origins, so the most likely origin has been used in the present study.

In general terms, significant differences were observed between animals fed the lowest doses of antioxidants (CARN006 and VITE006 groups) and those lambs that had either received enhanced antioxidants (CARN012) or the CONTROL diet. Specifically, it seemed that the production of undesirable flavours may have been reduced in both VITE006 and CARN006 compared with the other two groups. On the contrary, these results suggest that at CARN012 levels, carnosic acid could act as a pro-oxidant factor, rather than as an antioxidant in a lipophilic medium.

A rise in PUFAs in meat increases lipid oxidation, thus reducing both the quality (Kanner, 1994) and nutritional value, since atherogenic compounds can form under retail conditions (Addis, Emanuel, Bergmann, & Zavoral, 1989). During cooking, the most important flavour compounds are formed in the Maillard reaction and through lipid oxidation (Mottram, 1998). In turn, these compounds can generate new secondary compounds (Almela et al.,

**Table 3**Volatile compounds from lipid autoxidation (ng IS equivalent g<sup>-1</sup> fresh matter) identified in the headspace of *longissimus lumborum* of grilled lamb after 3 days of storage.

Compounds	CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006	sed	P-value
<i>Aldehydes</i>						
Propanal	35.7 <sup>ab</sup>	26.1 <sup>bc</sup>	40.4 <sup>a</sup>	15.4 <sup>c</sup>	7.62	0.012
Pentanal	35.2 <sup>ab</sup>	19.7 <sup>bc</sup>	38.8 <sup>a</sup>	10.0 <sup>c</sup>	7.34	0.001
Hexanal	822 <sup>a</sup>	522 <sup>b</sup>	766 <sup>a</sup>	226 <sup>c</sup>	106.2	<.0005
Heptanal	7.75 <sup>a</sup>	4.95 <sup>a</sup>	6.58 <sup>a</sup>	1.71 <sup>b</sup>	1.392	0.001
Octanal	3.94 <sup>a</sup>	2.02 <sup>b</sup>	2.59 <sup>b</sup>	0.82 <sup>c</sup>	0.550	<.0005
Nonanal	3.98 <sup>a</sup>	2.88 <sup>a</sup>	3.43 <sup>a</sup>	1.04 <sup>b</sup>	0.582	<.0005
<i>Alcohols</i>						
1-Butanol	4.47 <sup>a</sup>	2.33 <sup>b</sup>	2.72 <sup>b</sup>	1.35 <sup>b</sup>	0.786	0.005
1-Pentanol	14.5 <sup>a</sup>	10.5 <sup>a</sup>	13.7 <sup>a</sup>	3.98 <sup>b</sup>	2.463	0.001
1-Penten-3-ol	12.0 <sup>a</sup>	7.23 <sup>b</sup>	8.70 <sup>ab</sup>	2.72 <sup>c</sup>	1.373	<.0005
1-Octen-3-ol	0.51 <sup>a</sup>	0.21 <sup>ab</sup>	0.24 <sup>ab</sup>	0.04 <sup>b</sup>	0.166	0.060
1-Nonen-3-ol	0.13 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0.02 <sup>b</sup>	0.022	<.0005
<i>Free fatty acids</i>						
Propanoic acid	1.43 <sup>a</sup>	1.02 <sup>b</sup>	1.13 <sup>ab</sup>	0.48 <sup>c</sup>	0.178	<.0005
Pentanoic acid	1.34 <sup>a</sup>	0.60 <sup>bc</sup>	0.86 <sup>b</sup>	0.34 <sup>c</sup>	0.150	<.0005
Hexanoic acid	5.10 <sup>a</sup>	3.22 <sup>b</sup>	4.40 <sup>a</sup>	1.56 <sup>c</sup>	0.589	<.0005
<i>Hydrocarbons</i>						
Pentane	29.7 <sup>ab</sup>	14.1 <sup>bc</sup>	38.1 <sup>a</sup>	8.14 <sup>c</sup>	9.133	0.009
1-Octene	16.4 <sup>b</sup>	10.8 <sup>b</sup>	29.9 <sup>a</sup>	16.3 <sup>b</sup>	7.21	0.042
2-Octene	3.02	2.47	5.07	3.48	1.267	0.122
<i>Others</i>						
2-Heptanone	0.70 <sup>a</sup>	0.29 <sup>b</sup>	0.27 <sup>b</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.150	0.023
2,3-Octanedione	13.7 <sup>a</sup>	9.05 <sup>b</sup>	10.7 <sup>ab</sup>	1.88 <sup>c</sup>	1.583	<.0005
2-Pentylfuran	1.78 <sup>a</sup>	0.60 <sup>b</sup>	0.68 <sup>b</sup>	0.23 <sup>b</sup>	0.375	0.002
γ-Butyrolactone	2.66	1.95	1.83	1.62	0.527	0.275

CONTROL (no antioxidants); CARN006 (0.6 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of concentrate); CARN012 (1.2 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of concentrate); VITE006 (0.6 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of concentrate). Means with different superscripts (a, b, c) indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ).**Table 4**Volatile compounds from carbohydrate degradation (ng IS equivalent g<sup>-1</sup> fresh matter) identified in the headspace of *longissimus lumborum* of grilled lamb after 3 days of storage.

Compounds	CONTROL	CARN006	CARN012	VITE006	sed	P-value
<i>Ketones</i>						
2-Propanone	97.4	62.8	83.7	77.2	19.04	0.354
2-Butanone	63.7 <sup>a</sup>	24.9 <sup>b</sup>	8.33 <sup>b</sup>	8.79 <sup>b</sup>	8.573	<.0005
3-Hydroxy-2-butanone	3.61	7.95	4.50	9.66	3.862	0.379
2,3-Pentanedione	10.3 <sup>a</sup>	3.68 <sup>b</sup>	3.28 <sup>b</sup>	1.21 <sup>b</sup>	1.492	<.0005
<i>Free fatty acids</i>						
Acetic acid	26.6 <sup>a</sup>	25.6 <sup>ab</sup>	19.2 <sup>b</sup>	19.5 <sup>b</sup>	3.08	0.042
2-Methyl propanoic acid	N.D.	0.11	0.14	0.18	0.119	0.467
Butanoic acid	1.27	1.06	0.93	1.04	0.243	0.588
2-Methyl butanoic acid	0.20 <sup>a</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.07 <sup>b</sup>	0.032	0.003
3-Methyl butanoic acid	0.20 <sup>a</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.09 <sup>bc</sup>	0.03 <sup>c</sup>	0.026	<.0005
<i>Sulfonated compounds</i>						
Dimethyl sulfoxide	0.47 <sup>a</sup>	0.18 <sup>b</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.27 <sup>ab</sup>	0.108	0.013
Dimethyl sulfone	0.96	1.11	0.90	1.22	0.311	0.767
Carbondisulfide	5.65	2.47	4.23	5.76	1.832	0.262
<i>Others</i>						
Benzaldehyde	1.70 <sup>a</sup>	0.98 <sup>b</sup>	1.19 <sup>a</sup>	0.88 <sup>b</sup>	0.192	0.001
Ethanol	24.2 <sup>a</sup>	10.3 <sup>bc</sup>	7.32 <sup>c</sup>	12.7 <sup>b</sup>	2.52	<.0005
Acetic ethyl ester	8.15 <sup>a</sup>	2.47 <sup>c</sup>	2.84 <sup>bc</sup>	4.18 <sup>ab</sup>	1.921	0.026

CONTROL, no antioxidants; CARN006, 0.6 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of concentrate; CARN012, 1.2 g carnosic acid kg<sup>-1</sup> of concentrate; VITE006, 0.6 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of concentrate; N.D.; not detected. Means with different superscripts (a, b, c) indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ).

2009). However, the dietary treatments in the present study had no effect on the PUFAs content of the meat samples (Table 1). Consequently, the differences in volatile compounds observed (Tables 3 and 4) seemed to be directly due to the antioxidant properties of the carnosic acid and vitamin E added to the diets of the lambs, which may have protected the meat against oxidation during refrigerated storage and cooking procedures.

Aldehydes with 6–10 carbon atoms, such as hexanal, heptanal and nonanal, are major compounds responsible for the aroma of cooked meat (Mottram, 1998), and are derived from the decomposition of PUFAs. Aldehydes exhibit a high formation rate and low

flavour threshold (Ullrich & Grosch, 1987), thus providing strong off-flavours (green, rancid, fatty and pungent) to the meat. Hexanal, as previously described by Shahidi and Pegg (1994), was the main volatile compound in the meat samples. This compound, which is directly related to lipid autoxidation, was significantly reduced ( $p < 0.0001$ ) in the CARN006 samples, in comparison with the CONTROL lambs (Table 3).

A previous investigation found similar aldehyde results in meat from lamb breastfed by ewes fed with a distillate from rosemary leaves containing carnosic acid concentrations equivalent to that administered to CARN006 lambs in the present study (Moñino



et al., 2008). However, higher levels of carnosic acid (CARN012 lambs) demonstrated no reduction in hexanal levels (Table 3). These results appear to agree with the hormesis concept that chemical or toxic substances may produce the opposite effect in small doses than in large doses (Calabrese, 2010). Moreover, the VITE006 group exhibited the lowest reactivity substances of thio-barbituric acid (TBARS) (Morán et al., 2012b) and hexanal (Table 3) values. The remaining aldehydes identified (pentanal, heptanal and nonanal) were characterised by similar results to those described for hexanal.

The alcohols observed were secondary products from aldehydes. The exception was 1-penten-3-ol, which was derived from 18:3n-3 autoxidation. In the present study, lower amounts of alcohols were found in the meat samples from lambs fed antioxidants (Table 3). However, it must be considered that these compounds contribute less to undesirable meat flavours ('fungus-like' odours), due to their higher flavour thresholds (Ullrich & Grosch, 1987).

Similar to previous compounds, the concentration of free fatty acids was also reduced in meat samples obtained from lambs fed the lowest antioxidant doses (VITE006 and CARN006; Table 3). This effect may have delayed the development of undesirable flavours, since hexanoic and butanoic acids, along with 3-methyl butanoic acid (from amino acid degradation), impart the rancid and cheesy note to meat aromas.

Hydrocarbons have no significant impact on flavour, since they have relatively high odour threshold values (Drumm & Spanier, 1991). In spite of this, it is interesting to note that the CARN012 group showed a greater amount of these compounds than the other groups (Table 3), which is in agreement with the results observed in those compounds formed by lipid autoxidation (Table 3).

Furthermore, there was a remarkable diversity of linoleic acid degradation products (18:2n-6), including 2-pentylfuran (beany and grassy flavour), 2-heptanone and 2,3-octanedione, whose presence is generally associated with grazing animals. In the present study, these compounds probably occurred in the meat samples as a consequence of the cooking procedure (Elmore, Campo, Enser, & Mottram, 2002). However, in line with the other results, the presence of all these compounds was lower in lambs fed antioxidants, especially in the vitamin E group.

Certain other compounds were derived from amino acids via Strecker degradation. Strecker degradation is the last part of the Maillard reaction, one of the principal reactions responsible for meat flavour, which takes place between a reductor sugar and the amino group of amino acids or proteins. Thus, 2-methylpropanoic acid, 3-methylbutanoic acid and 2-methylbutanoic acid were derived from valine, leucine and isoleucine, respectively (Machiels, van Ruth, Posthumus, & Istasse, 2003), these compounds being attributed to a characteristic sweet odour. Antioxidant supplementation in this case promoted the formation of 2-methylpropanoic acid, whereas 3-methylbutanoic and 2-methylbutanoic production decreased (Table 4) compared with the CONTROL group.

Acetic acid, together with butanoic acid, can be derived from direct fermentation of amino acids by the Stickland reaction, but acetic acid also has a microbiological origin, especially from acidolactic bacteria (Montel, Masson, & Talon, 1998). The growth of this group of microorganisms is especially favoured under modified atmosphere conditions (MAP), such as those used to store meat samples in the present study (Morán et al., 2012a). In fact, Morán et al. (2012a) reported that meat samples from lambs being fed antioxidants contained low levels (although not statistically significant) of acidolactic bacteria. Nieto, Díaz, Bañón, and Garrido (2010) obtained similar results, which were in agreement with the low levels of acetic acid in animals fed high doses of carnosic acid (CARN012) or vitamin E (VITE006 lambs) in the present study (Table 4). This trend also was observed in other compounds, such as acetic ethyl ester and ethanol, both of which having two possible

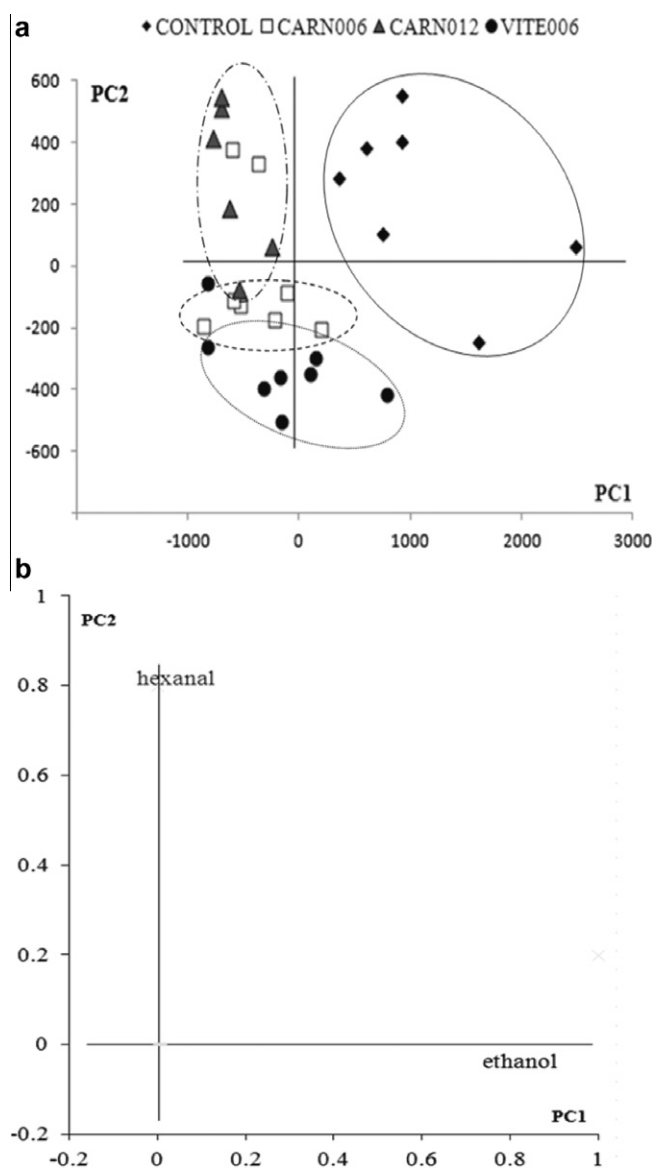


Fig. 2. Principal components analysis (PCA) performed on matrix data showing volatile compounds and fatty acid profile detected in *longissimus* muscle from fattening lambs. (a) Clusters of samples. (b) Variables with high loadings for the calculation of PC1 and PC2.

origins: carbohydrate fermentation or pyruvate microbial metabolism (Summo, Caponio, Tricarico, Pasqualone, & Gomes, 2010). Consequently, both vitamin E and carnosic acid may have delayed their production by microorganism degradation.

MAP could have affected the volatile compounds profile released by carbohydrate fermentation, thus restricting the formation of acetic acid, 1,3-butanediol and 2,3-butanediol and favouring the production of ethanol (Viallon et al., 1996) and ketones, such as acetoin (3-hydroxy-2-butanone), which imparts buttery notes. Acetoin was not affected by the dietary treatments, but levels of other ketones originating from carbohydrate degradation, such as 2-butanone and 2,3-pentanedione, were lower in those animals fed antioxidants (Table 4).

Sulfonated compounds are important contributors to desirable flavour with very low thresholds (Drumm & Spanier, 1991). Carbon disulfide (sulfury, fruity and burnt), a degradation product of sulphur-containing amino acids, such as cysteine, by the Maillard reaction, and dimethyl sulfone were not affected by dietary treatment (Table 4). Only dimethyl sulfoxide, a minor component

among the sulfonated compounds, demonstrated variations between treatments, with low levels in animals being fed carnosic acid.

### 3.3. Phenolic compounds in meat samples

Carnosic acid, in its native chemical structure, was only detectable in the meat samples from the CARN012 group ( $7.10 \pm 4.834$  ppm), which confirms that accumulation of this compound within this group was responsible for the effects observed in the volatile compounds profile. No other phenolic compounds were detected in meat samples by HPLC. Carnosic acid was not detectable by HPLC in the CARN006 meat samples, perhaps as a consequence of the very low dose of this compound administered to the lambs.

### 3.4. Principal components analyses

Principal components analysis (PCA) of the fatty acids profile and volatile compounds data (Fig. 2a) indicated four clusters in the meat samples of the fattening lambs, which were correlated with antioxidant consumption. As can be observed in Fig. 2a, the CARN006 group was closer to the VITE006 group, whereas the CARN012 and CONTROL groups were located on the opposite site of PC1. Hence, this discriminant analysis agrees with the volatile compounds results, in which the lowest level of carnosic acid (CARN006) seemed to promote an antioxidant effect closer to that observed in vitamin E lambs, whereas the higher carnosic acid dose (CARN012) contained similar levels of volatile compounds to the CONTROL group (Tables 3 and 4).

Fig. 2b presents those variables with high loadings (more eccentric) for the calculation of PC1 and PC2 (the percentages of variability explained by PC1 and PC2 were 86% and 13%, respectively). Those under low loadings could be considered irrelevant for discrimination purposes. In other words, the hexanal and ethanol variables were responsible for the discrimination achieved by PC1 (Fig. 2b).

## 4. Conclusions

The addition of carnosic acid to the diet of fattening lambs did not modify the fatty acids profile of the meat obtained. Moreover, the meat of the lambs being fed the lowest dose of carnosic acid ( $0.6 \text{ g kg}^{-1}$  feed concentrate) exhibited high oxidative stability (close to that observed for lambs being fed vitamin E), and thus maintained a more 'desirable' aroma (when compared with the control samples) following 3 days of refrigerated storage. It must be remarked, however, that this effect was less pronounced than that observed when vitamin E was supplemented. Conversely, higher doses of carnosic acid ( $1.2 \text{ g kg}^{-1}$  feed concentrate) appeared to be detrimental.

### Acknowledgements

Financial support received from project AGL2010-19094 is gratefully acknowledged. Lara Morán was supported by a JAE-Predoc grant under the program 'Junta para la Ampliación de Estudios' (CSIC-European Social Fund). Noelia Aldai thanks the Spanish Ministry of Science and Innovation for the contract through the 'Ramón y Cajal (RYC-2011-08593)' program.

### References

Addis, P. B., Emanuel, H. A., Bergmann, S. D., & Zavoral, J. H. (1989). Capillary GC quantification of cholesterol oxidation-products in plasma-lipoproteins of fasted humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(2), 179–182.

- Aldai, N., Lavín, P., Kramer, J. K. G., Jaroso, R., & Mantecón, A. R. (2012). Breed effect on quality veal production in mountain areas: Emphasis on meat fatty acid composition. *Meat Science*, 92(4), 687–696.
- Almela, E., Jordán, M. J., Martínez, C., Sotomayor, J. A., Bedia, M., & Bañón, S. (2009). El flavor de la carne cocinada de cordero. *Eurocarne: La Revista Internacional del Sector Cárnico*, 178, 28–42.
- Bauchart, D., Roy, A., Lorenz, S., Chardigny, J. M., Ferlay, A., Gruffat, D., et al. (2007). Butters varying in trans 18:1 and cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid modify plasma lipoproteins in the hypercholesterolemic rabbit. *Lipids*, 42(2), 123–133.
- Bessa, R. J. B., Portugal, P., Mendes, I., & Santos-Silva, J. (2005). Effect of lipid supplementation on growth performance, carcass and meat quality and fatty acid composition of intramuscular lipids of lambs fed dehydrated lucerne or concentrate. *Livestock Production Science*, 96(2–3), 185–194.
- Calabrese, E. J. (2010). Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. *Human & Experimental Toxicology*, 29(4), 249–261.
- Castro, T., Manso, T., Mantecón, A., Guirao, J., & Jimeno, V. (2005). Fatty acid composition and carcass characteristics of growing lambs fed diets containing palm oil supplements. *Meat Science*, 69(4), 757–764.
- Department of Health (1984). Report on health and social subjects No. 28. *Diet and cardiovascular disease*. London: HMSO, Department of Health and Social Security.
- Drumm, T. D., & Spanier, A. M. (1991). Changes in the content of lipid autoxidation and sulfur-containing compounds in cooked beef during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(2), 336–343.
- Dugan, M. E. R., Kramer, J. K. G., Robertson, W. M., Meadus, W. J., Aldai, N., & Rolland, D. C. (2007). Comparing subcutaneous adipose tissue in beef and muskox with emphasis on trans 18:1 and conjugated linoleic acids. *Lipids*, 42(6), 509–518.
- Elmore, J. S., Campo, M. M., Enser, M., & Mottram, D. S. (2002). Effect of lipid composition on meat-like model systems containing cysteine, ribose, and polyunsaturated fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1126–1132.
- Elmore, J. S., Mottram, D. S., Enser, M., & Wood, J. D. (1999). Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1619–1625.
- Enser, M., Hallett, K. G., Hewett, B., Fursey, G. A. J., Wood, J. D., & Harrington, G. (1998). Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Science*, 49(3), 329–341.
- Härtig, C., Löffhagen, N., & Harms, H. (2005). Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1915–1922.
- Juárez, M., Dugan, M. E. R., Aalhus, J. L., Aldai, N., Basarab, J. A., Baron, V. S., et al. (2011). Effects of vitamin E and flaxseed on rumen-derived fatty acid intermediates in beef intramuscular fat. *Meat Science*, 88(3), 434–440.
- Kanner, J. (1994). Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. *Meat Science*, 36(1–2), 169–189.
- Lourenco, M., Ramos-Morales, E., & Wallace, R. (2010). The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*, 4(7), 1008–1023.
- Machiels, D., van Ruth, S. M., Posthumus, M. A., & Istasse, L. (2003). Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial Irish beef meats. *Talanta*, 60(4), 755–764.
- Mapiye, C., Dugan, M. E. R., Juárez, M., Basarab, J. A., Baron, V. S., Turner, T., et al. (2012). Influence of  $\alpha$ -tocopherol supplementation on trans-18:1 and conjugated linoleic acid profiles in beef from steers fed a barley-based diet. *Animal*, 1(1), 1–9.
- Mohino, I., Martínez, C., Sotomayor, J., Lafuente, A., & Jordán, M. (2008). Polyphenolic transmission to Segureño lamb meat from ewes' diet supplemented with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3363–3367.
- Montel, M., Masson, F., & Talon, R. (1998). Bacterial role in flavour development. *Meat Science*, 49(Suppl. 1), 111–123.
- Morán, L., Andrés, S., Bodas, R., Benavides, J., Prieto, N., Pérez, V., et al. (2012a). C. Antioxidants included in the diet of fattening lambs: Effects on immune response, stress, welfare and distal gut microbiota. *Animal Feed Science and Technology*, 173(3–4), 177–185.
- Morán, L., Andrés, S., Bodas, R., Prieto, N., & Giráldez, F. J. (2012b). Meat texture and antioxidant status are improved when carnosic acid is included in the diet of fattening lambs. *Meat Science*, 91(4), 430–434.
- Morán, L., Rodríguez-Calleja, J., Bodas, R., Prieto, N., Giráldez, F. J., & Andrés, S. (2012c). Carnosic acid dietary supplementation at 0.12% rates slows down meat discoloration in *gluteus medius* of fattening lambs. *Meat Science*, 90(3), 789–795.
- Mottram, D. S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: A review. *Food Chemistry*, 62(4), 415–424.
- Nieto, G., Bañón, S., & Garrido, M. D. (2011). Effect of supplementing ewes' diet with thyme (*Thymus zygis* ssp. *gracilis*) leaves on the lipid oxidation of cooked lamb meat. *Food Chemistry*, 125(4), 1147–1152.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., & Garrido, M. D. (2010). Effect on lamb meat quality of including thyme (*Thymus zygis* ssp. *gracilis*) leaves in ewes' diet. *Meat Science*, 85(1), 82–88.
- Panseri, S., Soncin, S., Chiesa, L. M., & Biondi, P. A. (2011). A headspace solid-phase microextraction gas-chromatographic mass-spectrometric method (HS-SPME-GC/MS) to quantify hexanal in butter during storage as marker of lipid oxidation. *Food Chemistry*, 127(2), 886–889.

- Patra, A. K., & Saxena, J. (2009). Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(4), 363–375.
- Pottier, J., Focant, M., Debier, C., De Buysser, G., Goffe, C., Mignolet, E., et al. (2006). Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 685–692.
- Scollan, N., Hocquette, J. F., Nuernberg, K., Dannenberger, D., Richardson, I., & Moloney, A. (2006). Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science*, 74(1), 17–33.
- Shahidi, F., & Pegg, R. B. (1994). Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. *Journal of Food Lipids*, 1(3), 177–186.
- Summo, C., Caponio, F., Tricarico, F., Pasqualone, A., & Gomes, T. (2010). Evolution of the volatile compounds of ripened sausages as a function of both storage time and composition of packaging atmosphere. *Meat Science*, 86(3), 839–844.
- Ulbricht, T., & Southgate, D. (1991). Coronary heart disease: Seven dietary factors. *The Lancet*, 338(8773), 985–992.
- Ullrich, F., & Grosch, W. (1987). Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 184(4), 277–282.
- Viallon, C., Berdagué, J. L., Montel, M. C., Talon, R., Martin, J. F., Kondjoyan, N., et al. (1996). The effect of stage of ripening and packaging on volatile content and flavour of dry sausage. *Food Research International*, 29(7), 667–674.



## **CAPÍTULO 6**

*Effect of carnosic acid dietary supplementation on meat quality from suckling lambs*

---

**Effect of carnosic acid dietary supplementation on meat quality from suckling lambs**

Journal:	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>
Manuscript ID:	jf-2013-01362n
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	02-Apr-2013
Complete List of Authors:	Morán, Lara; Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Andrés, Sonia; INSTITUTO DE GANADERÍA DE MONTAÑA (CSIC-ULE), Mateo, Javier; UNIVERSIDAD DE LEÓN, Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos Blanco, Carolina; INSTITUTO DE GANADERÍA DE MONTAÑA (CSIC-ULE), Soto, Sergio; UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO, Instituto de Ciencias Agropecuarias Giráldez, Francisco; INSTITUTO DE GANADERÍA DE MONTAÑA (CSIC-ULE),

SCHOLARONE™  
Manuscripts



19

## 20 ABSTRACT

21 In order to elucidate the influence of dietary carnosic acid on the quality of suckling-lamb  
22 meat, twenty four lambs were fed *ad libitum* with milk replacer (MR) alone (control group, CTRL),  
23 enriched with carnosic acid (CARN, 0.096 g kg<sup>-1</sup> live weight, LW), or with vitamin E (VITE, 0.024  
24 g kg<sup>-1</sup>, LW), the last group as positive control. Animals were slaughtered at the intended body  
25 weight (11-12 kg LW). *Longissimus thoracis* muscles were used to assess proximate composition  
26 of meat; whereas different muscles (*longissimus lumborum* and *gluteus medius*) were sliced and  
27 kept refrigerated during 0, 7, and 14 days to determine water holding capacity, thiobarbituric acid  
28 reactive substances (TBARS), and cholesterol oxidation products (COPs) in cooked meat  
29 samples. *Biceps femoris* muscles were used for the analysis of volatile compounds on precooked  
30 meat after 1 and 7 days of storage. The results indicate that, at the dose used, carnosic acid  
31 dietary supplementation seemed to be effective but less than vitamin E reducing lipid and  
32 cholesterol oxidation of suckling-lambs meat.

33 KEYWORDS: *Rosmarinus officinalis*; carnosic acid; antioxidant status; TBARS;  
34 cholesterol oxidation products; volatile compounds.

## 35 INTRODUCTION

36 In markets of the European Mediterranean area is common the presence of meat from  
37 suckling lambs '*lechales*' with a slaughter age between 25 and 45 days and a carcass weight of  
38 up to 7 kg <sup>1,2</sup>. A high edible quality of suckling-lamb meat, on the basis of its tenderness, juiciness  
39 and palatability, has been recognized <sup>3</sup>.

40 In high production sheep dairy farms, after a few days being fed the colostrum, suckling lambs  
41 are fed with milk-replacer (MR) the chemical composition of this type of artificial milk its high in  
42 vegetal oils accordingly the meat from lambs fed MR have high levels of unsaturated fatty acids  
43 than lambs fed ewe's milk <sup>4,5</sup>. It is well known that the level of fatty acid unsaturation and lipid  
44 oxidation are closely related factors which, at the end, may influence the apparition of undesirable  
45 color and flavor and a loss of nutritional value of meat <sup>6,7</sup>. Consequently, any finding focused on  
46 delaying this process is highly relevant for the meat industry.

47 One of the most common methods to reduce the oxidation in meat and meat products is the  
48 use of antioxidants <sup>8</sup>. In this sense, the inclusion of natural compounds (plant origin) in animal  
49 feedstuff, thus avoiding any further manipulation of the meat, seems to be a suitable approach to  
50 reduce lipid oxidation <sup>9</sup>. The antioxidant properties of rosemary, mainly attributed to the phenolic  
51 diterpene carnosic acid <sup>10</sup>, have been studied on meat when rosemary is included in the lambs'  
52 diet <sup>11-14</sup> or in the dams' diet <sup>15-17</sup>, for the cases of fattening lambs or suckling lambs, respectively  
53 However, to our knowledge, no studies have tested the effect of rosemary or carnosic acid when  
54 included in the diet of MR reared suckling lambs.

55 Therefore, the aim of the present study is to determine if the inclusion of carnosic acid in the  
56 diet (MR) of suckling lambs at the dose of 0.096 g per kg of live weight (LW) may reduce the lipid  
57 oxidation of the meat. A negative control group (animals with no antioxidants in the MR), and a  
58 positive control group (animals whose MR was supplemented with 0.024 g of vitamin E kg<sup>-1</sup> LW),  
59 were used to compare the results obtained.

## 60 MATERIAL AND METHODS

### 61 Animals and diets



62 Twenty four Assaf lambs were used in this experiment. Just after parturition the lambs were  
63 separated from the ewes, being fed their mothers' hand-milked colostrum for two days.  
64 Afterwards, lambs were fed by hand 2 more days with milk replacer (MR) (Cordevit, Lemasa,  
65 León, Spain) comprised of skim milk powder 50%, milk whey, cocoa vegetal oil, animal fats, whey  
66 protein powder and yeasts; DM 960 g kg<sup>-1</sup>, CP 235 g kg<sup>-1</sup> DM, EE 260 g kg<sup>-1</sup> DM, and ash 70 g  
67 kg<sup>-1</sup> DM. This MR was formulated without butylated hydroxy toluene (BHT) but included the  
68 following nutritional additives: vitamin A (80000 UI kg<sup>-1</sup>), vitamin D3 (4250 UI kg<sup>-1</sup>), vitamin E (60  
69 mg kg<sup>-1</sup>), iron (40 mg kg<sup>-1</sup>), cobalt (0.20 mg kg<sup>-1</sup>), copper (5 mg kg<sup>-1</sup>), manganese (25 mg kg<sup>-1</sup>),  
70 zinc (30 mg kg<sup>-1</sup>), selenium (0.20 mg kg<sup>-1</sup>), a preservative (potassium sorbate) and an emulsifier  
71 (lecithin).

72 Then the lambs were stratified on the basis of body weight (average BW, 5.95±0.766 kg), and  
73 allocated randomly to one of three different groups (n=8 per treatment); a control group (CTRL), a  
74 second group (CARN) fed a dose of 0.096 g of a commercial carnosic acid preparation per kg of  
75 LW (Shaanxi Sciphar Biotechnology Co., Ltd, Xi'an, China; carnosic acid concentration of 470 g  
76 kg<sup>-1</sup>), and a third group fed a dose of vitamin E (α-tocopheryl acetate 50%, Industrias de  
77 Alimentación Animal, Spain) at a dose of 0.024 g kg<sup>-1</sup> LW (VITE).

78 All the lambs were fed *ad libitum* with MR using an automatic feeder. In order to provide the  
79 antioxidant supplements, every day all the lambs were separated from the automatic lamb feeder  
80 at approximately 9:00 a.m. After two hours each lamb was fed with a feeding bottle containing the  
81 corresponding dose of supplement diluted in reconstituted MR (no more than 25 mL of MR). No  
82 antioxidants were included in the feeding bottle of the CTRL lambs. All handling practices during  
83 the rearing of lambs followed the recommendations of the European Council Directive  
84 86/609/EEC for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

85 Slaughter procedure, packaging, storage and sampling

86 The animals were slaughtered when the lambs reached the intended body weight (11-12 kg  
87 LW) by stunning and exsanguination from the jugular vein; they were then eviscerated and  
88 skinned. The hot carcass of each lamb was weighed, chilled at 4° C for 24 h and weighed again.  
89 The *longissimus thoracis* (LT) et *lumborum* (LL), *gluteus medius* (GM), and *biceps femoris* (BF)  
90 muscles were then removed from the right and left carcass sides, at 24 hours post-mortem.

91 The LT was immediately frozen at -20° and lyophilized in order to determinate chemical  
92 composition. The LL and GM muscles were cut into 2.5-cm thick slices, placed on impermeable  
93 polypropylene trays and wrapped with an oxygen-permeable polyvinylchloride film (oxygen  
94 permeability of 580 mL m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>). The packaged meat was then stored under simulated retail  
95 display conditions (12 h daily illumination and 3 ± 1 °C). A slice from each muscle was sampled  
96 from the trays at 0, 7, and 14 days of storage. Sampled meat slices were used to study the water  
97 holding capacity (WHC) via cooking losses (LL samples), thiobarbituric acid reactive substances  
98 (TBARS; raw GM samples), and cholesterol oxidation products (COPs; cooked GM samples).

99 Furthermore, BF was cut into three sections perpendicular to the long axis: proximal (1.5 cm  
100 long), central (the largest) and distal (1.5 cm) sections. Proximal and distal sections were  
101 discarded and the central section was cut into two slices (2 cm thick). Slices were cooked in a  
102 double-sided griddle plate (preheated at 220 °C) until a core temperature of 70 °C was reached  
103 <sup>18</sup>. After 30 min at 10 °C the slices were packaged in trays similar to those described previously for  
104 LL and GM muscle samples, and then used for the analysis of volatile compounds after 1 and 7  
105 days of refrigerated storage (3±1 °C in darkness).

#### 106 Proximate composition, pH and WHC

107 Proximate composition was determined in fresh LT samples (24 h post-mortem) in accordance  
108 with the methods described by the Association of Official Analytical Chemists <sup>19</sup>. During chilling of

109 the carcass, the pH value of *longissimus thoracis* muscle was determined at the sixth rib (right  
110 carcass) in triplicate at 0 h, 45 min and at 24 h post-mortem, using a pH meter equipped with a  
111 penetrating electrode (pH meter Metrohm® 704, Switzerland).

112 Finally, a slice of fresh LL (after 0, 7, and 14 days of refrigerated storage) was used to  
113 determine the water holding capacity via cooking losses (CL) according to Honikel <sup>(20)</sup>.

#### 114 Meat oxidation

115 TBARS content was determined on fresh GM samples stored during 0, 7, and 14 days in  
116 accordance with the methodology previously described in Morán et al. <sup>(14)</sup>. The results were  
117 expressed as µg of malonaldehyde (MDA) g<sup>-1</sup> meat.

118 COPs, also called oxysterols, were determined according to the method proposed by Grau et  
119 al. <sup>(21)</sup> on cooked GM samples stored for 7 days. Briefly, lipids were extracted from 1 g of cooked  
120 and freeze-dried GM samples according to Aldai et al. <sup>(22)</sup>, using 19-hydroxycholesterol (19-HC)  
121 as an internal standard. 10 mL of 1.5 methanolic KOH was then added and the mixture was kept  
122 in an orbital shaker for 20 hours at room temperature under N<sub>2</sub> atmosphere and darkness to  
123 complete the cold saponification. The unsaponifiable material was extracted, purified and  
124 cholesterol oxides were derivatized to trimethylsilyl (TMS) ethers according to Guardiola et al. <sup>(23)</sup>.  
125 Finally the following COPs: 7α-hydroxycholesterol (7α-HC), 7β-hydroxycholesterol (7β-HC), 5,6α-  
126 epoxycholesterol (α-CE), 5,6β-epoxycholesterol (β-CE), cholestanetriol (CT), 25-  
127 hydroxycholesterol (25-HC) and 7-ketocholesterol (7-KC), were analyzed by gas chromatographic  
128 (GC) according to Morán et al. <sup>(14)</sup>.

129 Volatile compounds of cooked meat stored under refrigeration during 1 and 7 days were  
130 determined by static headspace-gas chromatography coupled to mass spectrometry. Samples  
131 were blended in a small food processor. Three g of sample, 5 ml of water and 0.07 g of NaCl

132 were then placed in 20-ml headspace vials, sealed with magnetic screw caps with silicone/PTFE  
133 septa (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), and the vials were placed in a headspace  
134 tray for volatile analysis. Analysis of volatile compounds was performed using the equipment  
135 according to the procedure described by Vieira et al. (24).

## 136 Statistical analysis

137 COPs data were subjected to one-way analysis of variance with the diet as the only source of  
138 variation using the general linear models (GLM) procedure of SAS package <sup>25</sup>. WHC, TBARS and  
139 volatile compounds were subjected to two-way analysis of variance, with the dietary treatment,  
140 day and treatment by day interaction as sources of variation, using the GLM procedure of SAS.  
141 The pH was analyzed as a repeated measures design using the MIXED procedure of SAS with  
142 treatment and time as fixed effects and individual lamb as the experimental unit. In all the cases  
143 least square means were generated and separated using the LSMEANS/PDIFF option of SAS for  
144 main or interactive effects, with the level of significance being determined at  $P < 0.05$ .

## 145 RESULTS AND DISCUSSION

### 146 Proximate composition, pH and WHC

147 Chemical data corresponding to the lamb meat samples (LT) are summarized in Table 1. As  
148 can be observed the chemical composition of LT meat samples was not affected significantly by  
149 the dietary antioxidants (Table 1), but the quantity of crude protein were high in the lambs feeding  
150 carnosic acid, which is consistent with previous studies <sup>13,27</sup>.

151 [INSERT TABLE 1 NEAR HERE, PLEASE]

152 The pH values of the meat sample are summarized in Table 2. As expected, the pH values  
153 significantly decreased in all of the groups ( $P < 0.001$ ) after 45 min and 24 h post-mortem;

154 however, no significant differences ( $P>0.05$ ) between the groups were detected at any time.  
155 During heating (70°C), meat proteins denature and cause structural changes such as transversal  
156 and longitudinal shrinkage of muscle fibers and connective tissue <sup>29-31</sup>, so water is expelled due to  
157 the pressure exerted by the shrinking connective tissue <sup>32</sup>. Oxidative processes may contribute to  
158 the loss of membrane integrity and protein cross-link. Therefore, the use of antioxidants might  
159 improve the WHC <sup>28</sup>. Nonetheless, no significant differences were found between treatments for  
160 WHC (cooking loss; Table 2). Also, it must be noticed the significant reduction observed in the  
161 cooking losses with the storage time (Table 2), which is in line with previous experiments <sup>27, 28</sup>.

162 [INSERT TABLE 2 NEAR HERE, PLEASE]

163 Contradictory results regarding the effect of dietary antioxidants on WHC of meat can be  
164 found in the literature. For example, whereas some studies have described that WHC of meat is  
165 improved when vitamin E is fed to the animals <sup>28</sup>, some others <sup>13, 33, 34</sup> have observed a lack of  
166 effect of lipophilic antioxidants (such as carnosic acid or vitamin E) on WHC. This discrepancy  
167 might be explained as a consequence of different doses of antioxidants in the diet of the animals,  
168 or by different cooking procedures. Also, it has been suggested that WHC might be affected  
169 especially by protein oxidation, whereas lipophilic antioxidants such as vitamin E or carnosic acid  
170 would have no effect on this parameter <sup>33, 34</sup>.

#### 171 Meat oxidation

172 Figure 1 summarises the results on lipid oxidation (TBARS) in raw meat (GM muscle) after 0,  
173 7 or, 14 days of refrigerated storage. The levels of MDA during the whole storage period were the  
174 lowest for the VITE group, whereas CARN group showed intermediate values between CTRL and  
175 VITE group. The differences between CTRL and antioxidant supplemented groups (CARN and  
176 VITE) were significant after 14 days of refrigerated storage (Figure 1). In agreement with the

177 present study, previous experiments with meat from fattening lambs showed a significant  
178 reduction of TBARS values when animals were fed vitamin E or carnosic acid <sup>14</sup>. In line,  
179 precedent studies in suckling lambs has demonstrated improve the lipid stability of the meat when  
180 rosemary by-products were included in the diet of lactating ewes <sup>17, 35</sup>. However, in the present  
181 study the low levels of TBARS detected in the meat samples for all the experimental groups  
182 during the storage period might have hidden differences between treatments. The levels of MDA  
183 detected in suckling lambs meat during storage are very low when compared to meat from  
184 fattening lambs <sup>14</sup> or natural breast-feeding lambs <sup>17</sup>. In fact the low levels found might have been  
185 related to particularities of the rearing system used. Differences on meat quality have been shown  
186 between suckling lambs fed maternal milk (MM) and MR, with the meat of lambs fed on MR  
187 showing the highest oxidation stability probably as consequence of several differences on meat  
188 chemical composition <sup>4, 5, 26, 36</sup>.

189 [INSERT FIGURE 1 NEAR HERE, PLEASE]

190 Table 3 summarises the results obtained for the COPs in suckling lamb meat. First of all, it  
191 must be noted that fresh and raw meat tend to contain only trace amounts of COPs, whereas the  
192 oxysterols are mainly formed during the heat processing of meat <sup>37</sup>. This is the reason why, in the  
193 present study, COPs were determined in cooked GM samples after 7 days of refrigerated  
194 storage. As can be observed, lower significant values ( $P<0.05$ ) were observed for 7 $\alpha$ -HC in the  
195 VITE meat samples when compared to the CTRL group, whereas once again CARN meat  
196 samples only showed intermediate values. The other compounds determined (7 $\beta$ -HC,  $\beta$ -CE,  $\alpha$ -  
197 CE, CT, 25-HC, and 7-KC) showed no significant differences between groups, but it is  
198 remarkable the trend towards significantly lower levels ( $P=0.075$ ) in the total sum of COPs  
199 ( $\Sigma$ COPs Table 3) showed by the antioxidant groups (VITE and CARN) when compared to the  
200 CTRL meat samples. These results are similar to those reported in other studies where the

201 supplementation with vitamin E in diets either for pigs <sup>38</sup> or chickens <sup>21</sup> has been demonstrated to  
202 be effective in reducing oxysterols content in cooked meat samples. Also, a protective action of  
203 both vitamin E and carnosic acid against COPs formation during cooking has been reported  
204 previously in fattening lambs <sup>14</sup>.

205 [PLEASE INSERT TABLE 3 NEAR HERE]

206 COPs in meat samples have a great importance for human health because these compounds  
207 can be absorbed through the intestinal tract into the blood stream <sup>39</sup>, increasing the possibility of  
208 developing cardiovascular disease and atherosclerosis <sup>40</sup>. From this point of view it is remarkable  
209 the low levels detected for the most atherogenic compounds, CT and 25-HC, in all of the cooked  
210 meat samples, even in the CTRL group <sup>41,42</sup>.

211 The results regarding the volatile compounds detected in the headspace of cooked suckling-  
212 lamb meat of are summarized in Table 4. A total of 18 volatile compounds were detected, with 16  
213 of them being identified and assigned to the following seven chemical families (the number of  
214 compounds of each family is shown between brackets): straight-chain saturated hydrocarbons  
215 (5), straight-chain aliphatic aldehydes (5), straight-chain aliphatic ketons (2), straight-chain  
216 aliphatic alcohols (2), straight-chain aliphatic acids (1), and furan compounds (1). Among the  
217 identified compounds pentane, hexane, heptane, octane, 1-octene, pentanal, hexanal, heptanal,  
218 octanal, nonanal, 2-heptanone, 2,3-octanedione, pentanol, 2-octen-1-ol and 2-pentyl-furan can be  
219 considered as lipid-derived compounds, formed during storage and/or cooking of meat <sup>43-45</sup>.  
220 Among them, only the carbonyl compounds are shown in tables for brevity (Table 4) because this  
221 group of compounds was the predominant and is widely considered as suitable indicator of lipid  
222 oxidation status of meat <sup>46-48</sup>.

223 [PLEASE INSERT TABLE 4 NEAR HERE]

224 At day 1 of storage (24-h storage period), the concentration of hexanal, heptanal, octanal,  
225 nonanal and the sum of the carbonyl volatile compounds in headspace was lower in VITE group  
226 than in CTRL and CARN groups, with these two groups showing similar concentrations (Table 4).  
227 This means that vitamin E supplementation increased the stability of meat samples against lipid  
228 oxidation during the early refrigerated storage period, which is consistent with other studies <sup>49, 50</sup>.  
229 However, at day 7, although the levels of volatile carbonyls in headspace were increased in all of  
230 the groups (day  $P < 0.001$ ), no differences were detected between dietary treatments. This finding  
231 could be explained at least partially by a time-related decrease of vitamin E protection due to the  
232 continuous losses of vitamin E during the storage period of meat <sup>51</sup>.

233 According to these results, carnosic acid included in the diet of suckling lambs at a rate of  
234 0.096 g per kg of LW contribute to reduce the lipid oxidation of cooked meat samples. Previous  
235 experiments with fattening lambs supplemented with carnosic acid have demonstrated that lower  
236 levels than the dose used in the present study promoted very low levels of volatile compounds in  
237 meat, similar to those obtained when the fattening lambs were supplemented with vitamin E <sup>12</sup>.  
238 On the contrary, the same study demonstrated that increasing the levels of carnosic acid in the  
239 diet of fattening lambs resulted in an increment of volatile compounds in the meat, hence a  
240 reduction of lipid stability against oxidation processes. Consequently, future experiments could  
241 test lower doses of dietary carnosic acid in suckling lambs in order to test the effectiveness of this  
242 compound to reduce meat oxidation processes.

243 In conclusion at the dose used in the present study (0.096 g of carnosic acid per kg<sup>-1</sup> LW) and  
244 having into account the commercial MR used, it can be concluded that dietary carnosic acid  
245 supplemented to suckling lambs fed the MR increase the lipid stability of the meat. Other doses of  
246 this phenolic compound and the effect dietary carnosic acid on ewes' milk reared lambs should  
247 be tested in further studies.



## 249 REFERENCES

- 250 1. Sañudo, C.; Alfonso, M.; San Julian, R.; Thorkelsson, G.; Valdimarsdottir, T.; Zygoiannis, D.;  
251 Stamataris, C.; Piasentier, E.; Mills, C.; Berge, P. Regional variation in the hedonic evaluation  
252 of lamb meat from diverse production systems by consumers in six European countries. *Meat*  
253 *Sci.* 2007, 75, 610-621.
- 254 2. Bernabéu, R.; Tendero, A. Preference structure for lamb meat consumers. A Spanish case  
255 study. *Meat Sci.* 2005, 71, 464-470.
- 256 3. Gorraiz, C.; Beriain, M.J.; Chasco, J.; Iraizoz, M. Descriptive analysis of meat from young  
257 ruminants in Mediterranean systems. *J. Sens. Stud.* 2000, 15, 137-150.
- 258 4. Osorio, M.T.; Zumalacárregui, J.M.; Figueira, A.; Mateo, J. Fatty acid composition in  
259 subcutaneous, intermuscular and intramuscular fat deposits of suckling lamb meat: Effect of  
260 milk source. *Small Ruminant Research.* 2007, 73, 127-134.
- 261 5. Napolitano, F.; Cifuni, G.; Pacelli, C.; Riviezzi, A.; Girolami, A. Effect of artificial rearing on  
262 lamb welfare and meat quality. *Meat Sci.* 2002, 60, 307-315.
- 263 6. Gray, J.; Goma, E.; Buckley, D. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Sci.* 1996, 43,  
264 111-123.
- 265 7. Addis, P.B.; Emanuel, H.A.; Bergmann, S.D.; Zavoral, J.H. Capillary GC quantification of  
266 cholesterol oxidation-products in plasma-lipoproteins of fasted humans. *Free Radic. Biol. Med.*  
267 1989, 7, 179-182.
- 268 8. Decker, E.; Xu, Z. Minimizing rancidity in muscle foods. *Food Technol.* 1998, 52, 54-59.

- 269 9. Brewer, M. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential  
270 applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2011, 10, 221-247.
- 271 10. Moñino, I.; Martínez, C.; Sotomayor, J.; Lafuente, A.; Jordán, M. Polyphenolic transmission to  
272 Segureño lamb meat from ewes' diet supplemented with the distillate from rosemary  
273 (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 3363-3367.
- 274 11. Nieto, G.; Díaz, P.; Bañón, S.L.; Garrido, M.D. Effect on lamb meat quality of including thyme  
275 (*Thymus zygis ssp. gracilis*) leaves in ewes' diet. *Meat Sci.* 2010, 85, 82-88.
- 276 12. Morán, L.; Giráldez, F.J.; Panseri, S.; Aldai, N.; Jordán, M.J.; Chiesa, L.M.; Andrés, S. Effect  
277 of dietary carnosic acid on the fatty acid profile and flavour stability of meat from fattening  
278 lambs. *Food Chem.* 2013, 138, 2407-2414.
- 279 13. Morán, L.; Rodríguez-Calleja, J.; Bodas, R.; Prieto, N.; Giráldez, F.; Andrés, S. Carnosic acid  
280 dietary supplementation at 0.12% rates slows down meat discolouration in *gluteus medius* of  
281 fattening lambs. *Meat Sci.* 2012, 90, 789–795.
- 282 14. Morán, L.; Andrés, S.; Bodas, R.; Prieto, N.; Giráldez, F.J. Meat texture and antioxidant status  
283 are improved when carnosic acid is included in the diet of fattening lambs. *Meat Sci.* 2012, 91,  
284 430–434.
- 285 15. Nieto, G.; Bañón, S.; Garrido, M.D. Effect of supplementing ewes' diet with thyme (*Thymus*  
286 *zygis ssp. gracilis*) leaves on the lipid oxidation of cooked lamb meat. *Food Chem.* 2011, 125,  
287 1147-1152.
- 288 16. Nieto, G.; Díaz, P.; Bañón, S.; Garrido, M.D. Dietary administration of ewe diets with a  
289 distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Influence on lamb meat quality.  
290 *Meat Sci.* 2010, 84, 23-29.

- 291 17. Nieto, G.; Estrada, M.; Jordán, M.J.; Garrido, M.D.; Bañón, S. Effects in ewe diet of rosemary  
292 by-product on lipid oxidation and the eating quality of cooked lamb under retail display  
293 conditions. *Food Chem.* 2011, *124*, 1423-1429.
- 294 18. AMSA *Research guidelines for cookery, sensory evaluation and instrumental tenderness*  
295 *measurements of fresh meat*. American Meat Science Association in cooperation with  
296 National Live Stock and Meat Board.: Chicago, Illinois, 1995.
- 297 19. AOAC Association of Analytical Communities: Gaithersburg, MD, USA, 2003.
- 298 20. Honikel, K.O. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat.  
299 *Meat Sci.* 1998, *49*, 447-457.
- 300 21. Grau, A.; Codony, R.; Grimpa, S.; Baucells, M.; Guardiola, F. Cholesterol oxidation in frozen  
301 dark chicken meat: influence of dietary fat source, and alpha-tocopherol and ascorbic acid  
302 supplementation. *Meat Sci.* 2001, *57*, 197-208.
- 303 22. Aldai, N.; Dugan, M.E.R.; Kramer, J.K.G. Can the *trans*-18: 1 and conjugated linoleic acid  
304 profiles in retail ground beef be healthier than steak? *Journal of Food Composition and*  
305 *Analysis.* 2010, *23*, 326-332.
- 306 23. Guardiola, F.; Codony, R.; Rafecas, M.; Boatella, J. Comparison of three methods for the  
307 determination of oxysterols in spray-dried egg. *Journal of chromatography A.* 1995, *705*, 289-  
308 304.
- 309 24. Vieira, C.; Fernández-Diez, A.; Mateo, J.; Bodas, R.; Soto, S.; Manso, T. Effects of addition of  
310 different vegetable oils to lactating dairy ewes' diet on meat quality characteristics of suckling  
311 lambs reared on the ewes' milk. *Meat Sci.* 2012, *91*, 277-282.

- 312 25. SAS SAS/STAT(R) user's guide (version 8), previous SAS term Publishing, Cary, NC, USA.,  
313 1999.
- 314 26. Osorio, M.T.; Zumalacárregui, J.M.; Cabeza, E.A.; Figueira, A.; Mateo, J. Effect of rearing  
315 system on some meat quality traits and volatile compounds of suckling lamb meat. *Small*  
316 *Ruminant Research*. 2008, 78, 1-12.
- 317 27. Abdullah, Y.; Qudsieh, R.I. Effect of slaughter weight and aging time on the quality of meat  
318 from Awassi ram lambs. *Meat Sci*. 2009, 82, 309-316.
- 319 28. Mitsumoto, M.; Arnold, R.N.; Schaefer, D.M.; Cassens, R.G. Dietary vitamin E  
320 supplementation shifted weight loss from drip to cooking loss in fresh beef longissimus during  
321 display. *J. Anim. Sci*. 1995, 73, 2289-2294.
- 322 29. Offer, G. Progress in the biochemistry, physiology and structure of meat. 1984, 30, 217-234.
- 323 30. Hamm, R. Changes of muscle proteins during the heating of meat. *Physical, chemical and*  
324 *biological changes in food caused by thermal processing* 1977, 101-134.
- 325 31. Barbera, S. Meat cooking shrinkage: Measurement of a new meat quality parameter. *Meat*  
326 *Sci*. 2006, 73, 467-474.
- 327 32. Tornberg, E. Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat  
328 products. *Meat Sci*. 2005, 70, 493-508.
- 329 33. Kazemi, S.; Ngadi, M.O.; Gariépy, C. Protein denaturation in pork longissimus muscle of  
330 different quality groups. *Food and Bioprocess Technology*. 2011, 4, 102-106.
- 331 34. Van Laack, R.; Liu, C.; Smith, M.; Loveday, H. Characteristics of pale, soft, exudative broiler  
332 breast meat. *Poult. Sci*. 2000, 79, 1057-1061.

- 333 35. Nieto, G.; Estrada, M.; Díaz, P.; Bañón, S.; Garrido, M.D. Prevention of lipid oxidation of  
334 cooked lamb meat through feeding with by-products of *Rosmarinus officinalis*. In ICoMST  
335 Helsinki, Denmark 2008.
- 336 36. Lanza, M.; Bella, M.; Priolo, A.; Barbagallo, D.; Galofaro, V.; Landi, C.; Pennisi, P. Lamb meat  
337 quality as affected by a natural or artificial milk feeding regime. *Meat Sci.* 2006, 73, 313-318.
- 338 37. Paniangvait, P.; King, A.; Jones, A.; German, B. Cholesterol oxides in foods of animal origin.  
339 *J. Food Sci.* 1995, 60, 1159-1174.
- 340 38. Eder, K.; Müller, G.; Kluge, H.; Hirche, F.; Brandsch, C. Concentrations of oxysterols in meat  
341 and meat products from pigs fed diets differing in the type of fat (palm oil or soybean oil) and  
342 vitamin E concentrations. *Meat Sci.* 2005, 70, 15-23.
- 343 39. Vine, D.; Croft, K.; Beilin, L.; Mamo, J.C.L. Absorption of dietary cholesterol oxidation  
344 products and incorporation into rat lymph chylomicrons. *Lipids* 1997, 32, 887-893.
- 345 40. Leonarduzzi, G.; Sottero, B.; Poli, G. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic  
346 origin, and proatherosclerotic effects (review). *J. Nutr. Biochem.* 2002, 13, 700-710.
- 347 41. Peng, S.; Taylor, C.; Hill, J.; Morin, R. Cholesterol oxidation derivatives and arterial  
348 endothelial damage. *Atherosclerosis.* 1985, 54, 121-133.
- 349 42. Taylor, C.; Peng, S.; Werthessen, N.; Tham, P.; Lee, K. Spontaneously occurring angiotoxic  
350 derivatives of cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 1979, 32, 40-57.
- 351 43. Mottram, D.S. Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chem.* 1998, 62,  
352 415-424.
- 353 44. Frankel, E.N. Volatile lipid oxidation products. *Prog. Lipid Res.* 1983, 22, 1-33.

- 354 45. Sivadier, G.; Ratel, J.; Bouvier, F.; Engel, E. Authentication of meat products: determination of  
355 animal feeding by parallel GC-MS analysis of three adipose tissues. *J. Agric. Food Chem.*  
356 2008, *56*, 9803-9812.
- 357 46. Gray, J.I.; Monahan, F.J. Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trends*  
358 *Food Sci. Technol.* 1992, *3*, 315-319.
- 359 48. Shahidi, F.; Zhong, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.*  
360 2010, *39*, 4067-479.
- 361 48. Shahidi, F.; Pegg, R.B. Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. *Journal of Food*  
362 *Lipids* 1994, *1*, 177-186.
- 363 49. Lauzurica, S.; de la Fuente, J.; Diaz, M.T.; Alvarez, I.; Perez, C.; Caneque, V. Effect of dietary  
364 supplementation of vitamin E on characteristics of lamb meat packed under modified  
365 atmosphere. *Meat Sci.* 2005, *70*, 639-646.
- 366 50. López-Bote, C.J.; Daza, A.; Soares, M.; Berges, E. Dose-response effect of dietary vitamin E  
367 concentration on meat quality characteristics in light-weight lambs. *Animal Science* 2001, *73*,  
368 451-458.
- 369 51. Kerry, J.; O'Sullivan, M.; Buckley, D.; Lynch, P.; Morrissey, P. The effects of dietary  $\alpha$ -  
370 tocopheryl acetate supplementation and modified atmosphere packaging (MAP) on the quality  
371 of lamb patties. *Meat Sci.* 2000, *56*, 61-66.

## 372 ACKNOWLEDGMENTS

373 Financial support received from Ministry of Economy and Competitiveness and the Spanish  
374 National Research Council (Project 201240E105) are gratefully acknowledged. Lara Morán was

375 supported by a JAE-Predoc grant from the CSIC under the program 'Junta para la Ampliación de  
376 Estudios' (European Social Fund).

Table 1. Proximate composition of *longissimus thoracis* muscle (g kg<sup>-1</sup> meat) of the lambs.

	CTRL <sup>a</sup>	CARN <sup>b</sup>	VITE <sup>c</sup>	SED <sup>d</sup>	<i>p</i> -value
dry matter	241	235	237	3.71	0.261
crude protein	204	207	202	8.84	0.855
ether extract	15.2	18.3	14.5	2.64	0.335
ash	16.2	17.1	17.2	1.53	0.779

<sup>a</sup> no antioxidants group; <sup>b</sup> 0.096 g of carnosic acid kg<sup>-1</sup> of live weight group; <sup>c</sup> 0.024 g  $\alpha$ -tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of live weight group. <sup>d</sup> standard error of the difference.



Table 2. Post-slaughter evolution of pH values in the *longissimus thoracis* muscle of the lambs, and water holding capacity (WHC, % of water losses after cooking) in *longissimus lumborum* samples stored at 4°C during 0, 7, and 14 days

	CTRL <sup>a</sup>	CARN <sup>b</sup>	VITE <sup>c</sup>	RSD <sup>e</sup>	P-value		
					Treatment	Time <sup>d</sup>	Treatment*Time
pH							
0 min	6.41a	6.44a	6.29a				
45 min	6.25b	6.17b	6.09b	0.167	0.331	<0.0001	0.649
24 hours	5.67c	5.70c	5.69c				
Water holding capacity				SED <sup>f</sup>			
0 day	17.8a	15.0a	17.8a				
7 day	15.1a	14.5a	15.7a	2.04	0.612	<0.0001	0.835
14 day	8.66b	9.09b	8.64b				

<sup>a</sup> no antioxidants group; <sup>b</sup> 0.096 g of carnosic acid kg<sup>-1</sup> of live weight group; <sup>c</sup> 0.024 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of live weight group. <sup>d</sup> (a, b, c) letters in the same column indicate statistical differences between time ( $P < 0.05$ ). <sup>e</sup> residual standard deviation; <sup>f</sup> standard error of the difference.

Table 3. Cholesterol oxidation products content (ng g<sup>-1</sup> meat; cooked *gluteus medius*) after 7 days of refrigerated storage at 4°C.

cholesterol oxidation products <sup>a</sup>	CTRL <sup>b</sup>	CARN <sup>c</sup>	VITE <sup>d</sup>	SED <sup>e</sup>	<i>p</i> -value <sup>f</sup>
7α-HC	1.74a	0.96ab	0.84b	0.278	0.050
7β-HC	2.07	1.87	1.16	0.522	0.377
β-CE	2.48	2.08	2.12	0.404	0.629
α-CE	0.74	0.81	0.75	0.199	0.942
CT	0.38	0.06	0.20	0.134	0.115
25-HC	0.14	0.02	0.08	0.053	0.115
7-KC	2.42	1.69	1.30	0.628	0.385
ΣCOPs	10.2	6.08	5.48	1.594	0.075

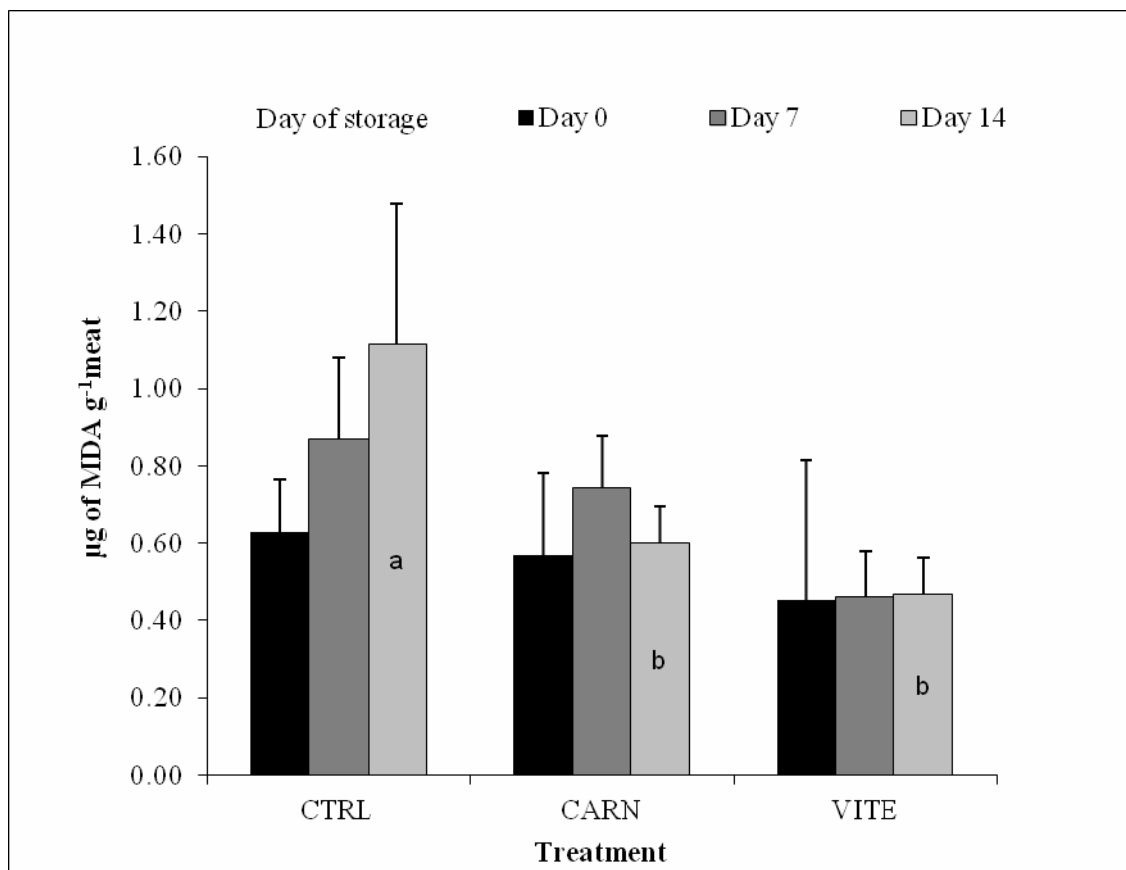
<sup>a</sup> 7α-HC, 7α-hydroxycholesterol; 7β-HC, 7β-hydroxycholesterol; α-CE, 5,6α-epoxycholesterol; β-CE, 5,6β-epoxycholesterol; CT, cholestanetriol; 25-HC, 25-hydroxycholesterol; 7-KC, 7-ketocholesterol; ΣCOPs: sum of total oxysterols. <sup>b</sup> no antioxidants group; <sup>c</sup> 0.096 g of carnosic acid kg<sup>-1</sup> of live weight group; <sup>d</sup> 0.024 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of live weight group. <sup>e</sup> standard error of the difference; <sup>f</sup> (a, b) letters in the same line indicate statistical differences between treatments (*P*<0.05).

Table 4. Carbonyl volatile compounds (expressed as ng undecane g<sup>-1</sup>) in suckling-lamb cooked meat samples after 1 and 7 days of refrigerated storage.

carbonyl volatile compounds	storage day	CTRL <sup>a</sup>	CARN <sup>b</sup>	VITE <sup>c</sup>	SED <sup>d</sup>	<i>p</i> -value		
						treatment	day	treatment*day <sup>e</sup>
pentanal	1	23.1	23.6	18.2	2.47	0.670	<.0001	0.060
	7	31.6	31.0	33.8				
hexanal	1	198b	198b	134a	22.2	0.415	<.0001	0.010
	7	315c	310c	338c				
heptanal	1	4.51b	4.52b	3.16a	0.500	0.238	<.0001	0.043
	7	6.78c	7.03c	7.19c				
octanal	1	3.43ab	3.62b	2.38a	0.436	0.598	<.0001	0.008
	7	4.59c	4.78c	5.37c				
nonanal	1	9.11b	9.95b	5.80a	1.371	0.187	<.0001	0.020
	7	13.0c	14.5c	15.1c				
2-heptanone	1	0.69	0.68	0.20	0.375	0.913	0.0226	0.066
	7	0.88	0.78	1.49				
2,3-octanedione	1	1.55	1.60	0.89	0.472	0.954	<.0001	0.148
	7	5.19	5.11	5.65				
Σ carbonyl volatile compounds	1	240b	241b	164a	25.7	0.404	<.0001	0.007
	7	377c	373c	407c				

<sup>a</sup> no antioxidants group; <sup>b</sup> 0.096 g of carnosic acid kg<sup>-1</sup> of live weight group; <sup>c</sup> 0.024 g α-tocopheryl acetate kg<sup>-1</sup> of live weight). <sup>d</sup> standard error of the difference; <sup>e</sup> (a, b, c) letters in the same line indicate statistical differences in treatment\* day (*P*<0.05) .

Figure 1. Mean values  $\pm$  standard error of the mean for TBARS ( $\mu\text{g MDA g}^{-1}$  meat) after 0, 7 and 14 days of refrigerated storage of lamb meat samples (*gluteus medius* muscle) at 4 °C. CTRL group (no antioxidants); CARN (0.096 g carnosic acid  $\text{kg}^{-1}$  of live weight); VITE (0.024 g  $\alpha$ -tocopheryl acetate  $\text{kg}^{-1}$  of live weight); a, b, c: different letters in the same day indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ) between treatments.





---

## DISCUSIÓN GENERAL

A lo largo de los últimos años, la comunidad científica se ha centrado en la búsqueda de nuevos aditivos naturales (origen vegetal) con propiedades antioxidantes o antimicrobianas, que, incluidos en la ración de los animales, permitan mejorar el bienestar animal y la calidad de la carne. Esto se debe, por una parte, a que la legislación más reciente en seguridad alimentaria ha prohibido la utilización de antibióticos como promotores del crecimiento y, por otra, a las exigencias de los consumidores, cada vez más preocupados por la calidad de los productos que consumen como consecuencia de las crisis alimentarias acaecidas a lo largo de las últimas dos décadas (Nieto et al., 2008).

En este sentido, existen estudios previos en los que se ha constado que el romero administrado en la ración de corderos (Nieto et al., 2008) y de ovejas (Nieto et al., 2011) permite mejorar la estabilidad oxidativa de la carne de corderos de cebo y lechales, respectivamente. También se ha comprobado que el compuesto que se retiene en la carne, y al cual se atribuyen las propiedades antioxidantes del romero, es el ácido carnósico (Moñino et al., 2008). No obstante, la concentración de ácido carnósico en la planta en desarrollo puede variar en función de su fenología y de las condiciones climatológicas, por lo que sería más adecuado realizar un racionamiento de los animales atendiendo al contenido de dicho compuesto en el romero. Por esta razón el trabajo presentado en esta tesis doctoral pretende determinar la dosis óptima a la que el ácido carnósico debe ser administrado en la ración de los corderos para mejorar los parámetros de calidad de la carne, así como dilucidar si existe algún efecto de este antioxidante sobre el bienestar animal.

Todos los resultados obtenidos han sido previamente discutidos en los artículos correspondientes, por lo que en esta sección se hará una recopilación de datos con el objeto de presentar una discusión general de todos ellos.

## **Bienestar animal en corderos de cebo**

El bienestar de los animales es un aspecto que cada vez tiene más importancia en todos los ámbitos de nuestra sociedad dado que tiene implicaciones éticas pero también productivas. En el caso concreto del cebo intensivo de corderos, la patología con mayor incidencia, asociada al sistema de manejo es la acidosis ruminal.

Además de las alteraciones patológicas señaladas, la acidosis ruminal puede influir también en el rendimiento productivo, disminuyendo la ganancia diaria de peso y el índice de conversión, no obstante, en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos en parámetros como el índice de conversión o la ganancia diaria de peso

Sin embargo, el pH sanguíneo y el resto de los parámetros ácido-base en sangre (como, por ejemplo,  $p\text{CO}_2$ ) mostraron diferencias significativas entre los grupos que consumían ácido carnósico (y vitamina E) y el grupo CONTROL, diferencias que indican que la acidosis metabólica se ve corregida por la incorporación de antioxidantes en la dieta de los corderos. Por último cabe destacar que la presencia de  $\text{K}^+$  en sangre se vio reducida por la inclusión de ácido carnósico y vitamina E en la dieta, posiblemente debido a que su actividad antioxidantes evita que las ROS inactiven los canales de iones encargados de mantener bajas concentraciones extracelulares de  $\text{K}^+$ , necesarias para preservar el gradiente de  $\text{K}^+$  a través de las membranas celulares con el fin de que se produzca la excitación nerviosa, (Hoshi y Heinemann, 2001).

La adición de ácido carnósico a la ración de los corderos de cebo modificó significativamente la composición de la población bacteriana de las heces, afectando concretamente a los grupos bacterianos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Esta modificación de la microbiota a nivel del intestino grueso podría haber ocasionado cambios en la digestibilidad de los alimentos (Ley, Turnbaugh, Klein y Gordon, 2006; Turnbaugh et

al., 2006). Este efecto no ha sido estudiado en el presente trabajo, pero la ausencia de diferencias en la ganancia diaria de peso y en el índice de conversión, a priori, no apoyarían su existencia.

Dado que no existe información previa acerca del efecto del ácido carnósico sobre el bienestar animal, se midieron distintos parámetros relacionados con el sistema inmune y la respuesta de los animales frente al estrés del transporte, ya que todas estas cuestiones se encuentran relacionadas con la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y, por tanto, los antioxidantes podrían ejercer algún tipo de modulación al respecto.

Con respecto al efecto de la suplementación con antioxidantes sobre el sistema inmune de corderos de cebo, la vitamina E provocó un descenso del número de glóbulos blancos circulares, un incremento en la proporción de linfocitos CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> respecto al grupo control, así como una mayor producción de interferón gamma, lo que se encuentra en consonancia con los datos obtenidos en ratas y broilers (Erf, Bottje, Bersi, Headrick y Fritts, 1998; Moriguchi et al., 1993) y con las propiedades inmunomoduladoras atribuidas a este compuesto (Meydani et al, 1986; Meydani et al., 1997; Zheng et al., 1999). No obstante, el significado biológico de estos efectos habrá de ser esclarecido en el futuro. La inclusión de ácido carnósico en la dieta de dichos corderos no generó modificaciones estadísticamente significativas en dichos parámetros.

También se observaron diferencias en las células sanguíneas en la serie roja de tal manera que los animales que consumieron las dosis más altas de ácido carnósico, a pesar de mantener su hematocrito, poseían menor concentración de hemoglobina. Esto puede explicarse por un incremento del tamaño de los eritrocitos, lo que podría estar relacionado con un mayor número de eritrocitos inmaduros circulantes como consecuencia del efecto quelante de los compuestos fenólicos sobre el hierro (Gnanamani et al., 2008). En todo caso, estos resultados concuerdan perfectamente



con los niveles de luminosidad ( $L^*$ ) más altos en la carne de los animales que habían consumido dicho compuesto.

En relación a la respuesta de los animales frente al estrés, todos los animales presentaron niveles sanguíneos de cortisol y glucosa similares tras el transporte (Nwe, Hori, Manda y Watanabe, 1996). No obstante, los animales que consumieron la dosis más baja de carnósico ( $0,06 \text{ g kg}^{-1} \text{ MF}$ ) presentaron niveles de creatina fosfoquinasa inferiores al control, lo que podría ser indicativo de una mayor protección (Kramer y Hoffmann, 1997).

Además, el estrés del transporte provocó cambios a nivel de la serie blanca, de modo que se observó un incremento en los recuentos de monocitos y en la relación granulocitos/linfocitos en los animales que habían consumido antioxidantes ( $1,2 \text{ g}$  de ácido carnósico y  $0,06 \text{ g}$  de vitamina E por  $\text{kg}^{-1} \text{ MF}$ ) con respecto a los del grupo CONTROL. No obstante, el significado biológico de estas modificaciones provocadas por el estrés del transporte en los animales que consumían antioxidantes deberá ser esclarecido en nuevos experimentos diseñados a tal efecto.

### **Calidad de carne y estabilidad oxidativa en corderos de cebo**

En primer lugar, cabe destacar que se observaron cambios significativos en la composición química de la carne (*longissimus thoracis*) con valores superiores de proteína en aquellos animales que consumían ácido carnósico como antioxidante ( $197$  vs  $202 \text{ g/kg}$  de proteína bruta). No se observaron diferencias ni en la cantidad de grasa ni en el perfil de ácidos grasos. Diferentes estudios han puesto de manifiesto que los compuestos fenólicos pueden modificar el proceso de la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos, modificando el perfil de ácidos grasos en leche y carne. Este efecto se ha asociado con la modificación de la población microbiana del rumen. En nuestro caso, los estudios de microbiología ruminal no han puesto de manifiesto efecto alguno del ácido carnósico sobre la diversidad de la microbiota ruminal. Por

otro lado, el aporte de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta fue muy bajo, ya que no se incluyeron aceites vegetales ni forrajes. Puesto que no se apreciaron diferencias en la ingestión, ni en la ganancia diaria de peso, y que la dieta consumida era la misma en todos los tratamientos experimentales, la mayor retención de proteína estaría relacionada con diferencias en la utilización digestiva o metabólica, pero no se dispone de datos suficientes para formular una hipótesis plausible.

Con el fin de conocer el efecto del ácido carnósico sobre la vida útil de la carne se midieron parámetros relacionados con el color y el crecimiento microbiano a lo largo del periodo de almacenamiento. Para medir el color se seleccionó el músculo *longissimus lumborum* (LL), con una elevada estabilidad oxidativa, y el músculo *gluteus medius* (GM), con una estabilidad oxidativa más baja. Los niveles de L\* (luminosidad) en el caso del lomo (LL) fueron más elevados durante todo el proceso de almacenamiento en los animales que habían consumido antioxidantes con el pienso suministrado (ácido carnósico -0,6 ó 0,12 g kg<sup>-1</sup> MF- o vitamina E -0,6 g kg<sup>-1</sup> MF-), probablemente como consecuencia de la variación en el contenido de pigmentos hemínicos presentes en carne. Esto podría ser debido a las propiedades quelantes del ácido carnósico, que disminuiría los niveles de hierro disponible (Samman et al., 2001), o a la incorporación de vitamina E en la dieta (Lan y Jiang, 1997). A su vez, y a pesar de que las diferencias no fueron significativas, se observó que en el LL de los animales que no habían consumido antioxidantes (CONTROL) se alcanzaron los valores de C\* máximos (saturación de color) antes que la de los grupos CARN012 y VITE006, aunque también mostró una decoloración más temprana. Por otro lado, a pesar de que las diferencias no fueron estadísticamente significativas, los niveles de H\* (tonalidad) en el mismo músculo (LL), al final del periodo de almacenamiento fueron más elevados en el caso del grupo CONTROL, lo que podría indicar la existencia de niveles de metamioglobina más elevados.

En el caso del GM, músculo con una estabilidad oxidativa más baja, se observaron diferencias en la evolución del color con respecto al caso anterior, siendo la más

importante el ascenso en los valores de  $L^*$  en la carne de los animales CONTROL a partir del 7º día de almacenamiento, probablemente como consecuencia del aumento de metamioglobina (Renner, 1990). Con respecto a la saturación de color ( $C^*$ ), la incorporación tanto de ácido carnósico (CARN012) como de vitamina E en la dieta de los corderos retrasó el inicio de la decoloración de la carne dos días respecto a la de los animales pertenecientes al grupo CONTROL. Además, los valores de  $H^*$  de la carne correspondiente a los grupos CARN012 y VITE006 fueron significativamente inferiores a los del grupo CONTROL tras 14 días de almacenamiento, lo que también indicaría una menor proporción de metamioglobina (coloración marrón-parduzca), pigmento claramente relacionado con el rechazo de la carne por parte del consumidor (Greene, Hsin y Zipser, 1971).

Los datos de color están en consonancia con los niveles de oxidación lipídica (TBARS) detectados en ambos músculos (LL y GM), dado que las diferencias entre el grupo CARN012 y el grupo CONTROL aparecen en GM tras 7 días de almacenamiento de la carne en condiciones de refrigeración. Sin embargo, hasta el día 14 de almacenamiento estas diferencias no son estadísticamente significativas en el caso del LL. Cuando se analizaron los óxidos de colesterol (COPs) presentes en carne cocinada tras 7 días de almacenamiento (GM) se observó una reducción significativa en los niveles de COPs totales en aquellos animales que habían consumido antioxidantes (CARN006, CARN012 y VITE006), probablemente debido a la protección ejercida por estos compuestos durante el almacenamiento de la carne y, posteriormente, durante el cocinado.

En lo que se refiere a las características microbiológicas de la carne, no se obtuvieron diferencias significativas que indiquen que el ácido carnósico o la vitamina E actúen como antimicrobianos. Existen trabajos previos que han puesto de manifiesto, si bien en el caso de los diterpenos fenólicos presentes en el romero, parece que es carnosol y no el ácido carnósico el que muestra un mayor potencial bacteriostático (Jordán, Lax, Rota, Lorán y Sotomayor, 2012). Otros autores atribuyen

la mayor parte de la actividad antimicrobiana del romero a compuestos secundarios como el  $\alpha$ -pineno, bornilacetato, camfor y 1,8-cineol (Daferera, Ziogas, Polissiou, 2000; Pintore et al., 2002).

En lo que respecta a la formación de sabores durante el cocinado, hay que remarcar que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son los principales precursores de los compuestos volátiles relacionados con la aparición de sabores indeseables en la carne cocinada (Elmore, Mottram, Enser y Wood, 1999). Sin embargo, tal y como se indicó con anterioridad, el perfil de PUFAs no se vio modificado como consecuencia del ácido carnósico añadido a la dieta. Por tanto, la menor concentración ( $P < 0.005$ ) de compuestos volátiles en la carne del grupo CARN006 almacenada durante 3 días con respecto al grupo CONTROL no se debió a una reducción del sustrato de oxidación, sino a la protección antioxidante ejercida por el ácido carnósico a nivel de la carne. No obstante, los resultados obtenidos con la carne del grupo CARN012, que mostró valores de producción de aldehídos significativamente más elevados que el grupo CARN006, indican la posible existencia de un fenómeno de hormesis (Calabrese, 2010) que desaconsejaría la utilización de dosis elevadas de ácido carnósico en la ración de los corderos.

Finalmente, la suplementación de la dieta de los corderos con ácido carnósico mejoró significativamente la textura de la carne, probablemente debido a la protección de las proteasas endógenas,  $\mu$ -calpaina y m-calpaina, frente a la oxidación durante la maduración de la carne, lo que habría facilitado la retención de agua (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005). De hecho, el porcentaje de agua perdida tras el cocinado fue más elevado en la carne procedente de animales del grupo CONTROL. Con respecto a la oxidación proteica no se observaron diferencias entre los diferentes grupos, probablemente debido a que tanto la vitamina E como el ácido carnósico son compuestos liposolubles.

### Estabilidad oxidativa en carne de corderos lechales

En coincidencia con los resultados obtenidos en los experimentos con corderos de cebo no se observaron diferencias significativas en la ganancia diaria de peso entre los tratamientos (Control: 234 g/día; Ácido carnósico 241 g/día y Vitamina E 242 g/día).

La carne de animales que recibieron el suplemento de antioxidantes (ácido carnósico y vitamina E), presentó una oxidación lipídica significativamente menor tras 14 días de almacenamiento (TBARs) ( $P < 0,05$ ).

La carne de los animales que recibieron ácido carnósico como aditivo presentó valores inferiores al grupo control, en los niveles de  $7\alpha$ -hidroxicolesterol que no fueron significativamente diferentes de los observados en los otros dos tratamientos.

Esto sugiere que el ácido carnósico está ejerciendo cierto efecto antioxidante a nivel lipídico, que no alcanzó la significación estadística en el caso de los óxidos de colesterol, probablemente debido a la elevada variación individual. No obstante, cabe señalar que el grado de oxidación observado en la carne de cordero lechal fue muy inferior a la alcanzada en carne de corderos de cebo, tal y como ponen de manifiesto los valores máximos de TBARs ( $8\mu\text{g MDA g}^{-1}$  de carne vs  $1,2\mu\text{g MDA g}^{-1}$  de carne, en corderos de cebo y lechales respectivamente).



---

## CONCLUSIONS

Regarding animal welfare, the conclusions obtained as a result of the inclusion of carnosic acid in the diet of fattening lambs were as follows:

1. Metabolic acidosis is corrected by carnosic acid, thus preserving the acid–base status of fattening lambs fed high-grain diets.
2. Dietary carnosic acid does not reduce ruminal acidosis or modify the microbial diversity in ruminal contents but promotes changes in the faecal bacterial community of fattening lambs.

The following conclusions regarding the inclusion of carnosic acid in the diet of lambs and its effects on the quality parameters of meat stored at refrigerated storage can be extracted:

3. Carnosic acid included in the diet of fattening lambs reduces meat discoloration ( $1.2 \text{ g kg}^{-1}$  feed concentrate), thus extending the shelf life of this product under modified atmosphere conditions (MAP). However, at the doses studied ( $0.6$  and  $1.2 \text{ g kg}^{-1}$  feed concentrate) carnosic acid does not reduce the microbial spoilage of meat under MAP conditions.
4. Carnosic acid included in the diet of fattening lambs ( $0.6$  and  $1.2 \text{ g kg}^{-1}$  feed concentrate) reduces lipid oxidation, cholesterol oxidation products, and shear-force values (hardness), thus improving the quality parameters of meat stored under MAP conditions.
5. Carnosic acid included in the diet of fattening lambs ( $0.6 \text{ g kg}^{-1}$  feed concentrate) inhibits the production of volatile compounds after 3 days of refrigerated storage in a dose-dependent manner. High doses of carnosic acid ( $1.2 \text{ g kg}^{-1}$  feed concentrate) seem to be detrimental.
6. Carnosic acid included in the diet of artificially reared suckling lambs at a rate of  $0.096 \text{ g kg}^{-1}$  live weight does reduce the lipid oxidation of the meat stored under refrigerated storage.



---

## **CONCLUSIONES**



En el caso del bienestar animal, las conclusiones obtenidas como resultado de la inclusión de ácido carnósico en la dieta de los corderos de cebo fueron las siguientes:

1. La acidosis metabólica es corregida por el ácido carnósico, por tanto permite preservar el estatus ácido-base de los corderos de cebo alimentados con dietas elevadas en grano.
2. El ácido carnósico en la dieta no reduce la acidosis ruminal ni modifica la diversidad microbiana a nivel ruminal, sin embargo produce cambios en la comunidad bacteriana fecal en corderos de cebo.

Las siguientes conclusiones fueron extraídas de la adición de ácido carnósico en la dieta de corderos, sobre los parámetros de calidad de carne almacenada refrigerada:

3. El ácido carnósico incluido en la dieta de los corderos de cebo reduce la decoloración de la carne ( $1,2 \text{ g kg}^{-1}$  de concentrado), incrementando por tanto la vida útil del producto bajo condiciones de atmósfera modificada (MAP). Por el contrario a las dosis estudiadas ( $0,6$  y  $1,2 \text{ g kg}^{-1}$  concentrado) el ácido carnósico no reduce la contaminación microbiana bajo condiciones MAP.
4. El ácido carnósico incluido en la dieta de los corderos de cebo ( $0,6$  y  $1,2 \text{ g kg}^{-1}$  concentrado) reduce la oxidación lipídica, la formación de productos de oxidación del colesterol, y valores de resistencia al corte (dureza), mejorando los parámetros de calidad de carne bajo condiciones MAP.
5. El ácido carnósico incluido en la dieta de corderos de cebo ( $0,6 \text{ g kg}^{-1}$  concentrado), inhibe la producción de compuestos volátiles tras 3 días de almacenamiento refrigerado de manera dosis dependiente. Dosis altas de ácido carnósico ( $1,2 \text{ g kg}^{-1}$  concentrado) parecen actuar en detrimento.
6. El ácido carnósico incluido en la dieta de corderos lechales amamantados artificialmente a razón de  $0,096 \text{ g kg}^{-1}$  de peso vivo reduce la oxidación lipídica de la carne almacenada refrigerada.



## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Abumohor, G. (2005). Fisiología de la respuesta inmune; Physiology of immune response. *Revista Chilena de Reumatología*, 21(2), 51-57.
- Adachi, S., Kawamura, K. y Takemoto, K. (1993). Oxidative damage of nuclear DNA in liver of rats exposed to psychological stress. *Cancer Research*, 53(18), 4153-4155.
- Addis, P. B., Emanuel, H. A., Bergmann, S. D. y Zavoral, J. H. (1989). Capillary GC quantification of cholesterol oxidation-products in plasma-lipoproteins of fasted humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(2), 179-182.
- Ahn, D., Nam, K., Du, M. y Jo, C. (2001). Volatile production in irradiated normal, pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) pork under different packaging and storage conditions. *Meat Science*, 57(4), 419-426.
- Ahn, J., Grün, I. y Fernando, L. (2002). Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. *Journal of Food Science*, 67(4), 1364-1369.
- Al Sheyab, F. M., Abuharfeil, N., Salloum, L., Hani, R. B. y Awad, D. S. (2012). The effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*. L) plant extracts on the immune response and lipid profile in mice. *Journal of Biology and Life Science*, 3(1)
- Al-Qudah, K. M. (2011). Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(1), 60-65.
- Altinier, G., Sosa, S., Aquino, R. P., Mencherini, T., Della Loggia, R. y Tubaro, A. (2007). Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(5), 1718-1723.
- Ando, S., Nishida, T., Ishida, M., Hosoda, K. y Bayaru, E. (2003). Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livestock Production Science*, 82(2), 245-248.

- Andrés, S., Tejido, M., Bodas, R., Morán, L., Prieto, N., Blanco, C. y Giráldez, F. (2012). Quercetin dietary supplementation of fattening lambs at 0.2% rate reduces discolouration and microbial growth in meat during refrigerated storage. *Meat Science*, 93(2), 207-212.
- Aréchiga, C., Ortiz, O. y Hansen, P. (1994). Effect of prepartum injection of vitamin E and selenium on postpartum reproductive function of dairy cattle. *Theriogenology*, 41(6), 1251-1258.
- Aréchiga, C., Vázquez-Flores, S., Ortiz, O., Hernandez-Ceron, J., Porras, A., McDowell, L. y Hansen, P. (1998). Effect of injection of  $\beta$ -carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*, 50(1), 65-76.
- Art, T., Kirschvink, N., Smith, N. y Lekeux, P. (1999). Indices of oxidative stress in blood and pulmonary epithelium lining fluid in horses suffering from recurrent airway obstruction. *Equine Veterinary Journal*, 31(5), 397-401.
- Atakisi, O., Oral, H., Atakisi, E., Merhan, O., Metin Pancarci, S., Ozcan, A., Marasli, S., Polat, B., Colak, A. y Kaya, S. (2010). Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk. *Research in Veterinary Science*, 89(1), 10-13.
- Azim, A. M. A. y Farahat, G. S. (2009). Breed differences and phenotypic correlations of antioxidant enzymes activities, some physiological parameters and productive traits of chicken 2: Phenotypic correlations. *Egyptian Poultry Science Journal*, 29(2), 645-666.
- Babji, A., Chin, S., Sen Chempaka, M. y Alina, A. (1998). Quality of mechanically deboned chicken meat frankfurter incorporated with chicken skin. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 49(5), 319-326.

- Badiani, A., Nanni, N., Gatta, P. P., Bitossi, F., Tolomelli, B. y Manfredini, M. (1998). Nutrient content and retention in selected roasted cuts from 3-month-old ram lambs. *Food Chemistry*, 61(1-2), 89-100.
- Bañón, S., Méndez, L. y Almela, E. (2012). Effects of dietary rosemary extract on lamb spoilage under retail display conditions. *Meat Science*, 90(3), 579-583.
- Barton, M. D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*, 13(2), 279-300.
- Benincá, J. P., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G. y Fröde, T. S. (2010). Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. *Food Chemistry*, 124 (2), 468-475.
- Beriain, M. J., Horcada, A., Purroy, A., Lizaso, G., Chasco, J. y Mendizabal, J. A. (2000). Characteristics of Lacha and Rasa Aragonesa lambs slaughtered at three live weights. *Journal of Animal Science*, 78(12), 3070-3077.
- Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N. y Nardone, A. (2005). Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88(6), 2017-2026.
- Berruga, M., Vergara, H. y Gallego, L. (2005). Influence of packaging conditions on microbial and lipid oxidation in lamb meat. *Small Ruminant Research*, 57(2), 257-264.
- Bessa, R. J. B., Portugal, P., Mendes, I. y Santos-Silva, J. (2005). Effect of lipid supplementation on growth performance, carcass and meat quality and fatty acid composition of intramuscular lipids of lambs fed dehydrated lucerne or concentrate. *Livestock Production Science*, 96(2-3), 185-194.

- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enesiki, U. y Kurihara, M. (2009). Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5512-5522.
- Boccard, R. y Bordes, P. (1986). Caracteristiques qualitatives et technologiques des viandes bovines: influence des facteurs de production. Ponencia: *Grenier de Theix*. Ceyrat (France). Journees du 5-7 Jun 1984.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F. y López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176 (1), 78-93
- Boissonneault, G., Hennig, B. y Ouyang, C. (1991). Oxysterols, cholesterol-biosynthesis, and vascular endothelial-cell monolayer barrier function. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 196(3), 338-343.
- Boissonneault, G., Hennig, B., Wang, Y., Ouyang, C., Krahulik, K., Cunnup, L. y Oeltgen, P. (1991). Effect of oxysterol-enriched low-density-lipoprotein on endothelial barrier function in culture - low-density lipoproteins. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 35(4), 226-232.
- Botsoglou, N. A., Christaki, E., Fletouris, D. J., Florou-Paneri, P. y Spais, A. B. (2002). The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Science*, 62(2), 259-265.
- Botsoglou, N. A., Govaris, A., Giannenas, I., Botsoglou, E. y Papageorgiou, G. (2007). The incorporation of dehydrated rosemary leaves in the rations of turkeys and their impact on the oxidative stability of the produced raw and cooked meat. *International Journal of Food Science Nutrition*, 58(4), 312-320.

- Boucher, D., Palin, M. F., Castonguay, F., Gariépy, C. y Pothier, F. (2006). Detection of polymorphisms in the ovine leptin (LEP) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. *Canadian Journal of Animal Science*, 86(1), 31-35.
- Boulanger, V., Bouchard, L., Zhao, X. y Lacasse, P. (2001). Induction of nitric oxide production by bovine mammary epithelial cells and blood leukocytes. *Journal of Dairy Science*, 84(6), 1430-1437.
- Bramley, P. M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F. J., Manios, Y., Roxborough, H. E., Schuch, W; Sheehy, P.J.A. y Wagner, K. (2000). Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 913-938.
- Branen, A. (1975). Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 52(2), 59-63.
- Broom, D. (1983). Stereotypies as animal welfare indicators. En: *Indicators relevant to farma animal welfare*. Smidt, D. (Ed.). Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, (Germany). 23, pp. 81-87.
- Broudman, H., Ball, C. O. y Stier, E. F. (1958). Factors affecting the quality of prepacked meat. 2.E. Determining the proportions of heme derivatives in fresh meat. *Food Technology*, 12(2), 65-77.
- Butterweck, V. y Khan, S. R. (2009). Herbal medicines in the management of urolithiasis: alternative or complementary?. *Planta Médica*, 75(10), 1095-1103
- Buxadé, C. (2009). El sector ovino; realidad y perspectivas. En: *Ovinotecnia: Producción y Economía en la especie ovina*. Sañudo C. y Cepero R. (Eds.). Prensas Universitarias de Zaragoza, Zaragoza, (España). pp. 19-32.

- Calabrese, E. J. (2010). Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. *Human and Experimental Toxicology*, 29(4), 249-261.
- Cannon, J., Morgan, J., Schmidt, G., Tatum, J., Sofos, J., Smith, G., Delmore, R. Williams, S. (1996). Growth and fresh meat quality characteristics of pigs supplemented with vitamin E. *Journal of Animal Science*, 74(1), 98-105.
- Cañeque, V. y Sañudo, C. (2005). *Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa) en los rumiantes*. Madrid: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Ministerio de Educación y Ciencia.
- Carpenter, C. E., Cornforth, D. P. y Whittier, D. (2001). Consumer preferences for beef color and packaging did not affect eating satisfaction. *Meat Science*, 57(4), 359-363.
- Celi, P. (2011). Oxidative stress in ruminants. En: *Studies of veterinary medicine*. Mandelker, L. y Vajdovich, P. (Ed.). Humana Press, Florida (EEUU) pp. 191-231.
- Chen, C., Pearson, A., Gray, J., Fooladi, M. y Ku, P. (1984). Some factors influencing the nonheme iron content of meat and its implications in oxidation. *Journal of Food Science*, 49(2), 581-584.
- Chihuailaf, R. H., Contreras, P. A. y Wittwer, F. G. (2002). Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. *Veterinaria México*, 33(3 (2)), 265-283.
- Chirase, N. K., Greene, L. W., Purdy, C. W., Loan, R. W., Auvermann, B. W., Parker, D. B., Walborg, E. F; Stevenson, D. E.; Xu, Y. y Klaunig, J. E. (2004). Effect of transport stress on respiratory disease, serum antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 65(6), 860-864.



- CIE (1986). *Colorimetry*, (2<sup>nd</sup> Edn). CIE Publ, 15,(2). Commission Internationale de l'eclairage, Viena (Austria).
- Ciria, J., Asenjo, B., Romera, J. A. M. y Calvo, J. L. (2009). Alimentación del cordero: lactancia y cebo. En: *Ovinotecnia: Producción y Economía en la especie ovina*. Sañudo C. y Cepero R. (Eds.). Prensas Univesitarias de Zaragoza, Zaragoza (España), pp. 201-210
- Conchillo, A., Ansorena, D. y Astiasaran, I. (2003). Combined effect of cooking (grilling and roasting) and chilling storage (with and without air) on lipid and cholesterol oxidation in chicken breast. *Journal of Food Protection*, 66(5), 840-846.
- Conchillo, A., Ansorena, D. y Astiasarán, I. (2005). Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 141-146.
- Crozier, A., Lean, M. E. J., McDonald, M. S. y Black, C. (1997). Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 590-595.
- Cuvelier, M. E., Richard, H. y Berset, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 73(5), 645-652.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N. y Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2576-2581.
- Daly, C., Young, O., Graafhuis, A., Moorhead, S. y Easton, H. (1999). Some effects of diet on beef meat and fat attributes. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 42(3), 279-287.

- Davidson, P. y Naidu, A. S. (2000). Phyto-phenols. En: *Natural food antimicrobial systems*. Naidú, A. S. (Ed.). CRC Press, Florida (EEUU). pp. 265-294.
- Davies, K. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9895-9901.
- Davies, M. J. y Dean, R. T. (2003). *Radical-mediated Protein Oxidation*. Oxford: Oxford Science Publications.
- Dean, R., Fu, S., Stocker, R. y Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 324(1), 1-18
- Decker, A. (1997). Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews*, 55(11), 396-398.
- Decker, E. (1998). Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends in Food Science & Technology*, 9(6), 241-248.
- Decker, E. y Xu, Z. (1998). Minimizing rancidity in muscle foods. *Food Technology*, 52(10), 54-59.
- Devore, V. R. (1982). Glutathione peroxidase in post-rigor bovine Semitendinosus muscle. *Journal of Food Science*, 47(5), 1406-1409.
- Diaz, M. T., Sanchez, M., Martinez, B., Vieira, C. y Garcia, M. D. (2005). Valor nutritivo de la carne. Determinación del contenido energético. En: *Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa) en los rumiantes*. Cañete V. y Sañudo C. (Eds.). Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Ministerio de Educación y Ciencia. Madrid (España). pp. 274-281.

- Díaz, M. T., Velasco, S., Cañeque, V., Lauzurica, S., Ruiz de Huidobro, F., Pérez, C., González, J., Manzanares, C. (2002). Use of concentrate or pasture for fattening lambs and its effect on carcass and meat quality. *Small Ruminant Research*, 43(3), 257-268.
- Doreau, M. y Ferlay, A. (1994). Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 45(3), 379-396.
- Dransfield, E., Zamora, F. y Bayle, M. C. (1998). Consumer selection of steaks as influenced by information and price index. *Food Quality and Preference*, 9(5), 321-326.
- Dreosti, I. E. (2000). Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*, 16(7-8), 692-694.
- Dunlop, R. H. y Hammond, P. B. (1965). D-lactic acidosis of ruminants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 119(3), 1109-1132.
- Ekstrand-Hammarström, B., Österlund, C., Lilliehöök, B. y Bucht, A. (2007). Vitamin E down-modulates mitogen-activated protein kinases, nuclear factor- $\kappa$ B and inflammatory responses in lung epithelial cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 147(2), 359-369.
- Elmore, J. S., Cooper, S. L., Enser, M., Mottram, D. S., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G. y Wood, J. D. (2005). Dietary manipulation of fatty acid composition in lamb meat and its effect on the volatile aroma compounds of grilled lamb. *Meat Science*, 69(2), 233-242.
- Elmore, J. S., Mottram, D. S., Enser, M. y Wood, J. D. (1999). Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1619-1625.

- Emanuel, H., Hassel, C., Addis, P., Bergmann, S. Y Zavoral, J. (1991). Plasma-cholesterol oxidation-products (oxysterols) in human-subjects fed a meal rich in oxysterols. *Journal of Food Science*, 56(3), 843-847.
- Enser, M., Hallett, K. G., Hewett, B., Fursey, G. A. J., Wood, J. D. y Harrington, G. (1998). Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Science*, 49(3), 329-341.
- Erf, G., Bottje, W., Bersi, T., Headrick, M. y Fritts, C. (1998). Effects of dietary vitamin E on the immune system in broilers: altered proportions of CD4 T cells in the thymus and spleen. *Poultry Science*, 77(4), 529-537.
- Erickson, M. C. (2008). Lipid Oxidation of Muscle Foods. En: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. Akoh C. C. y Min D. B. (Eds.), CRS Press, Boca Ratón (EEUU). pp. 322-348.
- Erkan, N., Ayranci, G. y Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1), 76-82.
- Eun, J., Boyle, J. y Hearnberger, J. (1994). Lipid-peroxidation and chemical-changes in catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle microsomes during frozen storage. *Journal of Food Science*, 59(2), 251-255.
- FAO. (2010). FAOSTAT. De: Food and Agricultural Organization, Rome, Italy. Recuperado 2010. [www.faostat.fao.org/site/339/default.aspx](http://www.faostat.fao.org/site/339/default.aspx).
- Fernández-López, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Perez-Alvarez, J. y Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69(3), 371-380.

- Finch, J. y Turner, R. (1996). Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Research in Veterinary Science*, 60(2), 97-106.
- Fisher, A., Enser, M., Richardson, R., Wood, J., Nute, G., Kurt, E., Sinclair, L. A. y Wilkinson, R. (2000). Fatty acid composition and eating quality of lamb types derived from four diverse breed x production systems. *Meat Science*, 55(2), 141-147.
- Fornas, E., Martinez-Sales, V., Camanas, A. y Baguena, J. (1984). Intestinal absorption of cholesterol autoxidation products in the rat. *Archivos de Farmacologia y Toxicologia*, 10(3), 175-182.
- Frankel, E. N. (1983) Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research*, 22(1), 1-33.
- Frankel, E. N., Huang, S., Aeschbach, R. y Prior, E. (1996). Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 131-135.
- Fürll, M., Dabbagh, M., Kirbach, H., Nauruschat, C., Sattler, T. y Wilken, H. (2003). The anti-oxidative state before and after a diagnosed abomasal displacement in cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44, 1-2.
- Gatellier, P., Mercier, Y. y Renerre, M. (2004). Effect of diet finishing mode (pasture or mixed diet) on antioxidant status of Charolais bovine meat. *Meat Science*, 67(3), 385-394.
- Genena, A. K., Hense, H., Smania, A. y de Souza, S. M. (2008). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) - a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciencia y Tecnologia De Alimentos*, 28(2), 463-469.

- Gil, M. (2002). Efecto del método de cocinado y de la suplementación de la dieta con vitamina E sobre la calidad de la carne de cerdo durante su almacenamiento en refrigeración. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Givens, D. (2005). The role of animal nutrition in improving the nutritive value of animal-derived foods in relation to chronic disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(03), 395-402.
- Gnanamani, A., Sudha, M., Deepa, G., Sudha, M., Deivanai, K. y Sadulla, S. (2008). Haematological and biochemical effects of polyphenolics in animal models. *Chemosphere*, 72(9), 1321-1326
- Goff, W. L., Carl Johnson, W., Wyatt, C. R. y Cluff, C. W. (1996). Assessment of bovine mononuclear phagocytes and neutrophils for induced L-arginine-dependent nitric oxide production. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 55(1), 45-62.
- Grandin, T. (1997). Assessment of stress during handling and transport. *Journal of Animal Science*, 75(1), 249-257.
- Grau, R. y Hamm, R. (1953). Eine einfache methode zur bestimmung der wasserbindung im muskel. *Naturwissenschaften*, 40(1), 29-30.
- Gray, J. I. y Monahan, F. J. (1992). Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 3, 315-319.
- Gray, J., Gomaa, E. y Buckley, D. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43, 111-123.
- Greathead, H. (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(02), 279-290.

- Greene, B. E., Hsin, I. y Zipser, M. Y. W. (1971). Retardation of oxidative color changes in raw ground beef. *Journal of Food Science*, 36(6), 940-942.
- Griffiths, H. y Lunec, J. (2001). Ascorbic acid in the 21<sup>st</sup> century—more than a simple antioxidant. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10(4), 173-182.
- Grundy, S. M. y Denke, M. A. (1990). Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 31(7), 1149-1172.
- Grundy, S. y Vega, G. (1988). Plasma cholesterol responsiveness to saturated fatty acids. *American Journal of Clinical Nutrition*, 47(5), 822-824.
- Guardiola, F., Codony, R., Addis, P. B., Rafecas, M. y Boatella, J. (1996). Biological effects of oxysterols: Current status. *Food and Chemical Toxicology*, 34(2), 193-211.
- Halliwel, B. y Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715-724.
- Halliwel, B. y Gutteridge, J. M. (1989). *Free radicals in biology and medicine* (2nd ed.). Oxford: Clarendon Press.
- Hamer, M. (2007). The beneficial effects of tea on immune function and inflammation: a review of evidence from in vitro, animal, and human research. *Nutrition Research*, 27(7), 373-379.
- Hammond, J. (1955). Quality meat production. *Journal of the Yorkshire Agricultural Society*.1, 19-32.
- Harrison, J. H., Hancock, D. D. y Conrad, H. (1984). Vitamin E and Selenium for Reproduction of the Dairy Cow. Sup 1. *Journal of Dairy Science*, 67(1), 123-132.
- Hartung, J. (2003). Effects of transport on health of farm animals. *Veterinary Research Communications*, 27, 525-527.

- Hernández, P., Zomeno, L., Ariño, B. y Blasco, A. (2004). Antioxidant, lipolytic and proteolytic enzyme activities in pork meat from different genotypes. *Meat Science*, 66(3), 525-529.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. y Vandeputte, B. (1993). Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(8), 1242-1246.
- Hodis, H. N., Kramsch, D., Avogaro, P., Bittolo-Bon, G., Cazzolato, G., Hwang, J., Peterson, H. y Sevanian, A. (1994). Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-). *Journal of Lipid Research*, 35(4), 669-677.
- Hogue, D., Proctor, J., Warner, R. y Loosli, J. (1962). Relation of selenium, vitamin E and an unidentified factor to muscular dystrophy (stiff-lamb or white-muscle disease) in the lamb. *Journal of Animal Science*, 21(1), 25-29.
- Honikel, K. O. y Hamm, R. (1999). Measurement of water-holding capacity and juiciness. En *Quality Attributes in Meat, Poultry and Fish Products* Pearson A. M. y Dutson T. R. (Eds.). Aspen Publishers, Maryland (EEUU). pp. 125-161.
- Horcada, A., Beriain, M., Purroy, A., Lizaso, G. y Chasco, J. (1998). Effect of sex on meat quality of Spanish lamb breeds (Lacha and Rasa Aragonesa). *Animal Science*, 67, 541-547.
- Hoshi, T. y Heinemann, S. H. (2001). Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *The Journal of Physiology*, 531(1), 1-11.
- Hristov, A., Ivan, M., Neill, L. y McAllister, T. (2003). Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 105(1), 163-184.



- Hsieh, R. J. y Kinsella, J. E. (1989). Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. En: *Advances in Food and Nutrition Research*. Kinsella, J.E (Ed.). Academic Press, San Diego (EEUU). pp. 233-341.
- Huff-Lonergan, E. y Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71(1), 194-204.
- Hughes, B. (1976). Behaviour as an index of welfare. Simposio: *Proceedings of the Fifth European Poultry Conference*, Malta, 1005-1018.
- Hughes, H., Mathews, B., Lenz, M. L. y Guyton, J. R. (1994). Cytotoxicity of oxidized LDL to porcine aortic smooth muscle cells is associated with the oxysterols 7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology / American Heart Association*, 14(7), 1177-1185.
- Hur, S. J., Park, G. B. y Joo, S. T. (2007). Formation of cholesterol oxidation products (COPS) in animal products. *Food Control*, 18(8), 939-947.
- Hwang, K. y Maerker, G. (1993a). Determination of 6-ketocholestanol in unirradiated and irradiated chicken meats. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70(8), 789-792.
- Hwang, K. y Maerker, G. (1993b). Quantitation of cholesterol oxidation-products in unirradiated and irradiated meats. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70(4), 371-375.
- Igene, J., Yamauchi, K., Pearson, A., Gray, J. y Aust, S. (1985). Mechanisms by which nitrite inhibits the development of warmed-over flavour (WOF) in cured meat. *Food Chemistry*, 18(1), 1-18.

- Itoh, Y., Yasui, T., Okada, A., Tozawa, K., Hayashi, Y. y Kohri, K. (2005). Preventive effects of green tea on renal stone formation and the role of oxidative stress in nephrolithiasis. *The Journal of Urology*, 173(1), 271-275.
- Jacobs, J. A., Field, R. A., Botkin, M. P., Riley, M. L. y Roehrkasse, G. P. (1972). Effects of Weight and Castration on Lamb Carcass Composition and Quality. *Journal of Animal Science*, 35(5), 926.
- Jančar, N., Kopitar, A. N., Ihan, A., Klun, I. V. y Bokal, E. V. (2007). Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(2-3), 91-97.
- Jensen, C., Lauridsen, C. y Bertelsen, G. (1998). Dietary vitamin E: quality and storage stability of pork and poultry. *Trends in Food Science & Technology*, 9(2), 62-72.
- Jeremiah, L. (2001). Packaging alternatives to deliver fresh meats using short-or long-term distribution. *Food Research International*, 34(9), 749-772.
- Jordán, M. J., Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S. y Sotomayor, J. A. (2012). Relevance of Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid Concentrations in the in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Rosmarinus officinalis (L.) Methanolic Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(38), 9603-9608.
- Juncher, D., Rønn, B., Beck-Hansen, T., Henckel, P., Karlsson, A., Skibsted, L. H., Bertelsen, G. Effect of pre-slaughter physiological conditions on the oxidative stability of colour and lipid during chill storage of sliced, retail packed roast ham. *Meat Science*, 63(2), 151-159
- Juncher, D., Rønn, B., Mortensen, E. T., Henckel, P., Karlsson, A., Skibsted, L. H., Bertelsen, G. Effect of pre-slaughter physiological conditions on the oxidative

- stability of colour and lipid during chill storage of pork. *Meat Science*, 58(4), 347-357.
- Kaftan, H. A., Clark, P. L., Norberg, M., Garg, U., Thibeault, D. W. y Truog, W. E. (2003). Endogenous production of nitric oxide in endotoxemic piglets. *Biology of the Neonate*, 83(1), 42-48.
- Kahn, L. y Diaz-Hernandez, A. (1999). Tannins with anthelmintic properties. Ponencia presentada en: *ACIAR PROCEEDINGS*, Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, 130-139.
- Kandaswami, C. y Middleton, E. (1994). Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Plant Flavonoids. Ponencia presentada en: *International Symposium on Free Radicals in Diagnostic Medicine: A Systems Approach to Laboratory Technology*, Buffalo, (EEUU), 366 351-376.
- Kanner, J. (1994). Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science*, 36(1-2), 169-189.
- Kanner, J., German, J. B., Kinsella, J. E. y Hultin, H. O. (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 25(4), 317-364.
- Kasapidou, E., Wood, J. D., Richardson, R. I., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G. y Enser, M. (2012). Effect of vitamin E supplementation and diet on fatty acid composition and on meat colour and lipid oxidation of lamb leg steaks displayed in modified atmosphere packs. *Meat Science*, 90(4), 908-916.
- Keane, M. G. y Allen, P. (1999). Effects of pasture fertiliser N level on herbage composition, animal performance and on carcass and meat quality traits. *Livestock Production Science*, 61(2), 233-244.

- Khan, S. R., Glenton, P. A. y Talham, D. R. (2002). Presence of lipids in urine, crystals and stones: implications for the formation of kidney stones. *Kidney International*, 62(6), 2062-2072.
- Kim, Y. H., Huff-Loneragan, E., Sebranek, J. G. y Lonergan, S. M. (2010). High-oxygen modified atmosphere packaging system induces lipid and myoglobin oxidation and protein polymerization. *Meat Science*, 85(4), 759-767.
- Kim, Y. H., Lonergan, S. M. y Huff-Loneragan, E. (2010). Protein denaturing conditions in beef deep semimembranosus muscle results in limited  $\mu$ -calpain activation and protein degradation. *Meat Science*, 86(3), 883-887.
- Kleczkowski, M., Klucinski, W., Shaktur, A. y Sikora, J. (2005). Concentration of ascorbic acid in the blood of cows with subclinical mastitis. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 8(2), 121-125.
- Knowles, G. (1999). A review of the road transport of cattle. *Veterinary Record*, 144(8), 197-201.
- Kolodziejczyk, L., Siemieniuk, E. y Skrzydlewska, E. (2005). Antioxidant potential of rat liver in experimental infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, 96(6), 367-372.
- Kramer, J. y Hoffmann, W. (1997). Clinical enzymology. En: *Clinical biochemistry of domestic animals*, Kaneko, J. J., Harvey, J.W., Bruss, M. L., Academic Press in Elsevier, San Diego, EEUU. pp. 303-325.
- Krinsky, N. I. (2001). Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*, 17(10), 815-817.
- Kris-Etherton, P. M., Krummel, D., Russell, M. E., Dreon, D., Mackey, S., Borchers, J. y Wood, P. D. (1988). The effect of diet on plasma lipids, lipoproteins, and

- coronary heart disease. *Journal of the American Dietetic Association*, 88(11), 1373-1400.
- Kritchevsky, D. (2002). Fats and oils in human health. En: *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, Akoh, C. C. y Min, D. B. (Ed.), CRC press y Taylor & Francis group. Boca Ratón (EEUU) pp. 543-558.
- Labuza, T. P. y Dugan Jr, L. (1971). Kinetics of lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2(3), 355-405.
- Ladikos, D. y Lougovois, V. (1990). Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food Chemistry*, 35(4), 295-314.
- Lawrie, R. A. (1983). Aspects of the biochemistry of meat. *International Journal of Biochemistry*, 15(3), 233-242.
- Lee, S., Mei, L. y Decker, E. (1996). Lipid oxidation in cooked turkey as affected by added antioxidant enzymes. *Journal of Food Science*, 61(4), 726-728.
- Lepetit, J. (2008). Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. *Meat Science*, 80(4), 960-967.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. y Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022-1023.
- Linares, M. B., Berruga, M. I., Bórnez, R. y Vergara, H. (2007). Lipid oxidation in lamb meat: Effect of the weight, handling previous slaughter and modified atmospheres. *Meat Science*, 76(4), 715-720.
- Liu, Q., Lanari, M. C. y Schaefer, D. M. (1995). A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *Journal of Animal Science*, 73(10), 3131-3140.

- Liu, Z., Xiong, Y. L. y Chen, J. (2010). Protein Oxidation Enhances Hydration but Suppresses Water-Holding Capacity in Porcine Longissimus Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10697-10704.
- Londoño Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. En: *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista de Investigación y Ciencia*. Murillo, J.E. (Ed.). Editorial Assistance, Itagúí, (Colombia). pp. 129-163
- López-Bote, Daza, Soares y Berges (2001). Dose-response effect of dietary vitamin E concentration on meat quality characteristics in light-weight lambs. *Animal Science*. 73(3), 451-458.
- Lorenzo, J. L., Allorio, M., Bernini, F., Corsini, A. y Fumagalli, R. (1987). Regulation of low density lipoprotein metabolism by 26-hydroxycholesterol in human fibroblasts. *FEBS letters*, 218(1), 77-80.
- Luby, J., Gray, J., Harte, B. y Ryan, T. (2006). Photooxidation of cholesterol in butter. *Journal of Food Science*, 51(4), 904-907.
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P. y Estevez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(1), 83-95.
- Lund, M. N., Lametsch, R., Hviid, M. S., Jensen, O. N. y Skibsted, L. H. (2007). High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. *Meat Science*, 77(3), 295-303.
- Maca, J., Miller, R., Bigner, M., Lucia, L. y Acuff, G. (1999). Sodium lactate and storage temperature effects on shelf life of vacuum packaged beef top rounds. *Meat Science*, 53(1), 23-29.

- Machiels, D., van Ruth, S. M., Posthumus, M. A. y Istasse, L. (2003). Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial Irish beef meats. *Talanta*, 60(4), 755-764.
- Machlin, L. J. y Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, 1(6), 441-445.
- Maerker, G. y Jones, K. (1993). A-ring oxidation-products from gamma-irradiation of cholesterol in liposomes. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70(3), 255-259.
- Maffei Facino, R., Carini, M., Aldini, G., Ceserani, R., Casciarri, I., Cavalletti, E. y Verderio, L. (1993). Efficacy of glutathione for treatment of fascioliasis. An investigation in the experimentally infested rat. *Arzneimittel-Forschung*, 43(4), 455.
- MAGRAMA. (2012a). Análisis del consumo alimentario. Datos del consumo alimentario en el hogar y fuera del hogar en España 2012. <http://www.magrama.gob.es>,
- MAGRAMA. (2012b). Encuesta de sacrificio de ganado Censo exhaustivo 2011. <http://www.magrama.gob.es>,
- MAGRAMA. (2012c). Resultado de la encuesta nacional de ganado ovino-caprino. Noviembre 2012. <http://www.magrama.gob.es>,
- Mancini, R. y Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71(1), 100-121.
- Martínez, G. N. (2013). Incorporation of by-products of rosemary and thyme in the diet of ewes: effect on the fatty acid profile of lamb. *European Food Research and Technology*, 236(2), 379-389.

- Martínez-Cerezos, S., Olleta, J. L., Sañudo, C., Delfa, R., Cuartielles, I., Pardos, J. J., Medel, I.; Panea, B., Sierra, I. (2002). Calidad de la canal de tres razas ovinas españolas. Efecto del peso al sacrificio. *Actas de las XXVII Jornadas Científicas de la SEOC*, 288-295.
- Martino, M. y Zaritzky, N. (1988). Ice crystal size modifications during frozen beef storage. *Journal of Food Science*, 53(6), 1631-1637.
- Mathers, C. D. y Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, 3(11), e402-e442.
- McClelland, G. (2004). Fat to the fire: the regulation of lipid oxidation with exercise and environmental stress. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 139(3), 443-460.
- McKenna, D. R., Mies, P. D., Baird, B. E., Pfeiffer, K. D., Ellebracht, J. W. y Savell, J. W. (2005). Biochemical and physical factors affecting discoloration characteristics of 19 bovine muscles. *Meat Science*, 70(4), 665-682.
- Mei, L., Crum, A. D. y Decker, E. A. (1994). Development of lipid oxidation and inactivation of antioxidant enzymes in cooked pork and beef. *Journal of Food Lipids*, 1(4), 273-283.
- Melton, B. E., Huffman, W. E., Shogren, J. F. y Fox, J. A. (1996). Consumer preferences for fresh food items with multiple quality attributes: evidence from an experimental auction of pork chops. *American Journal of Agricultural Economics*, 78(4), 916-923.
- Menéndez-Carreño, M.; Ansorena, D.; Milagro, F. I.; Campion, J.; Martinez, J. A.; Astiasaran, I. (2008). Inhibition of serum cholesterol oxidation by dietary vitamin C and selenium intake in high fat fed rats. *Lipids*. 43(4), 383-390.



- Meydani, S. N., Meydani, M., Blumberg, J. B., Leka, L. S., Siber, G., Loszewski, R., Thomson, C., Pedrosa, M. C., Diamond, R. D., Stollar, B. D. (1997). Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 277(17), 1380-1386.
- Meydani, S. N., Meydani, M., Verdon, C. P., Shapiro, A. A., Blumberg, J. B. y Hayes, K. (1986). Vitamin E supplementation suppresses prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis and enhances the immune response of aged mice. *Mechanisms of Ageing and Development*, 34(2), 191-201.
- Meydani, S. N., Wu, D., Santos, M. S. y Hayek, M. G. (1995). Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1462S-1476S.
- Meydani, S. y Hayek, M. (1992). Vitamin E and immune response. Ponencia presentada en: *Proceedings of international conference on nutrition and immunity*. St. John's, Newfoundland: ARTS Biomedical Publishers and Distributors, 105-128.
- Middleton, E., Kandaswami, C. y Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673-751.
- Mobbs, C. (2007). Molecular responses to oxidative stress and acidosis. Molecular responses to oxidative stress and acidosis En: *Encyclopedia of stress*. Finck G. (Ed.). Academic Press. San Diego, (EEUU). pp. 49
- Monahan, F. J., Gray, J. I., Booren, A. M., Miller, E. R., Buckley, D. J., Morrissey, P. A. y Goma, E. A. (1992). Influence of dietary treatment on lipid and cholesterol oxidation in pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(8), 1310-1315.
- Moñino, I., Martínez, C., Sotomayor, J., Lafuente, A. y Jordán, M. (2008). Polyphenolic transmission to Segureño lamb meat from ewes' diet supplemented

- with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3363-3367.
- Moreira, M., Ponce, A., Del Valle, C. y Roura, S. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, 38(5), 565-570.
- Morgan, J. y Armstrong, D. (1992). Quantification of cholesterol oxidation-products in egg-yolk powder spray-dried with direct heating. *Journal of Food Science*, 57(1), 43-43.
- Moriguchi, S., Miwa, H., Okamura, M., Maekawa, K., Kishino, Y. y Maeda, K. (1993). Vitamin E is an important factor in T cell differentiation in thymus of F344 rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 39(5), 451-463.
- Morrissey, P. A. y Kerry, J. P. (2010). Lipid oxidation and the shelf-life of muscle foods. En: *Understanding and measuring the shelf-life of food*. Steele, R. (Ed.) Woodhead Publishing Limited and CRC press LLC, Boca Ratón, (EEUU). pp. 357-395
- Morrissey, P., Sheehy, P., Galvin, K., Kerry, J. y Buckley, D. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, 49, S73-S86.
- Mota-Rojas, D., Becerril, M., Lemus, C., Sánchez, P., González, M., Olmos, S., Ramírez, R. y Alonso-Spilsbury, M. (2006). Effects of mid-summer transport duration on pre-and post-slaughter performance and pork quality in Mexico. *Meat Science*, 73(3), 404-412.
- Munné-Bosch, S., Mueller, M., Schwarz, K. y Alegre, L. (2001). Diterpenes and antioxidative protection in drought-stressed *Salvia officinalis* plants. *Journal of Plant Physiology*, 158(11), 1431-1437.

- Muth, O., Oldfield, J., Remmert, L. y Schubert, J. R. (1958). Effects of selenium and vitamin E on white muscle disease. *Science*, 128 (3331), 1090.
- Naresh, R., Dwivedi, S., Swarup, D. y Patra, R. (2002). Evaluation of ascorbic acid treatment in clinical and subclinical mastitis of Indian dairy cows. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(6), 905-911.
- Naumann, H. D. (1965). Evaluation and measurement of meat quality. En: *Food quality: Effects of production practices and processing*. Irving G.W. y Hoover S. R. (Eds). American Association for the Advancement of Science, (77) Washington (EEUU).
- Nawar, W. W. (1996). Lipids En: *Food Chemistry* (3rd edn.). Fennema O. R. (Ed.), Marcel Dekker, New York, (EEUU) pp. 139-224.
- Neale, R. J. (1992). Meat iron availability: chemical and nutritional considerations En: *The chemistry of muscle-based foods*. Jhonston D. E., Knight M. K. y Leward D. A. (Eds.). Royal Society of Chemistry Cambridge (UK). pp. 183-192.
- Neish, A. (1964). Major pathways of biosynthesis of phenols. En: *Biochemistry of Phenolic Compounds*. Academic Press, New York, 295-359.
- Neville, G. G. (1999) *Animal Welfare and Meat Science*. New York: Oxford University Press.
- Nieto, G., Bañón, S. y Garrido, M. D. (2011). Effect of supplementing ewes' diet with thyme (*Thymus zygis* ssp. *gracilis*) leaves on the lipid oxidation of cooked lamb meat. *Food Chemistry*, 125(4), 1147-1152.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S. y Garrido, M. D. (2010). Effect on lamb meat quality of including thyme (*Thymus zygis* ssp. *gracilis*) leaves in ewes' diet. *Meat Science*, 85(1), 82-88.

- Nieto, G., Estrada, M., Díaz, P., Bañón, S. y Garrido, M. D. (2008). Prevention of lipid oxidation of cooked lamb meat through feeding with by-products of *Rosmarinus officinalis*. Ponencia presentada en: *International Congress of meat science and technology (ICoMST)*. 7B.13.
- Nieto, G., Estrada, M., Jordán, M. J., Garrido, M. D. y Bañón, S. (2011). Effects in ewe diet of rosemary by-product on lipid oxidation and the eating quality of cooked lamb under retail display conditions. *Food Chemistry*, 124(4), 1423-1429.
- Nocek, J. E. (1997). Bovine acidosis: Implications on laminitis. *Journal of Dairy Science*, 80(5), 1005-1028.
- Nockels, C., Odde, K. y Craig, A. (1996). Vitamin E supplementation and stress affect tissue alpha-tocopherol content of beef heifers. *Journal of Animal Science*, 74(3), 672-677.
- Nourooz-Zadeh, J. y Appelqvist, L. Å. (1989). Cholesterol oxides in Swedish food and food ingredients: Lard and bacon. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66(4), 586-592.
- Nürnberg, K., Wegner, J. y Ender, K. (1998). Factors influencing fat composition in muscle and adipose tissue of farm animals. *Livestock Production Science*, 56(2), 145-156.
- Nwe, T., Hori, E., Manda, M. y Watanabe, S. (1996). Significance of catecholamines and cortisol levels in blood during transportation stress in goats. *Small Ruminant Research*, 20(2), 129-135.
- O'Grady, M. N., Maher, M., Troy, D. J., Moloney, A. P. y Kerry, J. P. (2006). An assessment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Science*, 73(1), 132-143.

- Oluwatuyi, M., Kaatz, G. W. y Gibbons, S. (2004). Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, 65(24), 3249-3254.
- O'Neill, D., Lynch, P., Troy, D., Buckley, D. y Kerry, J. (2003). Effects of PSE on the quality of cooked hams. *Meat Science*, 64(2), 113-118.
- Orhan, D. D., Özçelik, B., Özgen, S. y Ergun, F. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*, 165(6), 496–504.
- Osawa, T. (1994). Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. *Post harvest biochemistry of plant food-materials in the tropics*. Japan Scientific Societies Press, Japan, 241-251.
- Osorio, M. T., Zumalacárregui, J. M., Cabeza, E. A., Figueira, A. y Mateo, J. (2008). Effect of rearing system on some meat quality traits and volatile compounds of suckling lamb meat. *Small Ruminant Research*, 78(1), 1-12.
- Osoro, K., Celaya, R., Moreno-Gonzalo, J., Ferreira, L. M. M., Garcia, U., Frutos, P., Ortega-Mora, L. M., Ferre, I. (2009). Effects of Stocking Rate and Heather Supplementation on Gastrointestinal Nematode Infections and Host Performance in Naturally-Infected Cashmere Goats. *Rangeland Ecology & Management*, 62(2), 127-135.
- Osoro, K., Mateos-Sanz, A., Frutos, P., García, U., Ortega-Mora, L. M., Ferreira, L. M., Celaya, R., Ferre, I. (2007). Anthelmintic and nutritional effects of heather supplementation on Cashmere goats grazing perennial ryegrass-white clover pastures. *Journal of Animal Science*, 85(3), 861-870.
- Owens, F., Secrist, D., Hill, W. y Gill, D. (1998). Acidosis in cattle: a review. *Journal of animal science*, 76(1), 275-286.

- Packer, L. y Fuchs, J. (1993). *Vitamin E in health and disease*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Paniangvait, P., King, A., Jones, A. y German, B. (1995). Cholesterol oxides in foods of animal origin. *Journal of Food Science*, 60(6), 1159-1174.
- Papas, A. (1999). Diet and antioxidant status. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9), 999-1007.
- Park, S. W. y Addis, P. B. (1985). Capillary column gas-liquid chromatographic resolution of oxidized cholesterol derivatives. *Analytical Biochemistry*, 149(1), 275-283.
- Park, S. W. y Addis, P. B. (1986). Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(4), 653-659.
- Park, S. W. y Addis, P. B. (1987). Cholesterol Oxidation-Products in some Muscle Foods. *Journal of Food Science*, 52(6), 1500-1503.
- Peng, S. K., Hu, B., Peng, A. Y. y Morin, R. J. (1993). Effect of cholesterol oxides on prostacyclin production and platelet adhesion. *Artery*, 20(3), 122-134.
- Peng, S., Taylor, C., Hill, J. y Morin, R. (1985). Cholesterol oxidation derivatives and arterial endothelial damage. *Atherosclerosis*, 54(2), 121-133.
- Peng, Y., Yuan, J., Liu, F. y Ye, J. (2005). Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39(3), 431-437.

- Pérez, P., Maino, M., Tomic, G., Mardones, E. y Pokniak, J. (2002). Carcass characteristics and meat quality of Suffolk Down suckling lambs. *Small Ruminant Research*, 44(3), 233-240.
- Peter, J. B., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A. y Stempel, K. E. (1972). Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, 11(14), 2627-2633.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M.; Cerri, R., Casanova, J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(1), 15-19.
- Pregel, P., Bollo, E., Cannizzo, F., Biolatti, B. y Contato, E. (2005). Antioxidant capacity as a reliable marker of stress in dairy calves transported by road. *Veterinary Record*, 156(2), 53-54.
- Prieto, N. (2006). Aplicación de la tecnología NIRS para estimar parámetros indicativos de la calidad de la carne de vacuno. Tesis de doctorado Universidad de León.
- Raccach, M. (1984). The antimicrobial activity of phenolic antioxidants in foods: A review 1. *Journal of Food Safety*, 6(3), 141-170.
- Ramasamy, S., Boissonneault, G. y Hennig, B. (1992). Oxysterol-induced endothelial-cell dysfunction in culture. *Journal of the American College of Nutrition*, 11(5), 532-538.
- Ranjan, R., Swarup, D., Naresh, R. y Patra, R. (2005). Enhanced erythrocytic lipid peroxides and reduced plasma ascorbic acid, and alteration in blood trace elements level in dairy cows with mastitis. *Veterinary Research Communications*, 29(1), 27-34.

- Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1), 3-12
- Renerre, M. T. (1990). Factors involved in the discoloration of beef meat. *International Journal of Food Science & Technology*, 25(6), 613-630.
- Renerre, M., Dumont, F. y Gatellier, P. (1996). Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. *Meat Science*, 43(2), 111-121.
- Renerre, M., Poncet, K., Mercier, Y., Gatellier, P. y Métro, B. (1999). Influence of dietary fat and vitamin E on antioxidant status of muscles of turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 237-244.
- Rietjens, I. M., Boersma, M. G., Haan, L. d., Spenkelink, B., Awad, H. M., Cnubben, N. H., van Zandena, van der Woude, H., Gerrit, M. A. y Koemana, J. H. (2002) The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11(3), 321-333
- Ripoll, G., Joy, M. y Muñoz, F. (2011). Use of dietary vitamin E and selenium (Se) to increase the shelf life of modified atmosphere packaged light lamb meat. *Meat Science*, 87(1), 88-93.
- Rodríguez, A. B. (2005). Alternativas a los sistemas actuales de alimentación en el cebo intensivo de corderos: Efecto de la supresión de la paja de la ración y la utilización del cereal en grano sobre la ingestión, el crecimiento y las características de la canal y de la carne. Tesis de Doctorado Universidad de León.
- Rojas, W. y Cano, L. (2001). Inmunología (12 edn.) Medellín: CIB (Corporacion para Investigaciones Biológicas).



- Ross, R. (1986). The Pathogenesis of Atherosclerosis — An Update. *The New England Journal of Medicine*, 314(8), 488-500.
- Rowe, L. J., Maddock, K., Lonergan, S. y Huff-Lonergan, E. (2004). Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of  $\mu$ -calpain. *Journal of Animal Science*, 82(11), 3254-3266.
- Samman, S., Sandstrom, B., Toft, M. B., Bukhave, K., Jensen, M., Sorensen, S. S. y Hansen, M. (2001). Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(3), 607.
- Sanchez, A. y Alfonso, M. (1998). Small ruminant production systems and factors affecting lamb meat quality. *Meat Science*, 49, S29-S64.
- Sañudo, C., Enser, M. E., Campo, M. M., Nute, G. R., María, G., Sierra, I. y Wood, J. D. (2000). Fatty acid composition and sensory characteristics of lamb carcasses from Britain and Spain. *Meat Science*, 54(4), 339-346.
- Sañudo, C., Santolaria, M., María, G., Osorio, M. y Sierra, I. (1996). Influence of carcass weight on instrumental and sensory lamb meat quality in intensive production systems. *Meat Science*, 42(2), 195-202.
- Sañudo, C., Sierra, I., Olleta, J., Martin, L., Campo, M., Santolaria, P., Wood, J. D., Nute, G. (1998). Influence of weaning on carcass quality, fatty acid composition and meat quality in intensive lamb production systems. *Animal Science*, 66, 175-187.
- Scaletti, R., Trammell, D., Smith, B. y Harmon, R. (2003). Role of Dietary Copper in Enhancing Resistance to *Escherichia coli* Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1240-1249.

- Sconberg, S., Nockels, C. F., Bennett, B. W., Bruyninckx, W., Blancquaert, A. M. y Craig, A. M. (1993). Effects of shipping, handling, adrenocorticotrophic hormone, and epinephrine on alpha-tocopherol content of bovine blood. *American Journal of Veterinary Research*, 54(8), 1287-1293.
- Selye, H. (1936). The alarm reaction. *Can.Med.Assoc.J*, 34, 706-718
- Sen, A. R., Santra, A. y Karim, S. A. (2004). Carcass yield, composition and meat quality attributes of sheep and goat under semiarid conditions. *Meat Science*, 66(4), 757-763.
- Shahidi, F. y Pegg, R. B. (1994). Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. *Journal of Food Lipids*, 1(3), 177-186.
- Sharma, R. K. y Agarwal, A. (2004). Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. *Reproductive Medicine and Biology*, 3(4), 177-199.
- Sheldon, B. (1984). Effect of dietary tocopherol on the oxidative stability of turkey meat. *Poultry Science*, 63(4), 673-681.
- Shousha, S., Khalil, S. S. y Rashwan, E. A. (1999). Oxygen free radical and nitric oxide production in single or combined human schistosomiasis and fascioliasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 29(1)
- Sies, H. (1985). *Oxidative stress*. Orlando: Academic Press Inc.
- Sies, H. (2005). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215(2), 213-219.
- Sivakumar, A., Singh, G. y Varshney, V. (2010). Antioxidants supplementation on acid base balance during heat stress in goats. *Asian-Australas Journal of Animal Science*, 23, 1462-1468.

- Slyter, L. L. (1976). Influence of acidosis on rumen function. *Journal of Animal Science*, 43(4), 910-929.
- Smet, K., Raes, K., Huyghebaert, G., Haak, L., Arnouts, S. y De Smet, S. (2008). Lipid and protein oxidation of broiler meat as influenced by dietary natural antioxidant supplementation. *Poultry Science*, 87(8), 1682-1688.
- Smith, K. L., Harrison, J., Hancock, D., Todhunter, D. y Conrad, H. (1984). Effect of Vitamin E and Selenium Supplementation on Incidence of Clinical Mastitis and Duration of Clinical Symptoms 1, 2. *Journal of Dairy Science*, 67(6), 1293-1300.
- Smith, L. L. (1987). Cholesterol autoxidation 1981-1986. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44(2-4), 87-125.
- Smith, L. L. y Johnson, B. H. (1989). Biological activities of oxysterols. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(3), 285-332.
- Spiteller, G. (2001). Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Experimental Gerontology*, 36(9), 1425.
- Steele, R. (2004). *Understanding and measuring the shelf-life of food*. Cambridge: Woodhead Publishing, Limited.
- Swatland, H. J. (1991). *Estructura y desarrollo de los animales de abasto*. Zaragoza: Acribia.
- Szczesniak, A. S. (1963). Classification of Textural Characteristics. *Journal of Food Science*, 29(4), 385-389.
- Tanabe, H., Yoshida, M. y Tomita, N. (2002). Comparison of the antioxidant activities of 22 commonly used culinary herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat. *Animal Science Journal*, 73(5), 389-393.

- Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M. y El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104(4), 1372-1378.
- Taylor, C. B. y Peng, S. K. (1985). Cytotoxicity and atherogenicity of oxidized cholesterol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62, 633.
- Taylor, C., Peng, S., Werthessen, N., Tham, P. y Lee, K. (1979). Spontaneously occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 32(1), 40-57.
- Terlouw, C. (2005). Stress reactions at slaughter and meat quality in pigs: genetic background and prior experience: A brief review of recent findings. *Livestock Production Science*, 94(1), 125-135.
- Tims, M. J. y Watts, B. M. (1958). Protection of cooked meats with phosphates. *Food Technology*, 12, 240-243.
- Tizard, I. (1992). *Veterinary immunology. An introduction* (8th Ed.). St Louis: WB Saunders Co.
- Tornberg, E. (1996). Biophysical aspects of meat tenderness. *Meat Science*, 43, 175-191.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- Tuluce, Y. y Celik, I. (2006). Influence of subacute and subchronic treatment of abscisic acid and gibberellic acid on serum marker enzymes and erythrocyte and tissue antioxidant defense systems and lipid peroxidation in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86(2), 85-92.

- Turk, R., Piras, C., Kovačić, M., Samardžija, M., Ahmed, H., De Canio, M., Urbani, A., Meštrić, Z. F., Soggiu, A., Bonizzi, L. (2012). Proteomics of inflammatory and oxidative stress response in cows with subclinical and clinical mastitis. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4412–4428.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. y Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027-1131.
- Urquiaga, I. y Leighton, F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological research*, 33(2), 55-64.
- Ursini, F., Maiorino, M., Morazzoni, P., Roveri, A. y Pifferi, G. (1994). A Novel Antioxidant Flavonoid (Idb-1031) Affecting Molecular Mechanisms of Cellular Activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(5), 547-553.
- Valenzuela B, A. y Nieto K, S. (1996). Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*, 47(3), 186-196.
- Vasta, V., M. Mele, A. Serra, M. Scerra, G., Luciano, M. Lanza y A. Priolo. 2009. Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed concentrate or herbage with or without tannins. *Journal of Animal Science*, 87, 2674-2684
- Vasta, V. y Priolo, A. (2006). Ruminant fat volatiles as affected by diet. A review. *Meat Science*, 73(2), 218-228.
- Vejux, A. y Lizard, G. (2009). Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and

- inflammatory activities, and phospholipidosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(3), 153-170.
- Vergara, H. y Gallego, L. (2001). Effects of gas composition in modified atmosphere packaging on the meat quality of Spanish Manchega lamb. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(14), 1353-1357.
- Vergara, H., Molina, A. y Gallego, L. (1999). Influence of sex and slaughter weight on carcass and meat quality in light and medium weight lambs produced in intensive systems. *Meat Science*, 52(2), 221-226.
- Viant, D., Fonseca, C., Rodríguez, R. y Anglada, P. (1998). Óxido nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *Medisan*, 2(3), 45-53.
- Wallace, R. J., McEwan, N. R., McIntosh, F. M., Teferedegne, B. y Newbold, C. J. (2002). Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(10), 1458-1468.
- Wanapat, M., Cherdthong, A., Pakdee, P. y Wanapat, S. (2008). Manipulation of rumen ecology by dietary lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) powder supplementation. *Journal of animal science*, 86(12), 3497-3503.
- Wang, F. S., Jiang, Y. N. y Lin, C. W. (1995). Lipid and cholesterol oxidation in Chinese-style sausage using vacuum and modified atmosphere packaging. *Meat Science*, 40(1), 93-101.
- Wang, X. y Quinn, P. J. (1999). Vitamin E and its function in membranes. *Progress in lipid research*, 38(4), 309-336.
- Wang, X. y Quinn, P. J. (2000). The location and function of vitamin E in membranes (Review). *Molecular Membrane Biology*, 17(3), 143-156.

- Warriss, P. D. (2000). *Meat Science: An Introductory Text* (2nd ed.). Wallingford: CABI Publishers.
- Weir, C. E. (1960). *The science of meat and meat products* (2nd edn.). Oxfordshire. CABI Publishing.
- Weiss, W., Hogan, J. y Smith, K. (2004). Changes in vitamin c concentrations in plasma and milk from dairy cows after an intramammary infusion of *Escherichia coli*. *Journal of dairy science*, 87(1), 32-37.
- Wernicki, A., Urban-Chmiel, R., Kankofer, M., Mikucki, P., Puchalski, A. y Tokarzewski, S. (2006). Evaluation of plasma cortisol and TBARS levels in calves after short-term transportation. *Revue de médecine vétérinaire*, 157(1), 30-34.
- West, R. (1974). Red to white fiber ratios as an index of double muscling in beef cattle. *Journal of animal science*, 38(5), 1165-1175.
- Wolff, S. P. y Dean, R. T. (1986). Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem. J.*, 234, 399-403.
- Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., Huges, S. I., Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78(4), 343-358.
- Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E., Sheard, P. R. y Enser, M. (2004). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, 66(1), 21-32.
- Wood, J. y Enser, M. (1997). Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *British Journal of Nutrition*, 78(1), 49.

- Xiong, Y. L., Decker, E., Faustman, C. y Lopez-Bote, C. (2000). Protein oxidation and implications for muscle food quality. En: *Antioxidants in muscle foods: nutritional strategies to improve quality*, Willey Interscience, Danvers, (EEUU). pp. 85-111.
- Yadav, R. D., Jain, S., Alok, S., Mahor, A., Bharti, J. P. y Jaiswal, M. (2011). Herbal plants used in the treatment of urolithiasis: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(6), 1412-1420.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139-162.
- Zheng, K., Adjei, A. A., Shinjo, M., Shinjo, S., Todoriki, H. y Ariizumi, M. (1999). Effect of dietary vitamin E supplementation on murine nasal allergy. *The American Journal of the Medical Sciences*, 318(1), 49.
- Ziaee, A., Zamansoltani, F., Nassiri-Asl, M. y Abbasi, E. (2009). Effects of Rutin on Lipid Profile in Hypercholesterolaemic Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 104(3), 253-258.



