



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Incorporación de Conservantes Naturales en los
Piensos para Peces: Optimización de la Calidad y
Vida útil de la Dorada.

D. Ángel Hernández Contreras

2014



Universidad de Murcia
Facultad de Biología



Instituto Murciano de Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario
Departamento de Producción Animal
Equipo de Acuicultura Marina

Incorporación de conservantes naturales en los piensos para peces: Optimización de la calidad y vida útil de la dorada.

Memoria de Tesis presentada por Angel Hernández Contreras para
optar al grado de Doctor

Dirigida por M^a Dolores Hernández Llorente y Benjamín García
García

Murcia, 2014



Instituto Murciano de
Investigación y Desarrollo
Agrario y Alimentario
Equipo de Acuicultura Marina



Región de Murcia
Consejería de Agricultura
y Agua

D^a. M^a Dolores Hernández Llorente y D. Benjamín García García, Doctores Investigadores del Equipo de Acuicultura del Departamento de Producción Animal del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA),

AUTORIZAN:

La presentación, en modalidad de compendio de publicaciones, de la Tesis Doctoral titulada "Incorporación de conservantes naturales en los piensos para peces: Optimización de la calidad y vida útil de la dorada.", realizada por D. Ángel Hernández Contreras en el Equipo de Acuicultura del Departamento de Producción Animal del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 16 de Junio de 2014

Dra. M^a Dolores Hernández Llorente

Dr. Benjamín García García

De acuerdo al reglamento que regula el procedimiento para la lectura de la Tesis Doctoral en la Universidad de Murcia, se presenta la Tesis Doctoral titulada “Incorporación de conservantes naturales en los piensos para peces: Optimización de la calidad y vida útil de la dorada.” en la modalidad de compendio de publicaciones, de trabajos previamente publicados, una vez ha sido autorizada su presentación por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia.

Las referencias completas de los artículos publicados, indexados en SCI, y que constituyen el cuerpo de la Tesis son las siguientes:

A. Hernández, B. García García, M. J. Jordán, M. D. Hernández (2014). Natural antioxidants in extruded fish feed: Protection at different storage temperatures. *Animal Feed Science and Technology*. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2014.06.003

Índice de impacto: 1.608
Posición JCR (2012): 10 de 54 (Q1)

A. Hernández, B. García García, M.J. Jordán, M.D. Hernández, (2014). Improved conservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in ice storage. The influence of doses of rosemary extract added to feed. *Aquaculture*, 426, 31-40.

Índice de impacto: 2.009
Posición JCR (2012): 11 de 50 (Q1)

A. Hernández, B. García García, M.J. Jordán, M.D. Hernández (2014). Study of the dose of thyme essential oil in feed to prolong the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition*. DOI: 10.1111/anu.12196

Índice de impacto: 1.688
Posición JCR (2012): 18 de 50 (Q2)

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada gracias a una beca pre-doctoral del subprograma de Formación de Personal Investigador (FPI-INIA) del Ministerio de Economía y Competitividad y del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), a través del proyecto “Mejora en la calidad y vida útil de dorada (*Sparus aurata*) mediante la inclusión en la dieta de conservantes procedentes de plantas aromático-medicinales” (RTA2009-00145).

A todos aquellos que me han
acompañado en mi tesis doctoral,
a mis directores Lola y Benjamín,
a mis compañeros,
a mi familia,
a mis amigos

RESUMEN

La producción de dorada ha experimentado una fuerte caída en los últimos años por la pérdida de rentabilidad. Entre otros factores, en ello ha influido el escaso margen de beneficio y el tipo de producto ofrecido al consumidor, de bajo coste y poco diferenciado. Las necesidades futuras de la acuicultura y en concreto de la producción de dorada pasan por una diversificación del producto y una mejora de la calidad que permitan aumentar el margen de beneficio. Para esto pueden ser de gran utilidad los conservantes naturales añadidos al pienso, pues pueden proporcionar beneficios nutritivos y de apariencia sensorial al pescado fresco y en almacenamiento. Además, en las últimas décadas se han demostrado efectos en distintos aspectos de la salud de los peces que afectan al bienestar de los mismos. Los aspectos anteriores, junto con la total eliminación de conservantes sintéticos del pienso, pueden acercar la acuicultura marina hacia una producción más orgánica y ecológica, que además se traduciría en un incremento del valor económico del producto.

La adición de conservantes naturales al pienso demostró ser una buena alternativa a los conservantes sintéticos para protegerlo frente a la oxidación lipídica. La actividad antioxidante del romero fue similar a la del butil-hidroxitolueno durante el procesado del pienso y durante su almacenamiento a temperatura ambiente y en refrigeración. Los aceites esenciales de tomillo (quimiotipo timol y quimiotipo carvacrol), aunque tienen una demostrada actividad antioxidante, no fueron capaces de equiparar al butil-hidroxitolueno durante el secado del pienso e incluso el timol mostró cierta actividad prooxidante. Durante el periodo de almacén los piensos se mantuvieron sin grandes cambios en cuanto a oxidación lipídica, validando estas condiciones de almacén durante el tiempo que suelen permanecer en la empresa de acuicultura.

El uso de sustancias antioxidantes como aditivo del pienso para mejorar la calidad del pescado ha sido ampliamente estudiado, enfocado principalmente a la vitamina E y la vitamina A. El objetivo de su utilización es tanto la mejora de la calidad nutritiva del producto como de su estabilidad durante el almacén. El uso de conservantes naturales provenientes de plantas aromáticas en el pienso mejora propiedades sensoriales como el olor, el color de las agallas y el índice de calidad. Los parámetros fisicoquímicos utilizados no muestran diferencias, únicamente la oxidación lipídica es inferior en peces alimentados con dietas suplementadas con extracto de romero.

Los alimentos de origen marino son muy susceptibles al deterioro provocado por la actividad microbiana y los procesos autolíticos. Esto es debido, fundamentalmente, a su alto contenido en aminoácidos libres, lípidos insaturados, compuestos nitrogenados no proteicos, enzimas autolíticas, etc., y a la abundancia de bacterias psicrófilas y psicotrofas en su flora bacteriana. La efectividad de la aplicación exógena de aceites esenciales y extractos de plantas aromáticas ha sido estudiada en pescado combinándolo con distintas técnicas de almacén pero la bibliografía acerca de su aplicación en el pienso es escasa. Los productos estudiados en la presente Tesis Doctoral, aceite esencial de tomillo –quimiotipo timol- y extracto de romero- 1:1(ac.carnósico:carosol) añadidos al pienso han demostrado un efecto beneficioso sobre la conservación del pescado. Ambos tienen un efecto dosis dependiente sobre parámetros fisicoquímicos del deterioro, siendo proporcional a la dosis en caso del tomillo y con una dosis óptima de 600 mg/kg en el caso del romero. Los mejores valores del índice de calidad al final del periodo de almacén se observaron con la dosis de 1000 mg/kg de aceite esencial de tomillo o con 600 mg/kg de extracto de romero. En ambos casos se tradujo en un incremento de la vida útil en un día con cualquier dosis.

Los aceites esenciales y extractos de plantas aromáticas también ejercen ciertos efectos en la fisiología de los peces modulando, entre otros aspectos, el metabolismo lipídico y la respuesta inmune. Esto tiene implicaciones en el bienestar animal, el cual está ganado importancia en la acuicultura marina. El extracto de romero fue capaz de mejorar el metabolismo, reduciendo la esteatosis hepática de los peces que se suele producir durante la alimentación con dietas de alta energía y mejorando parámetros de bioquímica sanguínea. La dosis óptima entre las estudiadas fue la de 600 mg/kg. El aceite esencial de tomillo produjo un aumento de la estimulación del sistema inmune asociado al intestino de dorada a la dosis de 1000 mg/kg y una reducción aparente de la inflamación a dosis altas. En ambos casos se observó una respuesta bifásica, algo común en fitoquímicos añadidos a la dieta.

Palabras clave: dorada, *Sparus aurata*, almacenamiento en hielo, vida útil, calidad, antioxidantes naturales, fitoquímicos, aceite esencial de tomillo, extracto de romero, pienso para peces, metabolismo lipídico, inflamación.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Situación actual de la acuicultura	3
1.1.1. La acuicultura en el mundo.....	6
1.1.2. La piscicultura en España.....	6
1.2. Calidad nutricional del pescado	10
1.2.1. Composición del pescado.....	10
1.2.1.1. <i>Agua</i>	11
1.2.1.2. <i>Proteínas</i>	11
1.2.1.3. <i>Lípidos</i>	12
1.2.1.4. <i>Componentes nitrogenados no proteicos</i>	13
1.2.1.5. <i>Minerales</i>	14
1.2.1.6. <i>Vitaminas</i>	14
1.2.1.7. <i>Contaminantes</i>	15
1.2.2. Efectos beneficiosos de los PUFA en la salud humana.....	15
1.2.3. Promoción del consumo de pescado: ventajas de la acuicultura.....	17
1.3. Procesos de deterioro del pescado	18
1.3.1. Cambios autolíticos.....	19
1.3.1.1. <i>Carbohidratos</i>	19
1.3.1.2. <i>Nucleótidos</i>	19
1.3.1.3. <i>Proteínas</i>	20
1.3.1.4. <i>Lípidos</i>	21
1.3.2. Cambios microbiológicos.....	22
1.3.3. Susceptibilidad a la oxidación.....	23
1.3.4. Métodos de evaluación de la calidad del pescado.....	24
1.3.4.1. <i>Métodos físicos</i>	24
1.3.4.2. <i>Métodos químicos</i>	26
1.3.4.3. <i>Métodos microbiológicos</i>	28
1.3.4.4. <i>Métodos sensoriales</i>	29
1.3.4.4.1. <i>Evaluación en pescado fresco</i>	29
1.3.4.4.2. <i>Evaluación en pescado cocinado</i>	30
1.4. Las plantas aromático-medicinales	31
1.4.1. Usos históricos.....	31
1.4.2. Principios activos y principales utilidades.....	32
1.4.3. Plantas aromático-medicinales en la Región de Murcia.....	33

1.4.3.1. <i>Romero</i>	34
1.4.3.2. <i>Tomillo</i>	37
1.4.3.2.1. <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>gracilis</i>	39
1.4.3.2.1. <i>Thymbra capitata</i>	40
1.5. Propiedades y aplicaciones en la industria agroalimentaria	41
1.5.1. Propiedades intrínsecas.....	41
1.5.1.1. <i>Actividad antioxidante</i>	41
1.5.1.2. <i>Actividad antimicrobiana</i>	43
1.5.2. Aplicaciones como conservante alimenticio mediante aplicación exógena.....	44
1.5.2.1. <i>Romero</i>	45
1.5.2.2. <i>Tomillo</i>	47
1.5.3. Aplicaciones como conservante alimenticio mediante aplicación endógena.....	49
1.5.3.1. <i>Romero</i>	49
1.5.3.2. <i>Tomillo</i>	51
1.5.4. Efectos sobre la fisiología del animal.....	52
2. Resumen global	55
2.1. Justificación y Objetivos	57
2.2. Plan experimental	63
2.3. Discusión	71
2.3.1. Efectividad de conservantes naturales incorporados al pienso para peces en la protección frente a la oxidación lipídica durante la elaboración y el almacén del mismo.....	73
2.3.2. Efecto de la dosis de conservantes naturales sobre la calidad final de la dorada.....	77
2.3.3. Evolución del deterioro durante el almacenamiento en hielo de doradas alimentadas con dietas con distintas dosis de conservantes naturales....	79
2.3.4. Influencia de la adición de extracto de romero en la dieta sobre el metabolismo lipídico de la dorada.....	86
2.3.5. Efecto de la adición de aceite esencial de tomillo sobre la funcionalidad del intestino de dorada.....	90
2.4. Conclusiones	93
3. Publicaciones	97
Publicación I: Hernández, A., García, B. G., Jordán, M. J., & Hernández, M. D. (2014). Natural antioxidants in extruded fish feed: Protection at different storage temperatures. <i>Animal Feed Science and Technology</i> (In press).....	99

Publicación II: Hernández, A., García García, B., Jordán, M. J., & Hernández, M. D. (2014). Improved conservation of gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>) in ice storage. The influence of doses of rosemary extract added to feed. <i>Aquaculture</i> , 426, 31-40.....	109
Publicación III: A. Hernández, B. García García, M.J. Jordán, & M.D. Hernández (2014). Study of the dose of thyme essential oil in feed to prolong the shelf life of gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>). <i>Aquaculture Nutrition</i> . (In press).....	121
4. Referencias bibliográficas	135
Anexo I: Influencia del extracto de romero sobre el metabolismo lipídico de la dorada (publicación prevista).....	167
Anexo II: Influencia del aceite esencial de tomillo como aditivo en pienso sobre la funcionalidad del intestino de la dorada (publicación prevista).....	195
Anexo III: Comunicaciones a congresos.....	231
Influencia de la inclusión de aceites vegetales en la dieta sobre el rendimiento en el engorde de la dorada (<i>Sparus aurata</i>). A. Hernández, B. García-García, R. Fontanillas, M.D. Hernández. Congreso Nacional de Acuicultura. Barcelona. España, 2011.....	233
Antioxidantes provenientes de plantas aromáticas en pienso para peces marinos, efecto sobre la oxidación lipídica. A. Hernández, B. García-García, M.J. Jordán, C. Martínez-Conesa, M.D. Hernández. Congreso Nacional de Acuicultura. Barcelona. España, 2011.....	235
Efecto de la sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales en la dieta de la dorada (<i>Sparus aurata</i>) sobre marcadores del estrés oxidativo. V. Cánovas-Hernández, A. Lucas-Sánchez, PF. Almada-Pagán, R. Fontanillas, A. Hernández, MD. Hernández, J. de Costa, P. Mendiola. Congreso Nacional de Acuicultura. Barcelona. España, 2011.....	237
Aceite esencial de tomillo como inmuno-estimulante en dorada (<i>Sparus aurata</i>): Histología intestinal. A. Hernández, B. García García, M.J. Caballero, S. Torrecillas, M.D. Hernández. Congreso Nacional de Acuicultura. Gijón. España, 2013.....	239
Mejora de la conservación de la dorada (<i>Sparus aurata</i>) almacenada en hielo. Influencia de la dosis de extracto de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) incorporada al pienso. Hernández, B. García García, M.J. Jordán, M.D. Hernández. Congreso Nacional de Acuicultura. Gijón. España, 2013.....	241
Anexo IV: Autorización de coautores, índices de impacto y cartas de aceptación de las publicaciones presentadas.....	243

INTRODUCCIÓN

1.1. Situación actual de la acuicultura

1.1.1 La acuicultura en el mundo

El acusado incremento de la población en el último medio siglo ha conllevado un aumento en la demanda de alimentos a nivel mundial (Figura 1). Es necesario el desarrollo de sistemas de producción de gran eficacia y que sean capaces de producir alimentos de calidad en los diversos escenarios ambientales, sociales y económicos que se dan lugar alrededor del mundo. Se ha calculado que la producción mundial de alimentos debería crecer en torno a un 70% entre 2010 y 2050 para satisfacer las necesidades alimenticias de la población creciente (APROMAR, 2013).

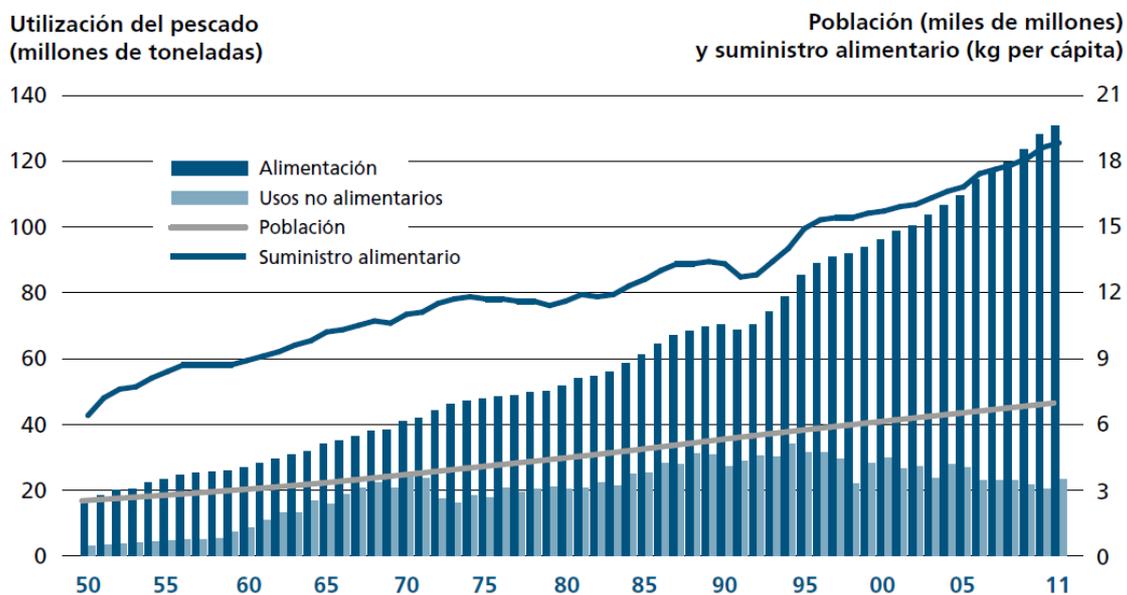


Figura 1. Utilización y suministro mundiales de pescado (FAO, 2012).

La producción agraria terrestre, con muchos siglos de desarrollo, se ha implementado enormemente hasta la actualidad, de forma que cada vez es más difícil conseguir avances en eficiencia alimenticia o velocidad de crecimiento. La acuicultura es una alternativa muy eficaz en la producción de proteína para consumo humano ya que tras unas pocas décadas de existencia a nivel industrial ha demostrado eficiencias alimenticias superiores a las de animales terrestres como el cerdo o las aves de corral. Esto parece estar relacionado con su buena capacidad para incorporar el nitrógeno de la dieta en la proteína muscular, unido a un menor gasto energético por el hecho de ser poiquilotermos, por el medio físico en que se mueven y por otros aspectos fisiológicos

como la excreción de nitrógeno en forma de amonio, mucho menos costosa energéticamente que en forma de urea o ácido úrico (Gjedrem *et al.*, 2012).

El pescado es, además, un alimento muy saludable, habiéndose demostrado las propiedades protectoras de la grasa del pescado frente a enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, depresión, desórdenes neurológicos y sus actividades antitrombótica y antiinflamatoria. Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un consumo de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) de la serie n-3 de 0,3 gramos por día y persona (2:1, DHA:EPA) (Joint FAO/WHO Expert Consultation, 2009).

La pesca de captura y la acuicultura proporcionaron a la población mundial unos 148 millones de toneladas de pescado en 2010, de los cuales unos 128 millones de toneladas se destinaron a consumo humano. El crecimiento anual de la producción de pescado en el último medio siglo ha superado con creces el crecimiento de la población mundial, mejorando por tanto la disponibilidad de pescado per cápita de forma notable, desde un promedio de 9,9 kg al año en la década de los 60 hasta 18,4 kg en 2009.

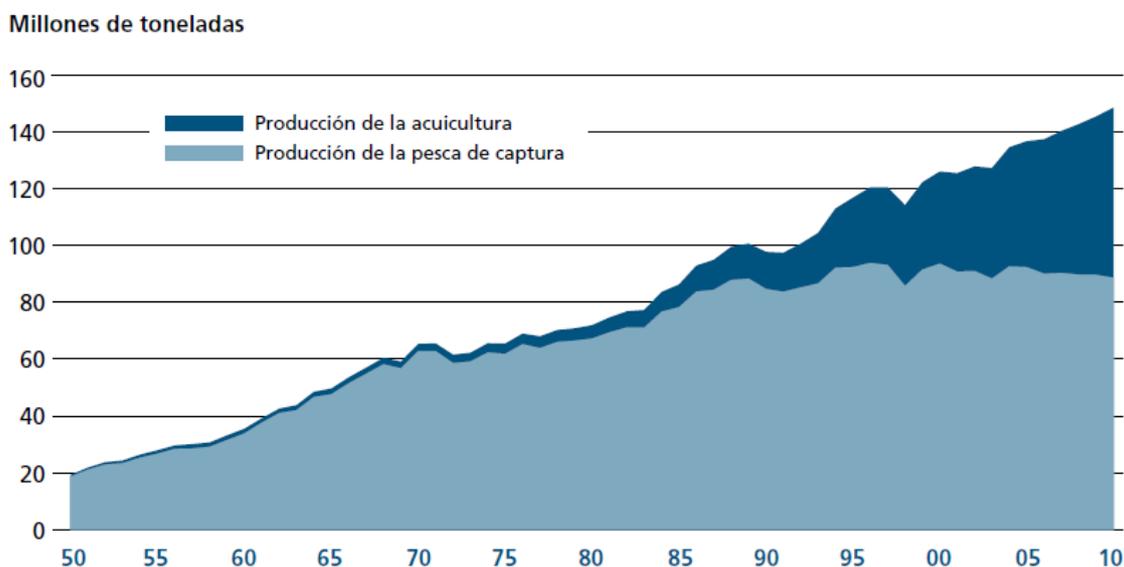


Figura 2. Producción mundial de pesca de captura y acuicultura (FAO, 2012).

Es importante desglosar este crecimiento, ya que la pesca y la acuicultura se han comportado de formas distintas y a la vez complementarias (Figura 2). La pesca extractiva ha estado creciendo de forma continua a lo largo de la historia y entre los años 50 y 80 se produjo un gran aumento de capturas, debido sobre todo al desarrollo tecnológico y al aumento del esfuerzo pesquero. La intensa explotación de los caladeros los llevó a un estado crítico por el cual los Estados y los organismos internacionales

comenzaron a tomar medidas de control para conseguir una explotación sostenible (FAO, 2007 y FAO, 2009). A partir de mitad de los 80 la producción pesquera redujo su crecimiento y entró en una fase de estancamiento en el que aún se encuentra. El aumento de la producción acuícola consiguió suplirlo gracias a la inversión pública y privada en el desarrollo de técnicas de cultivo intensivo de especies acuáticas, sobre todo de peces. Desde entonces la producción de pescado mediante la acuicultura ha crecido enormemente, aunque de forma diferente en cada región del mundo y atravesando fases de crisis en algunas zonas (Tabla 1).

Tabla 1: Producción acuícola anual (toneladas) por países y tasa de variación interanual en 2011 (APROMAR, 2013).

País	Toneladas	% crec. anual
China	50.173.139	4,9
Indonesia	7.937.072	26,4
India	4.577.965	20,8
Vietnam	3.052.500	12,8
Filipinas	2.608.120	2,4
Bangladesh	1.523.759	16,4
República de Corea	1.499.335	8,9
Noruega	1.138.797	13,0
Tailandia	1.008.049	-21,6
Egipto	986.820	7,3
TOTAL 10 PRINCIPALES PRODUCTORES	74.505.556	7,9
RESTO DE LOS PAISES	9.223.757	2,0
TOTAL MUNDIAL	83.729.313	7,2
España	271.963	7,8

El mayor crecimiento se produjo en las décadas de los 80 y los 90, con tasas medias de crecimiento anual de 10,8 y 9,5%, respectivamente. En los años 70 la piscicultura producía 3,5 toneladas de pescado al año, mientras que en 2010 se superaron los 78 millones de toneladas, lo que representaba el 47 por ciento de la producción mundial. En la actualidad, más de la mitad de la producción mundial de pescado para consumo humano se lleva a cabo mediante acuicultura. Sin embargo, el abastecimiento de pescado para la población mediante peces cultivados no queda

totalmente asegurado, ya que es vulnerable a múltiples factores socioeconómicos, ambientales, tecnológicos y de origen natural adverso.

1.1.2 La piscicultura en España

Nuestra geografía, cultura y hábitos alimenticios hacen de España un gran consumidor de pescado a nivel internacional. El consumo per cápita de pescado en nuestro país es de 26,5 kg por persona y año, siguiendo a la cabeza de la Unión Europea a pesar de la caída del 8% sufrida desde 2008. Esto tiene grandes implicaciones a la hora de planificar la gestión del mercado de esta industria agroalimentaria. Además, con sus 7.880 kilómetros de costa, España posee unas condiciones óptimas para el desarrollo de la acuicultura. Actualmente, es el país de la Unión Europea con mayor volumen de producción acuícola, con 271.963 toneladas en 2011, pero teniendo en cuenta el valor de lo producido se sitúa en cuarto lugar con 457,3 millones de euros. Esto se debe a que la mayor parte de la producción nacional corresponde al mejillón (212.556 toneladas en 2011), de menor valor económico que los peces. En cuanto a la producción piscícola, España se sitúa en tercer lugar por detrás de Reino Unido y Grecia (APROMAR, 2013), demostrando la importancia de la industria piscícola en nuestro país. Las principales especies de peces producidas dentro de nuestras fronteras son la dorada, la trucha arcoíris, la lubina y el rodaballo, en este orden por volumen de producción (Tabla 2).

Tabla 2: Producción de pescado de acuicultura en España (toneladas; % del total por CCAA; APROMAR, 2013).

Especie	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Dorada	15.577	20.220	22.320	23.930	23.690	20.360	16.930	19.430
Lubina	5.492	8.930	10.480	9.840	13.840	12.495	14.367	14.270
Rodaballo	4.275	5.815	6.080	7.870	8.320	6.910	7.755	7.970
Anguila	405	328	360	470	510	446	505	460
Besugo	118	134	194	200	185	185	200	187
Corvina	273	845	810	1.300	1.660	3.250	2.880	1.640
Lenguado	60	80	60	55	188	204	110	194
Trucha	25.958	25.401	29.059	24.359	23.232	17.600	16.818	18.612

El rodaballo es, de las especies anteriormente citadas, el de menor producción a nivel nacional (7.970 toneladas en 2012). Sin embargo, representa la mayor parte de la producción europea. Las granjas de engorde y alevinaje se encuentran, prácticamente en su totalidad, en Galicia. Allí se concentra el 99,2% de la producción de rodaballo. Aunque su crecimiento ha sido más tardío y progresivo, no ha experimentado caídas tan fuertes como otras especies (Figura 3). Su precio de primera venta ha bajado bastante en los últimos años pero aún mantiene un buen margen con el precio al consumidor (32%).

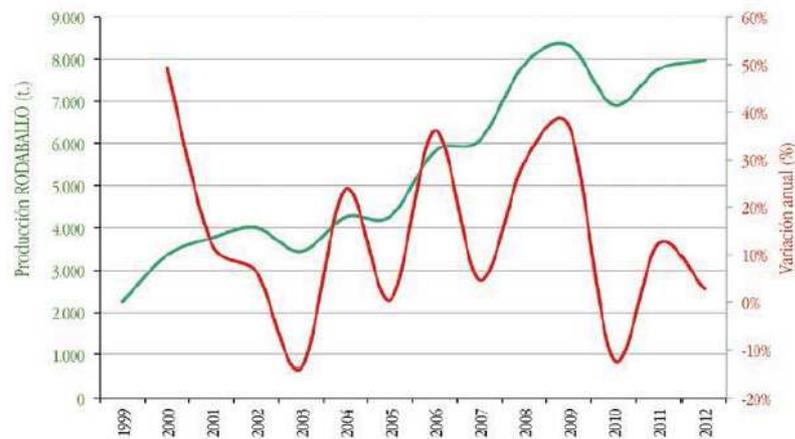


Figura 3. Producción anual de rodaballo (1999-2012) (APROMAR, 2013).

La producción de lubina de acuicultura en España fue de 14.270 toneladas en 2012, reduciéndose ligeramente respecto al año anterior (Figura 4). Andalucía es la principal productora de lubina, acaparando el 28% de la producción en 2012. Las empresas que la producen están repartidas por la costa mediterránea y Canarias. A pesar del descenso en producción, su precio de venta aumentó de forma considerable en los últimos años lo que le aporta una mayor rentabilidad.

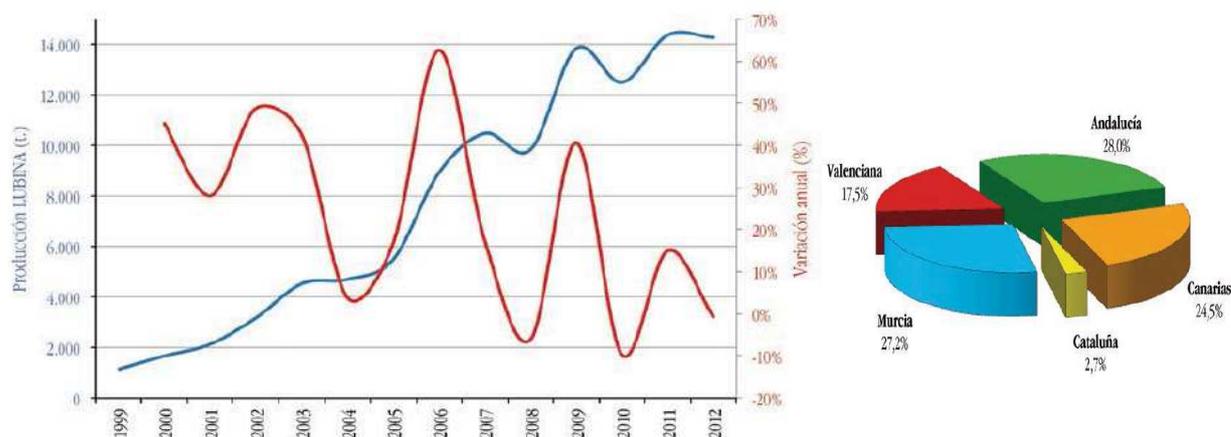


Figura 4. Producción anual de lubina (1999-2012) y distribución geográfica de la producción en 2012 (APROMAR, 2013).

La producción de trucha, a pesar de su continuo decrecimiento en la última década (Figura 5) se mantiene por encima de la producción de lubina (16.818 toneladas en 2012). Es de destacar que la producción de esta especie tiene una historia más larga que la piscicultura marina y se basa en tecnologías de producción muy diferentes. Aún así, es importante tenerla en cuenta en los estudios de mercado, pues puede competir en determinados casos con peces marinos de acuicultura.

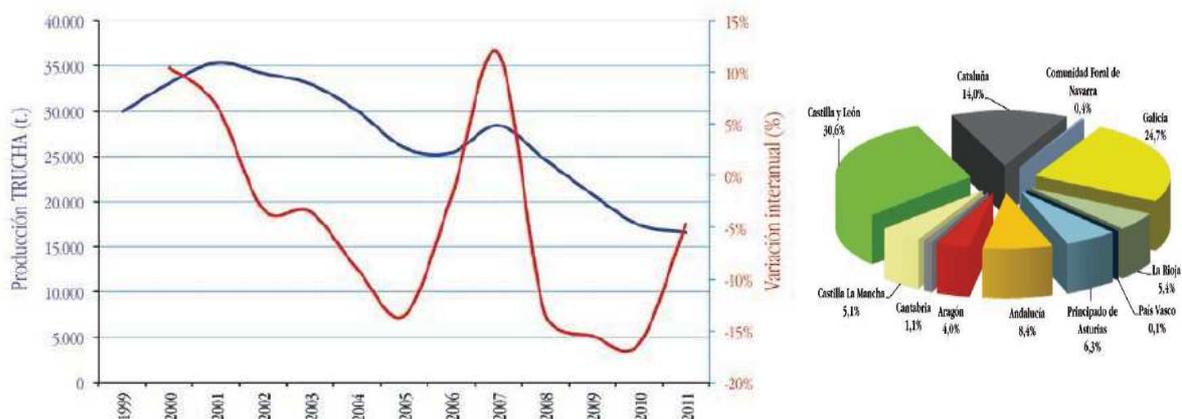


Figura 5. Producción anual de trucha (1999-2012) y distribución geográfica de la producción en 2012 (APROMAR, 2013).

En cuanto a la producción de dorada, experimentó un gran crecimiento en España en las tres últimas décadas, habiendo llegado a ser la especie estrella de la acuicultura española (Figura 6). La máxima producción anual se registró en 2009, con 23.930 t, tras lo cual tuvo una fuerte bajada a nivel tanto nacional como internacional,

reduciéndose en España hasta 16.930 toneladas en 2011. La principal causa de esta caída fue la fuerte bajada de los precios de la dorada en el mercado. Existen diversos factores que pudieron propiciar esta reducción de precios, como son la falta de planificación a nivel nacional, la entrada de producto proveniente de países de la Unión Europea con costes de producción mucho menores o la falta de desarrollo en cuanto calidad y valor añadido, una vez se alcanzaron altas eficiencias de producción. A pesar de esto, en 2012 la producción volvió a aumentar, con un incremento del 14,8% respecto a 2011. Su precio en primera venta en 2012 fue de 4,31 €/kg, lo que supuso un descenso del 13,8% respecto al año anterior, sin embargo el volumen de venta aumentó un 19% y su precio final descendió un 2,6% hasta 7,03€ (APROMAR, 2013).

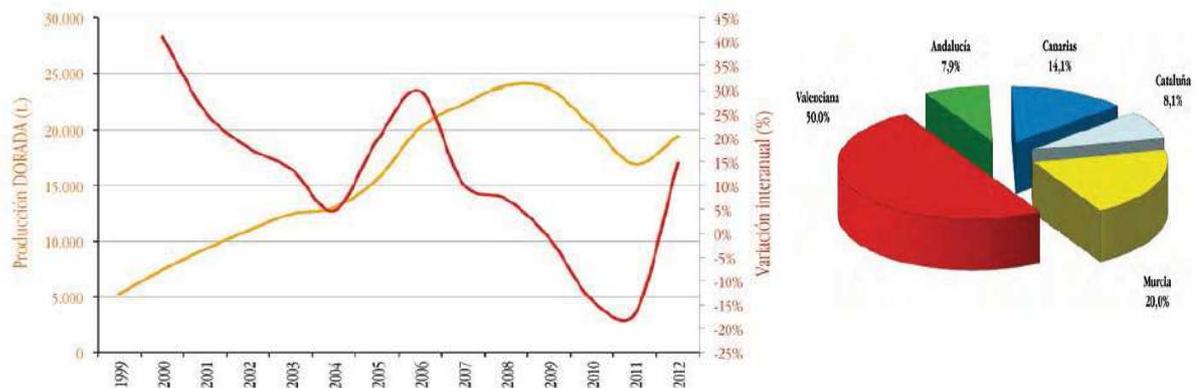


Figura 6. Producción anual de dorada (1999-2012) y distribución geográfica de la producción en 2012 (APROMAR, 2013).

Esta recuperación no debería implicar una reducción en el esfuerzo científico, político y económico, y sería conveniente analizar los factores que han producido la caída del sector en los últimos años para ser capaces de fortalecerlo y optimizarlo.

El incremento del valor del producto puede ser una buena herramienta para fortalecer la piscicultura en España, dados los estrechos márgenes de beneficio actuales. En otras especies de mayor producción en Europa como el salmón ya se trabaja en este aspecto desde hace tiempo, estudiando la incorporación de aditivos como por ejemplo los carotenoides que mejoran el color de la carne o su estado oxidativo (Storebakken *et al.*, 1987). Desde hace algunos años se producen en España dorada y lubina “ecológica” de acuerdo al reglamento europeo que trata la producción y etiquetado de productos ecológicos (Reglamento 834/2007), incrementando el valor del producto y ocupando

otro nicho creciente en el mercado alimentario, los productos orgánicos y/o ecológicos. El esfuerzo que se está realizando en la investigación sobre la sustitución de aditivos sintéticos por aditivos naturales en el pienso para peces, puede ayudar a fortalecer y revalorizar los productos de la acuicultura en este nicho de mercado. También se está trabajando en el procesado del producto para llevar al consumidor presentaciones o elaboraciones de mayor valor añadido. Es necesario conocer bien el mercado, de manera que se puedan adaptar los productos a las cambiantes necesidades y expectativas de los consumidores y así conseguir en cada momento el valor óptimo de su producción.

1.2. Calidad nutricional del pescado

El pescado tiene una elevada calidad nutricional por su importante contenido en proteínas de alto valor biológico -por encima de la proteína de vacuno y de muchas proteínas vegetales-, por su contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA), por sus vitaminas y por la cantidad que presentan de ciertos minerales como el fósforo. Además siempre ha estado relacionado con dietas reconocidas como saludables como son la dieta mediterránea o la dieta nórdica.

1.2.1 Composición del pescado

Tabla 3. Principales nutrientes en distintos tipos de alimentos de origen animal (FAO, 2007)

Tipo de carne	Agua	Proteínas	Lípidos	Minerales	KJ
Músculo de pescado	66-81	16-21	0.2-25	1.2-1.5	–
Vaca (magra)	75.0	22.3	1.8	1.2	116
Vaca (carcasa)	54.7	16.5	28.0	0.8	323
Cerdo (magra)	75.1	22.8	1.2	1.0	112
Cerdo (carcasa)	41.1	11.2	47.0	0.6	472
Ternera (magra)	76.4	21.3	0.8	1.2	98
Pollo	75.0	22.8	0.9	1.2	105
Venado	75.7	21.4	1.3	1.2	103
Grasa de vacuno (subcutánea)	4.0	1.5	94.0	0.1	854
Grasa de cerdo (lomo)	7.7	2.9	88.7	0.7	812
Leche (pasteurizada)	87.6	3.2	3.5	–	63
Huevo (hervido)	74.6	12.1	11.2	–	158

La composición en nutrientes del pescado varía en función de la especie, la edad, el sexo, su estado fisiológico, la estación del año y el sistema de conservación. La carne de pescado tiene una composición en macronutrientes similar a la de la carne de otros animales terrestres como la vaca, aunque, dependiendo de la especie, la carne de pescado puede variar el contenido en lípidos y también en energía (peces grasos vs. peces magros) (Tabla 3).

1.2.1.1. Agua

La mayor parte del músculo del pescado es agua, al igual que en mamíferos y aves. Es variable en función de la especie, la época del año y el estado fisiológico del pez. El contenido en agua es inversamente proporcional al de la grasa (Ordóñez, 1998). Aunque no es un nutriente relevante a en cuanto a exclusividad, interviene de forma importante en la calidad del pescado y en sus propiedades sensoriales (Suárez, 2006).

1.2.1.2. Proteínas

Las proteínas del pescado difieren de las de mamíferos principalmente en la abundancia de cada tipo de ellas en el músculo. Las proteínas estructurales constituyen el 70-80% del total en pescado frente a un 40% en mamíferos. Las proteínas sarcoplasmáticas (solubles en soluciones salinas) son el 25-30% y las del tejido conectivo (colágeno) son aproximadamente el 3% frente al 17% en mamíferos.

Tabla 4: Porcentaje de aminoácidos esenciales y valor biológico de distintos tipos de proteína (Huss, 1995).

Aminoácido	Pescado	Leche	Vacuno	Huevo
Lisina	8,8	8,1	9,3	6,8
Triptófano	1,1	1,6	1,1	1,9
Histidina	2,0	2,6	3,8	2,2
Fenilalanina	3,9	5,3	4,5	5,4
Leucina	8,4	10,2	8,2	8,4
Isoleucina	6,0	7,2	5,2	7,1
Treonina	4,6	4,4	4,2	5,5
Metionina-Cisteína	4,0	4,3	2,9	3,3
Valina	6,0	7,6	5,0	8,1
Valor biológico	76	90	74,3	93,7

Las proteínas del pescado tienen todos los aminoácidos esenciales y un alto valor biológico (alrededor de 76), superior al de la carne de vacuno. Respecto a su perfil aminoacídico suelen tener más proporción de lisina, cisteína y metionina que las proteínas de la carne de vacuno o del huevo (Tabla 4).

1.2.1.3. Lípidos

Los lípidos presentes en el pescado son principalmente fosfolípidos, con función estructural, y triglicéridos, con función de almacenamiento de energía, aunque algunas especies también utilizan ceras con esta última función.

Los peces magros o “pescado blanco” contienen menos de un 1% de grasa en su músculo, de la cual el 90% son fosfolípidos de las membranas celulares. Su principal órgano de almacén de grasa es el hígado, por lo cual se utiliza para extraer aceite de pescado de calidad, como es el caso del aceite de hígado de bacalao.

Los peces grasos o “pescado azul” suelen superar el 5% de grasa en el filete y también está repartida de forma más o menos homogénea por todo el organismo. Las células grasas de estos peces se encuentran sobre todo en el tejido subcutáneo, en el abdomen e insertas entre los paquetes musculares (Kießling *et al.*, 1991). Las células del músculo rojo son capaces de metabolizar directamente los lípidos, mientras que las células del músculo blanco dependen del glucógeno para la producción de energía, al igual que sucede con peces magros. Entre los peces grasos hay grandes migradores, los cuales varían enormemente su contenido en triglicéridos, e incluso en fosfolípidos, dependiendo de la época del año (Love, 1970).

Los lípidos del pescado son muy diferentes de los que encontramos en animales terrestres. En éstos predominan los ácidos grasos saturados o con pocas insaturaciones mientras que en el pescado abundan los que tienen 5 o 6 insaturaciones a lo largo de una cadena por lo general larga. Este tipo de ácidos grasos son los que atraen la atención de la comunidad científica por sus propiedades saludables para el ser humano. El contenido de PUFAs, depende mucho de la especie y del hábitat, siendo los peces marinos bastante más ricos en estos ácidos grasos que los peces de agua dulce -cerca de un 90% frente a un 70%-. Esta diferencia se debe a que son incorporados principalmente por la dieta, siendo algunos de ellos esenciales como el ácido eicosapentaenoico (EPA), el

ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (ARA). Las algas y otros organismos en la base de la cadena trófica marina los producen gracias a la actividad de desaturasas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ (Figura 7), con un nivel de expresión en peces que no les permite sintetizar los ácidos grasos esenciales antes mencionados (Tocher, 2003). Estos ácidos grasos se transfieren a lo largo de la cadena trófica, hasta llegar a las especies de consumo humano.

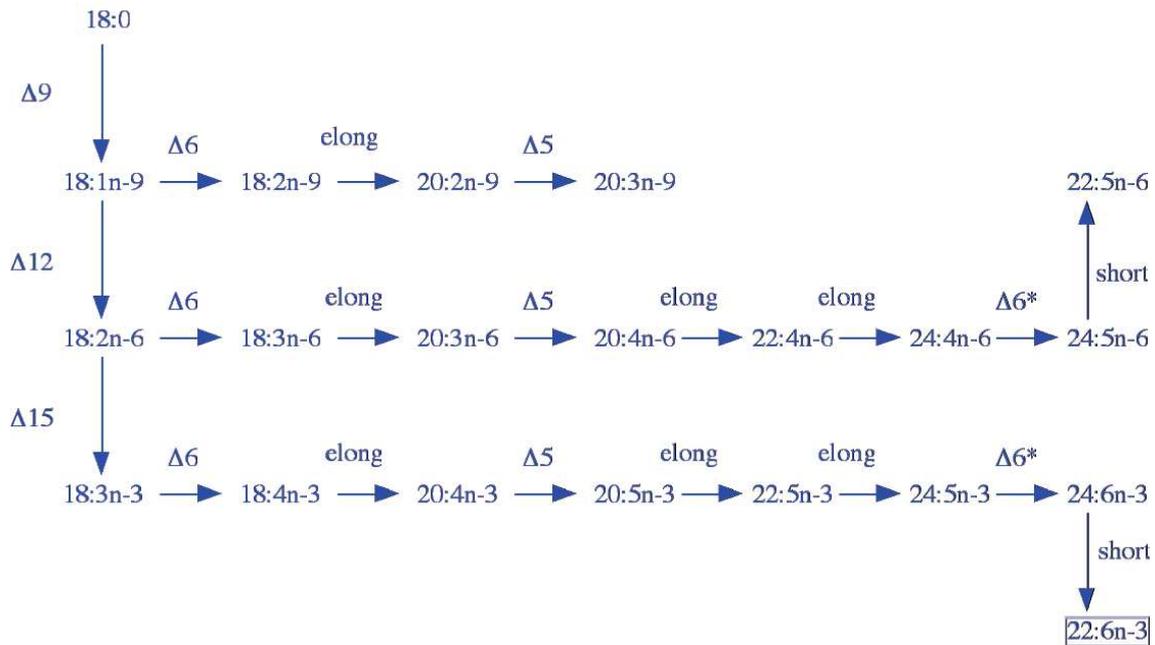


Figura 7. Rutas de elongación de la cadena acil de los ácidos grasos (Tocher, 2003).

1.2.1.4. Compuestos nitrogenados no proteicos

Un apartado minoritario, pero de gran importancia desde un punto de vista de la conservación, es el de los compuestos nitrogenados no proteicos. Se trata de un conjunto heterogéneo de moléculas que contienen nitrógeno, de naturaleza no proteica y solubles en agua. Los más importantes a nivel tecnológico son las bases volátiles - amoniaco, trimetilamina (TMA), dimetilamina (DMA)-, el óxido de trimetilamina (OTMA), los aminoácidos libres, la urea, los nucleótidos, etc. Estos compuestos proceden fundamentalmente del sarcoplasma y constituyen en los teleósteos un 9-18% del nitrógeno total y un 33-38% en los elasmobranquios (Piclet, 1987).

El OTMA tiene función osmorreguladora y su cantidad puede variar enormemente en función de la especie, siendo los cefalópodos y los elasmobranquios

los que mayor concentración presentan y los peces planos y pelágicos los que menos. Su reducción por parte de las bacterias produce TMA y DMA, que aporta el olor característico del pescado deteriorado.

La concentración de urea en peces teleósteos suele ser muy baja (<0,05% del tejido muscular) pero es destacable que es un nutriente para las bacterias que, al transformarlo en amoníaco, producen olores desagradables (Ordóñez, 1998).

La abundancia de nucleótidos de adenina como adenosín trifosfato (ATP) y sus derivados tienen gran importancia en el deterioro del pescado y no tanto como nutriente. Su deterioro afecta enormemente a la calidad del pescado durante el almacén y existen índices de calidad que se basan en este aspecto.

El alto contenido en histidina y su deterioro también puede afectar a la calidad durante el almacén y, de hecho, se han dado casos de intoxicación por histamina, producto de la degradación de la histidina (Huss, 1995).

1.2.1.5. Minerales

El pescado es una buena fuente de minerales, y se recomienda su consumo cuando se sufren carencias de determinados elementos. Los más abundantes son calcio (5-200 mg/100g de músculo), fósforo (100-400 mg/100g de músculo), sodio (30-150 mg/100g de músculo), potasio (250-500 mg/100g de músculo) y magnesio (10-50 mg/100g de músculo); y en cantidades traza pueden encontrarse yodo (16-318 µg/100g), hierro (1mg/100g), cobre, flúor, cobalto y cinc. En general, los productos de origen marino son los alimentos naturales más ricos en yodo, ya que a pesar de ser un elemento traza, se encuentra en cantidades superiores que en otras grasas animales y que en la mayoría de aceites vegetales (Ordóñez, 1998).

1.2.1.6. Vitaminas

El pescado es una buena fuente de vitaminas liposolubles, sobre todo vitaminas A y D que, en especies grasas, se encuentran en cantidades muy por encima de las encontradas en mamíferos. Esto hace al pescado un alimento apropiado cuando existe un déficit de estas vitaminas en la dieta. La falta de vitamina A puede producir

problemas oculares y un deterioro del sistema inmune, mientras que en el caso de la vitamina D produce problemas óseos por falta incorporación de calcio. Se ha demostrado que el contenido de vitaminas en el filete es un reflejo de su nivel de inclusión en la dieta (Waagbø *et al.*, 1993) y, en el cultivo de peces, el alimento incluye un complemento vitamínico y normalmente vitamina E que es un potente antioxidante.

1.2.1.7. Contaminantes

La presencia de algunos minerales no deseados como son los metales pesados, está creando controversia sobre el consumo de pescado en los últimos años. Se ha demostrado la presencia de mercurio a niveles alarmantes en ciertas especies de peces marinos, principalmente aquellos que se sitúan en la parte alta de la cadena trófica (Guallar *et al.*, 2002). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la OMS recomiendan unos niveles máximos de consumo semanal de mercurio de 4 µg (mercurio inorgánico) o 1,6 µg (metilmercurio) por kg de peso corporal. Estos límites son de especial interés para los grupos de riesgo como las mujeres embarazadas, los bebés y los niños. Los PCBs, un grupo de compuestos considerado de los más nocivos para el ser humano, son abundantes en productos pesqueros. La acuicultura puede aportar soluciones a este problema reduciendo el contenido en metales pesados o en PCBs (Bell *et al.*, 2005) en el pescado de consumo. Por tanto, sería muy útil un sistema de certificación en este sentido para mejorar la aceptación del pescado de acuicultura.

1.2.2. Efectos beneficiosos de los PUFAs en la salud humana

Gran cantidad de los efectos beneficiosos del consumo de pescado (Figura 8) están relacionados con los PUFAs de la serie n-3, especialmente HUFAs n-3 que son esenciales para el ser humano, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). En la tabla 5 se describen algunos de los PUFAs más abundantes en el pescado.

Ya en los años setenta se comenzaron a investigar las propiedades saludables de este tipo de ácidos grasos. El hecho de que los esquimales de Groenlandia tuvieran una incidencia de enfermedades coronarias muy por debajo de la habitual en otros países, a pesar de su alto consumo de colesterol y de alimentos ricos en grasa, llamó la atención

de los investigadores. En los primeros estudios se descubrió que tenían menor cantidad de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que los esquimales daneses, que se alimentaban con dietas occidentales (Bang & Dyerberg, 1980). Desde aquel momento no ha cesado el esfuerzo en investigación en este campo, ya que el abandono de las dietas tradicionales y el creciente consumo de alimentos precocinados y de baja calidad nutritiva ha producido un deterioro general de la salud humana. Por poner un ejemplo, en Estados Unidos las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de mortalidad superando el 50% del total.

Tabla 5: Principales PUFAs presentes en el pescado de interés en nutrición humana (Sidhu, 2003).

Nombre	Nº de carbonos	Nº de dobles enlaces	Símbolo
Linoleico	18	2	18:2, n-6
γ -Linoleico	18	3	18:3 n-6
α -Linoleico	18	3	18:3 n-3
Araquidónico	20	4	20:4 n-6
Eicosapentaenoico	20	5	20:5 n-3
Docosahexaenoico	22	6	22:6 n-3

Los ácidos grasos poliinsaturados tienen entre sus principales efectos beneficiosos la reducción del riesgo de padecer ciertas enfermedades:

La hipertensión está fuertemente relacionada con el consumo de PUFAs n-3, ya que su consumo ha demostrado reducir las presiones sistólicas y diastólicas en personas con hipertensión (Sidhu, 1993). Varias enfermedades cardiovasculares están relacionadas con el bajo contenido de PUFAs n-3 de la dieta, como la arteriosclerosis, el infarto de corazón, el infarto cerebral (Sidhu, 2003). Sin embargo estas enfermedades tienen un origen complejo y multifactorial por lo que algunos estudios no encuentran esta relación (Orencia *et al.*, 1996).

El consumo de aceite de pescado también se ha relacionado con la baja incidencia de la diabetes. Su capacidad de reducir los triglicéridos en sangre y la hipertensión parece reducir los efectos de la resistencia a la insulina (Berry *et al.*, 1997).

Los PUFAs parecen tener gran importancia en el desarrollo del sistema nervioso, el sistema reproductor y algunos receptores sensoriales como la retina ocular. La gran abundancia de los mismos en las sinapsis nerviosas, en los testículos y espermatozoides y en la retina hace pensar que desarrollan un papel importante en ellos. De hecho se ha demostrado que la deficiencia de DHA en la dieta puede conducir a problemas relacionados con la memoria, la agudeza visual y la reproducción. (Sidhu, 1993). Se han encontrado relaciones interesantes con otras enfermedades en las que se está realizando una amplia investigación en la actualidad, como son el cáncer, la depresión y el Alzheimer (Adams *et al.*, 1996; Rose, 1997; Lukiw & Bazan, 2008).

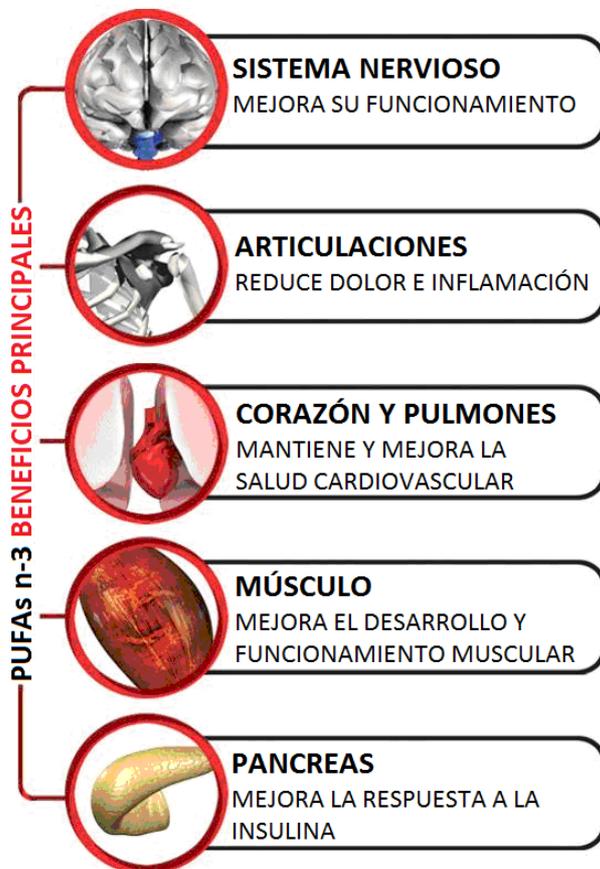


Figura 8. Efectos beneficiosos destacados de los PUFAs presentes en el pescado.

1.2.3. Promoción del consumo de pescado: ventajas de la acuicultura

La tendencia actual de incrementar la seguridad alimentaria, el aseguramiento de la calidad del producto mediante controles de calidad y la trazabilidad de cada uno de sus componentes, hace de la acuicultura una opción muy útil para la provisión de pescado a la población. Una de las ventajas de la acuicultura frente a la pesca extractiva,

es la posibilidad de controlar el producto y conseguir, mediante la aplicación de las nuevas tecnologías, una constante mejora en la calidad tanto desde el punto de vista nutricional como sensorial. Factores como el método de cultivo, el tipo de alimentación, el manejo, el método de sacrificio y la posterior conservación influyen de forma importante sobre los aspectos antes mencionados. Es por ello por lo que se considera necesario el estudio del pescado como producto final destinado al consumo, centrándose en la influencia que aspectos importantes del cultivo tienen sobre su calidad.

Tradicionalmente, la responsabilidad del aseguramiento de la calidad del pescado ha recaído sobre las agencias gubernamentales, mediante la inspección de las áreas de procesamiento y la evaluación final del producto. Este tipo de sistema es costoso, ineficiente y no proporciona una garantía de calidad real (Huss, 1995). En las últimas décadas se han creado sistemas de calidad mejorados, como el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP), que se hizo obligatorio en la Unión Europea ya en 1994 (EEC, 1994). En estos años se ha seguido implementando el control de la seguridad y la calidad de los productos alimenticios. De hecho, desde 2005 la Organización Internacional de Estandarización (ISO) ofrece a las empresas de acuicultura la norma ISO 22000 mediante la cual pueden demostrar a terceros, que realizan una gestión eficaz de la seguridad alimentaria en toda su cadena de producción, desde el alevinaje hasta la presentación al consumidor. Anteriormente, en Europa existían estándares que podían certificar únicamente el procesado del producto una vez fuera de la granja de acuicultura como son el FS (International Food Standard) y BRC (British Retail Consortium), por tanto, la aparición de esta norma era muy necesaria. Sería bueno seguir implementando el control de la calidad del producto, para poder garantizar y certificar su trazabilidad y ciertas ventajas frente a la pesca extractiva, como el menor contenido en PCBs y metales pesados (Bell *et al.*, 2005).

1.3. Procesos de deterioro del pescado

La carne del pescado, comparada con otros tipos de carnes, es muy susceptible a la alteración provocada por la actividad microbiana y los procesos autolíticos. Esto es debido fundamentalmente a su gran contenido en determinados constituyentes (agua, aminoácidos libres, lípidos con alto grado de insaturación, compuestos nitrogenados no proteicos, enzimas autolíticas, etc.). Su calidad puede verse alterada en poco tiempo por los procesos del deterioro *post mortem*. Por tanto es de vital importancia el uso

apropiado de las técnicas de manejo, procesado y almacenamiento (Olafsdottir *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta que el pescado fresco es un alimento muy perecedero, su frescura es quizás el atributo más determinante de su calidad.

1.3.1. Cambios autolíticos

1.3.1.1. Carbohidratos

En el momento de la muerte del pez, el evento más importante que ocurre en el músculo es el cese del aporte de oxígeno por la ausencia de bombeo de sangre. En estas condiciones la glucólisis aerobia se detiene pero continúa la anaerobia. En condiciones de anaerobiosis la energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP) puede seguir produciéndose a partir del fosfato de creatina durante un corto espacio de tiempo, pues sus reservas son muy limitadas. La glucólisis anaerobia puede entonces continuar durante un cierto tiempo, produciendo ácido pirúvico y ácido láctico, lo que se traduce en un descenso del pH. Uno de los efectos de este descenso de pH es la pérdida de capacidad de retención de agua por el músculo, ya que las proteínas se desnaturalizan parcialmente y su capacidad para enlazar moléculas de agua desciende.

Cuando el músculo agota las reservas de glucosa (gasta 18 veces más durante la glucólisis anaerobia) desciende la concentración intracelular de ATP y se produce el *rigor mortis*. La velocidad con la que se llegue a este punto va a depender de las condiciones nutritivas del pez y el estado fisiológico del músculo. Condiciones de sacrificio en la que los peces son sometidos a estrés y ejercicio físico aceleran el *rigor mortis* y reducen la calidad del pescado (Jerrett *et al.*, 1996). De acuerdo a la tendencia actual de mejora del bienestar animal y de las técnicas de sacrificio actual, se están realizando importantes esfuerzos en mejorar la calidad del pescado en muchos aspectos, entre ellos el retraso del *rigor mortis*.

1.3.1.2. Nucleótidos

El ATP del músculo del pez, tras su muerte, sigue una ruta degradativa mediante una serie de desfosforilaciones y desaminaciones (Figura 9). El ATP se transforma en difosfato de adenosina (ADP), este a su vez en monofosfato de adenosina (AMP) y sucesivamente en monofosfato de inosina (IMP), inosina e hipoxantina. El IMP está

relacionado con el sabor dulce y deseable del pescado fresco, mientras que la hipoxantina está relacionada con el sabor amargo del pescado deteriorado. La primera parte de esta reacción en cadena es más rápida y se lleva a cabo por enzimas endógenas, por lo que el IMP se encuentra en fases tempranas del almacén. La posterior degradación hasta hipoxantina es más lenta y participan también enzimas microbianas.

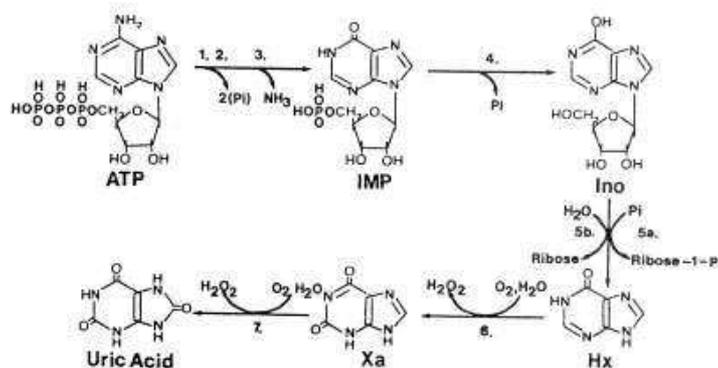


Figura 9. Ruta degradativa del ATP en el músculo de pescado.

Saito *et al.* (1959) desarrollaron el índice K, que proporciona una puntuación de frescura relativa, basada en los cambios autolíticos que se producen durante la conservación del pescado. Este índice mide la relación entre la cantidad de inosina, hipoxantina y el total de compuestos derivados de la degradación de ATP. Cuanto más alto es el valor de K, menor es la frescura, y viceversa. La degradación de nucleótidos coincide con los cambios percibidos en la frescura pero no está relacionada con la actividad microbiana y el desarrollo de la oxidación lipídica, por lo que este índice tiene importantes limitaciones en la determinación de la calidad (Hughes & Jones, 1966).

1.3.1.3. Proteínas

Las enzimas proteolíticas distribuidas por los tejidos del pescado contribuyen a la degradación *post mortem* de los productos pesqueros durante su procesado y conservación (Ghaly *et al.*, 2010). Como consecuencia de la autólisis de las proteínas musculares, se produce un aumento en la concentración de péptidos y aminoácidos libres, lo cual favorece el crecimiento bacteriano y la producción de aminas biógenas. Dentro de los lisosomas se encuentran las catepsinas que intervienen en el recambio de proteínas del músculo del animal vivo, pero al ser liberadas en el fluido celular tras la muerte, actúan, sobre las cadenas pesadas de actina y miosina. Las calpaínas, presentes en el citosol en animales vivos, degradan la línea Z y son mucho más activas que las

catepsinas a temperaturas bajas (Muramoto *et al.*, 1989). Las colagenasas también tienen un papel importante en el deterioro del pescado y su calidad, al producir el deterioro de la miocomata, el tejido conectivo que separa los paquetes musculares o miotomos (Caballero *et al.*, 2009). Esto produce que el filete se separe por estas zonas e incluso se aprecien hendiduras bajo la piel en el pez entero (Figura 10).

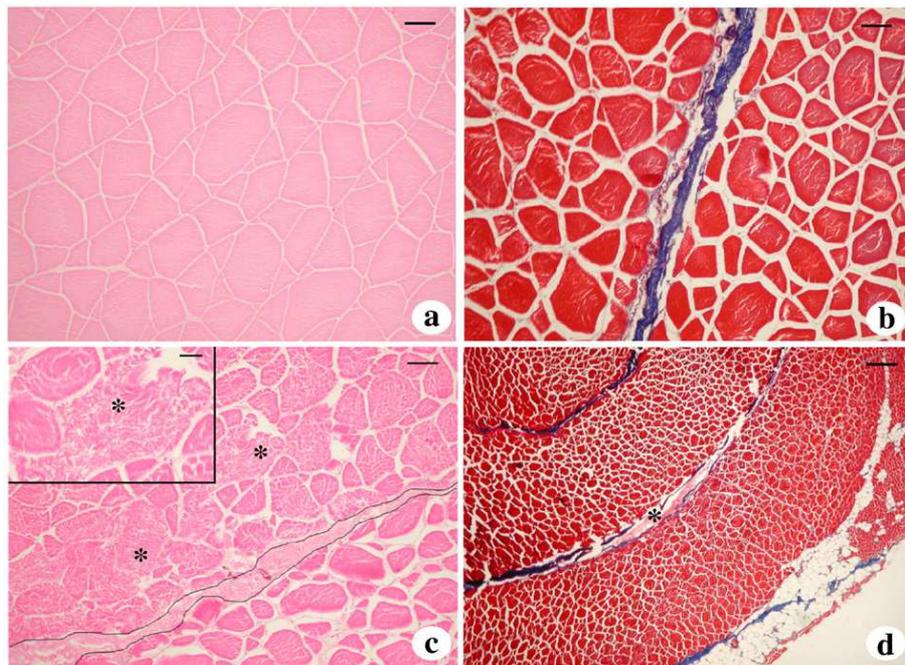


Figura 10. Secciones transversales de músculo de dorada a los 0 (a), 2 (b), 4 (c) y 7 (d) días tras el sacrificio. Se puede observar la separación de las fibras musculares y posteriormente de los miotomos (Caballero *et al.*, 2009).

Las proteínas, aunque menos sensibles que los lípidos, también se oxidan durante los procesos de deterioro del pescado. Esta oxidación ha sido poco tomada en cuenta en alimentos que contienen el músculo del animal, pero se ha estudiado ampliamente en modelos proteínicos. La oxidación puede producir la polimerización de las proteínas del músculo y su degradación, produciendo una pérdida de su solubilidad y funcionalidad que conlleva cambios en retención de agua, textura y color (Estévez & Cava, 2004).

1.3.1.4. Lípidos

El pescado contiene gran cantidad de enzimas capaces de hidrolizar diversas clases lipídicas (triglicéridos, fosfolípidos, etc.) en ácidos grasos libres. Estos ácidos grasos, aunque a priori no afectan al valor nutricional o sensorial, son más reactivos,

pudiendo interaccionar con proteínas u oxidarse más fácilmente. Debido a la alta cantidad de PUFAs en el pescado y su facilidad para oxidarse (sección 3.3.), el aumento en la cantidad de ácidos grasos libres tiene un efecto importante en la peroxidación lipídica y puede ser un buen índice de deterioro.

1.3.2. Cambios microbiológicos

La actividad microbiana tiene una gran importancia en el deterioro del pescado durante su conservación, siendo la principal causa de los cambios producidos durante este proceso. El pescado tiene ciertas características que lo hacen propicio para el crecimiento de bacterias en comparación con otros tipos de carne. Al ser animales poiquiloterms son portadores de bacterias psicrófilas o psicotrofas, las cuales pueden crecer en las condiciones de almacenamiento del pescado. El limitado descenso del pH tras el sacrificio permite el crecimiento de bacterias sensibles a pH bajo como *Shewanella putrefaciens*. Además, la alta disponibilidad de aminoácidos libres y nucleótidos proporcionan un sustrato perfecto para el crecimiento bacteriano. Por último, otro factor importante es la presencia de OTMA, el cual actúa de aceptor de electrones para bacterias anaerobias que lo transforman en TMA (Gram & Huss, 1996)

Tras la muerte del pez, las bacterias presentes en agallas, piel y tracto digestivo empiezan a colonizar otros tejidos por la ausencia de sistema inmune. Las bacterias que habitan en la superficie de la piel del pescado comienzan colonizando la base de las escamas y terminan penetrando entre las fibras musculares (Huss, 1995). También a través de los intestinos entran en el resto de vísceras y en el músculo, y a través del sistema muscular alcanzan órganos como el riñón y el sistema vascular (Fraser y Sumar, 1998, parte II).

Entre la flora bacteriana que se puede identificar en el pescado en conservación, es importante diferenciar entre la “flora del deterioro” y las “bacterias específicas del deterioro”. El primer término describe el total de bacterias que podemos encontrar en un pescado en proceso de deterioro o descomposición, mientras que el segundo se refiere a bacterias que producen olores y sabores desagradables, los cuales se relacionan con el deterioro (Daalgard, 1995). En el pescado fresco, las bacterias específicas del deterioro son una porción minoritaria, la cual va creciendo hasta ser la gran mayoría de la flora

bacteriana que encontramos a las 2-3 semanas de almacén. Los productos de su metabolismo producen en gran parte los olores y sabores desagradables del pescado deteriorado. Entre las principales bacterias del deterioro del pescado almacenado en hielo se encuentran *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas spp* (Huss, 1995). En cada especie de pescado estas bacterias pueden ser diferentes y su identificación no es sencilla, por lo que la legislación actual se basa en el recuento total de bacterias.

1.3.3. Susceptibilidad a la oxidación

La oxidación lipídica puede provocar cambios en el olor, el sabor y el color, disminuyendo la aceptabilidad del producto, por lo que los alimentos que tienen una alta proporción de grasas o aceites suelen ser perecederos a corto plazo, como es el caso del pescado. El pescado es uno de los alimentos más susceptibles a la oxidación, debido a la cantidad y el tipo de lípidos que contiene. Entre los lípidos que encontramos en el filete hay una alta proporción de PUFAs y HUFAs, que son muy inestables frente a la oxidación, y aún más cuanto mayor es la longitud de la cadena y el número de insaturaciones. Los productos liberados por esta oxidación, además de aportar olor y sabor a rancio, pueden afectar a otros componentes del pescado como las proteínas musculares, uniéndose a ellas y modificando la textura del filete.

Los lípidos se oxidan mediante una reacción autocatalítica en la que se generan radicales libres (Figura 11). Esta comienza con la escisión de un átomo de hidrógeno de la cadena acil, quedando un radical lipídico (L⁻) que es muy reactivo con el oxígeno y forma rápidamente un radical peróxido (LOO⁻). Este radical puede a su vez escindir otro hidrógeno de otra cadena acil produciendo un hidroperóxido y otro radical lipídico. De esta manera la reacción en cadena continúa hasta que un radical se inactiva por la reacción con otro o con un antioxidante. Los peróxidos producidos en esta reacción son insípidos por lo que el índice de peróxidos, que ha sido muy utilizado, no guarda relación con la calidad sensorial (Huss, 1995). Los hidroperóxidos producidos siguen dividiéndose hasta formar aldehídos, cetonas, alcoholes, pequeños ácidos carboxílicos y alcanos. Algunos aldehídos como el malondialdehído (MDA) se pueden determinar fácilmente y tienen mucha importancia en el control de la seguridad y calidad del pescado. Además, estos compuestos reaccionan con proteínas y glúcidos en la llamada reacción de Maillard, produciendo un descenso en el valor de la proteína y en la textura.

Los iones metálicos o la presencia de la enzima lipooxigenasa pueden afectar a la velocidad y cantidad de oxidación lipídica en el filete. En las células vivas existe una defensa enzimática frente a esta reacción, como es la glutatión peroxidasa, pero al producirse la muerte cesa su actividad por falta de sustratos. También existen antioxidantes propios del pez (tocoferoles, ubiquinol, carotenoides y ascorbato). El demostrado efecto de la adición de antioxidantes en la dieta sobre la cantidad que presenta el filete ha hecho de su administración oral la principal causa para luchar contra el deterioro del pescado, además de la implementación de las técnicas industriales de conservación.

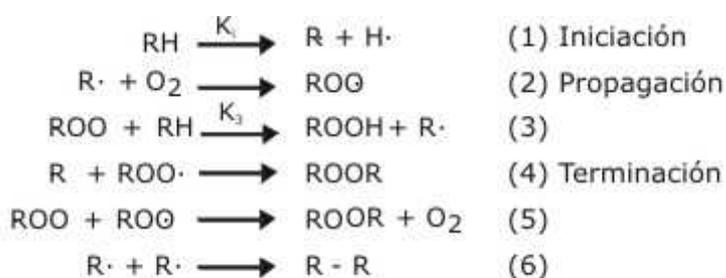


Figura 11. Proceso de autooxidación de ácidos grasos insaturados.

1.3.4. Métodos de evaluación de la calidad del pescado

El término de calidad de un alimento puede abarcar aspectos como la apariencia, la frescura, la seguridad microbiológica o la seguridad toxicológica. Por tanto la calidad debe ser definida en cada producto y depende de las cualidades que esperamos encontrar en el mismo. Los métodos de evaluación del pescado están basados en los procesos de deterioro explicados con anterioridad y en las propiedades sensoriales, pues son estas últimas las que van a determinar la aceptabilidad por parte del consumidor.

1.3.4.1 Métodos físicos

Una de las propiedades más básicas del pescado que cambia con el tiempo es el pH, siendo muy sencillo de medir mediante pHmetros intramusculares (Figura 12) o mediante la homogenización de músculo en agua destilada.



Figura 12. pHmetro intramuscular durante la realización de medidas en dorada almacenada en hielo.

El descenso del pH puede aportar información acerca de la cantidad de ácido láctico acumulado. Este depende de la cantidad de glucógeno acumulado en el músculo y del método de sacrificio, y va a influir en el *rigor mortis* y en la calidad posterior del pescado. Esta medida es más útil en mamíferos, donde el descenso es mucho más pronunciado (hasta pH 5 aproximadamente). En la mayoría de peces teleósteos incluida la dorada, este descenso apenas llega a pH 6,5 durante las primeras horas, pudiendo aumentar después por la actividad microbiana.

Otro método de evaluación es la medida de la capacidad de retención de agua (CRA) del filete. El agua inmovilizada dentro del músculo aporta ternura y jugosidad, atributos muy importantes y valorados por el consumidor. La desnaturalización y degradación de las proteínas es uno de los factores que propician la pérdida de CRA quizás uno de los primeros. La mayor parte del agua inmovilizada se encuentra asociada a proteínas y es difícilmente liberada incluso con presión. La pérdida de membranas celulares y la propia estructura del músculo también influye en el descenso de este índice.

La medida del color del filete es muy útil para evaluar la calidad o monitorizar su deterioro. Esta propiedad está muy relacionada con la composición del filete y la presencia de sustancias coloreadas (carotenoides). También está relacionada con procesos del deterioro, como la desnaturalización de proteínas que produce un

incremento de la luminosidad o el enranciamiento de las grasas que se traduce en un aumento del componente amarillo del color (Ruff *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2009; Tuckey *et al.*, 2012). La medida de este parámetro se hace mediante un colorímetro que aporta valores en el sistema CIELab. Este sistema fue recomendado por la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE, 1978). Según este sistema el color está definido por tres parámetros de forma tridimensional (Figura 13). El parámetro L define la luminosidad de la muestra, el parámetro a^* define el color en el eje rojo-verde y el parámetro b^* define el color en el eje amarillo-azul.

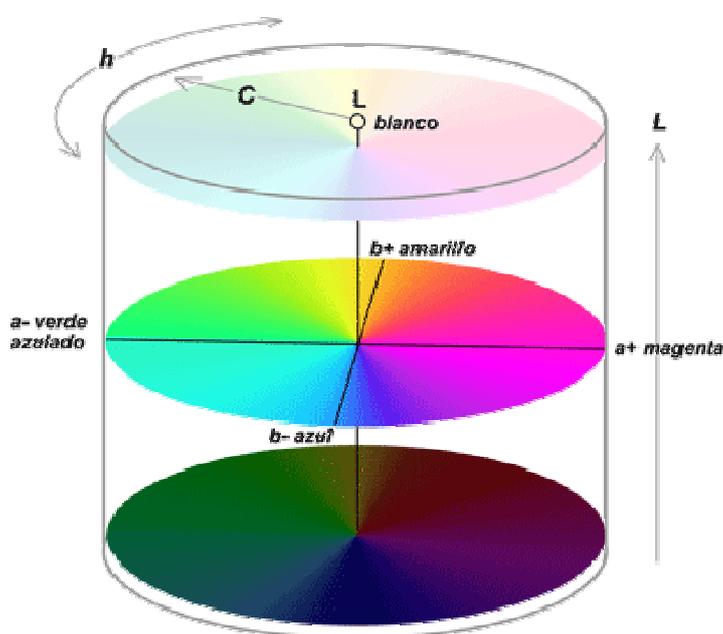


Figura 13. Sistema CIELab para la medida del color.

1.3.4.2. Métodos químicos

Gran parte de los métodos químicos de evaluación del pescado se basan en productos de la oxidación lipídica, ya que es el mecanismo principal de deterioro y de producción de atributos sensoriales indeseables. El valor de peróxidos (VP) es uno de ellos y su análisis es bastante simple. Sin embargo, la naturaleza transitoria de estos compuestos (Kanner & Rosenthal, 1992) y la poca relación con los parámetros sensoriales lo hacen poco útil durante un almacenamiento prolongado. Existe otro índice de la oxidación lipídica que se basa en la abundancia de productos secundarios, los TBARS (del inglés “Thiobarbituric Acid Reactive Substances”) entre los que el MDA es el componente mayoritario. Tras la reacción del MDA con el ácido

tiobarbitúrico se forma una molécula cromógena de color rosa, cuya abundancia se puede medir mediante espectrofotometría (Figura 14).

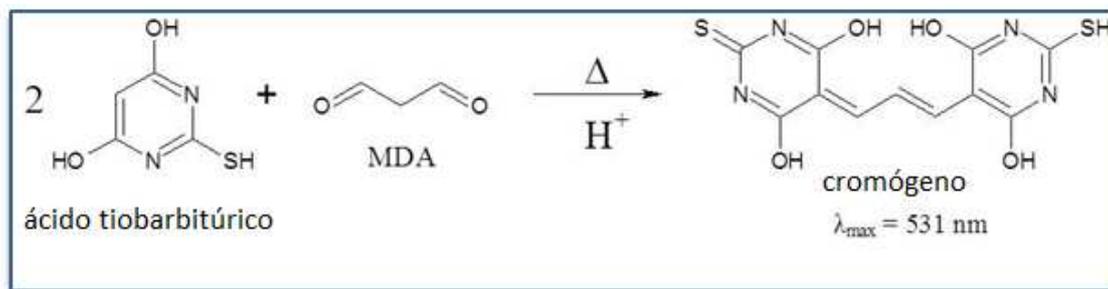


Figura 14. Reacción del ácido tiobarbitúrico con el MDA para formar el compuesto cromógeno.

Otro método de evaluación de base química es el del nitrógeno básico volátil total (NBVT), ampliamente utilizado y de sencilla ejecución. Este método mide todos los compuestos nitrogenados volátiles, incluyendo TMA, DMA, amoníaco y otros compuestos nitrogenados básicos. Incluye productos producidos por deterioro bacteriano (TMA) y por procesos autolíticos (DMA), pero en general se trata de un índice del deterioro proteico. La producción de estos compuestos no se hace patente por este método hasta que el pescado está bastante deteriorado. Por tanto, su uso no es útil durante los primeros diez días en bacalao refrigerado y otras especies (Rehbein & Oehlenschläger, 1982), no mostrando cambios en dorada dentro de las dos primeras semanas de almacenamiento en hielo (Álvarez *et al.*, 2012). En cefalópodos su utilidad en la medida de la calidad es mayor ya que estos animales producen más cantidad de bases volátiles y con mayor antelación (Le Blanc & Gill, 1984). La determinación del amoníaco también ha sido utilizada para medir la calidad del pescado, pero al igual que las bases volátiles de nitrógeno, se manifiesta cuando el pescado está ya muy deteriorado.

La determinación de TMA, que se encuentra entre los compuestos medidos por el NBVT, es un índice muy relacionado con el desarrollo bacteriano. Determinadas bacterias anaerobias utilizan el OTMA como aceptor de electrones, transformándolo en TMA. La escasa correlación de este índice con el recuento de bacterias totales se ha explicado por la distinta capacidad de cada especie bacteriana de producir TMA. De aquí el término de “bacterias específicas del deterioro”, que son las que realmente producen los efectos indeseables en el pescado aunque no sean el componente

mayoritario de la población bacteriana. *Photobacterium phosphoreum* es uno de estos organismos, que genera entre 10 y 100 veces más cantidad de TMA que otros microorganismos (Daalgard, 1995). La utilización de este índice tiene la ventaja de que reproduce el deterioro producido por bacterias más que su presencia, que puede no haber afectado aún al filete. Sin embargo es de aparición relativamente tardía y varía en función de la especie, por lo que se debe usar con precaución.

La determinación de aminas biógenas (histamina, putrescina, cadaverina, tiramina) y de catabolitos de nucleótidos como la hipoxantina, se utilizan más como índices de calidad higiénico-sanitaria que como índices de deterioro (Halasz *et al*, 1994). La aparición de episodios de intoxicación por algunos de estos compuestos ha llevado a su control exhaustivo en el mercado de productos pesqueros.

1.3.4.3. Métodos microbiológicos

Los métodos microbiológicos de evaluación del pescado nos proporcionan información sobre la presencia de bacterias o microorganismos de importancia para la salud pública y nos dan una imagen de la calidad higiénica del pescado durante su manipulación y procesamiento. Los análisis de recuento en placa requieren tiempo y personal capacitado, pero son bastante fiables y reproducibles, por lo que son el tipo de análisis en que se basa la legislación (BOE, 1991).

El recuento de viables totales (TVC) representa al número total de bacterias capaces de formar una colonia (unidades formadoras de colonia –UFC-) a una temperatura dada. Aunque es un parámetro muy utilizado, difícilmente será un buen indicador del deterioro, teniendo en cuenta el papel de las “bacterias específicas del deterioro y que no existe correlación con la presencia de cualquier bacteria que afecte a la salud pública. En cambio puede ser útil para comparar el grado general de contaminación bacteriana o en nivel de higiene aplicado durante su manipulación (Huss, 1995). El sustrato más utilizado para los recuentos totales continúa siendo el agar para recuento en placa (ARP), del inglés “plate count agar” (PCA). Comúnmente se realizan dos tipos de recuentos totales: de mesófilos (30 °C; 72h) y de psicrófilos (15 °C, 5 días). El primero de ellos es irrelevante, según algunos autores, para productos pesqueros mantenidos a temperaturas de refrigeración (Huss, 1995), sin embargo es el que se

utiliza para determinar los límites de carga microbiológica establecidos a nivel nacional (Orden 2/8/1991, B.O.E. 15/8/91) e internacional (ICMSF, 1986). La normativa española establece también un valor máximo de enterobacterias, dado que estas son un indicativo de las condiciones higiénicas del medio donde vivió el pez o fue sacrificado, del manejo y del procesado del producto (Kostaki *et al.*, 2009). Otras bacterias peligrosas como *Salmonella sp*, *Shigella sp* o *Staphylococcus aureus* están también controladas por la regulación española. El recuento de bacterias específicas del deterioro es una tarea difícil pues se debe estudiar su implicación en el deterioro de la calidad del pescado para cada especie.

1.3.4.4. Métodos sensoriales

El análisis sensorial del pescado es de gran utilidad, debido a que revela diferencias en características sensoriales que sólo pueden ser medidas significativamente por humanos. Existen instrumentos que pueden medir algunas de ellas como por ejemplo los texturómetros o la “nariz artificial” (Nanto *et al.*, 1993), pero a menudo producen peores resultados que un panel de jueces entrenados. La capacidad de cada persona para discernir entre colores, olores y sabores varía mucho en función del individuo, además de la homogeneidad de respuesta a los estímulos. Por tanto, el entrenamiento y selección de jueces es imprescindible para una buena valoración sensorial.

1.3.4.4.1. Evaluación en pescado fresco

La evaluación sensorial en la industria pesquera ha sido siempre esencial a la hora de determinar la frescura de los productos, siendo la apariencia externa, el olor y el color características muy importantes en el control de calidad (Olafsdottir *et al.*, 2004). En el caso del pescado de origen extractivo es difícil controlar con cierto grado de repetibilidad la calidad inicial del producto, pero con el cultivo de peces la variabilidad de la calidad del pescado fresco queda en gran medida reducida.

El primer método detallado para el análisis sensorial en pescado fresco fue el sistema Torry, desarrollado en Escocia por “Torry Research Station” (Shewan *et al.*, 1953), cuya idea fundamental era que cada parámetro de calidad valorado fuera independiente del resto. Posteriormente, el esquema fue modificado de forma que se

asignaba una puntuación a un amplio rango de características. Actualmente, para el pescado entero, la regulación de la Comunidad Europea establece el sistema de clasificación de calidad de la UE, desarrollado por Howgate *et al.* (1992). Existen tres niveles de calidad en el esquema UE: E (extra), A y B; donde E corresponde a la mayor calidad y por debajo del nivel B el producto no es apto para el consumo humano. El inconveniente de este método es que se basa en parámetros generales, y no considera las diferencias entre especies.

Algunas iniciativas han puesto en práctica un nuevo método llamado Método del Índice de Calidad (QIM, por la nomenclatura inglesa de Quality Index Method). Este método fue originalmente desarrollado por la “Tasmanian Food Research Unit” (TFRU) (Bremner, 1985) y ha sido estandarizado ya para diversas especies (Jonsdottir, 1992; Huidobro *et al.*, 2000; Martinsdóttir *et al.*, 2001). Consiste en la valoración de los parámetros sensoriales significativos del pescado crudo mediante un sistema de puntuación de grados deméritos. Las puntuaciones asignadas a cada característica sensorial se suman para obtener un único valor que es el índice de calidad, de forma que cuanto mayor es este índice, mayor es el grado de deterioro. Se establece por tanto una relación lineal entre la calidad sensorial y el tiempo de almacenamiento, que permite predecir la vida útil del producto, fijando una puntuación máxima cuando el pescado es rechazado por evaluación sensorial o tras determinarse el tiempo máximo de almacenamiento.

1.3.4.4.2. Evaluación en pescado cocinado

El análisis sensorial es el examen de las propiedades organolépticas de un producto realizable con los sentidos (UNE 87-001-94). En concreto en el control de calidad de un producto pueden emplearse pruebas discriminativas y/o descriptivas según el objetivo que se persiga. En ambos tipos de pruebas es necesario disponer de un panel de catadores entrenado según el objetivo del análisis y el producto que se vaya a evaluar. El análisis discriminativo sirve para detectar si hay o no diferencias entre dos o más muestras. Son normalmente utilizados para determinar el efecto en la calidad del producto de algún tratamiento incorporado en la elaboración o almacenamiento de las materias primas. En el caso del análisis descriptivo, se pretende identificar cuáles son las diferencias y con que intensidad se producen (Ibáñez y Barcina, 2001), y pueden

emplearse para valorar un solo atributo de textura, sabor o apariencia, o para realizar una descripción completa del producto. Cuando se evalúa más de un atributo, se elabora un perfil sensorial del producto mediante la selección de los descriptores que serán posteriormente cuantificados. Este tipo de análisis es conocido como Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA, del inglés “Quantitative Descriptive Analysis”) específicamente para este producto.

1.4. Las plantas aromático-medicinales

Según Muñoz (1987), plantas medicinales son aquellas que producen los llamados principios activos, sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre un organismo vivo. Las plantas aromático-medicinales serían aquellas, dentro de las anteriores, cuyos principios activos están constituidos, principal o parcialmente por esencias o compuestos fenólicos. Las esencias suelen ser compuestos terpénicos, formados por cadenas largas que tienen como base el isopreno. Debido a que los isoprenos tienen muchas formas posibles de unirse, la variabilidad de estos compuestos es muy alta y también sus actividades y propiedades.

La producción y el comercio de este tipo de plantas y sus productos mueven millones de euros alrededor del mundo. En 1999 la venta de suplementos naturales superó los 15 billones de dólares, de los cuales 7 billones fueron en Europa (Raskin, 2002). En todo el mundo se conocen aproximadamente 1.340 plantas como potenciales fuentes de componentes antioxidantes y antimicrobianos (Gould, 1996).

1.4.1. Usos históricos

Las plantas medicinales se han utilizado prácticamente desde los inicios de la humanidad. Existen evidencias de su uso por parte de los neandertales con fines médicos. El hombre las usó inicialmente a imitación de los animales, después empíricamente y más tarde de forma racional, conociendo sus propiedades terapéuticas de forma progresiva. En papiros de hace más de 4000 años ya se citan una serie de drogas, como prepararlas y su cultivo. Griegos y romanos ya escribían catálogos de plantas medicinales y la Biblia es un buen ejemplo de la constancia que hay de su uso desde hace más de 2000 años. En cuanto a la destilación de plantas aromáticas, se practica en Asia desde hace milenios, pero en el Mediterráneo fueron los árabes los que

la perfeccionaron durante la Edad Media, favoreciendo el desarrollo de la farmacia. En el siglo XIII ya se vendían aceites esenciales, siendo el de romero uno de los primeros aislados. En el siglo XV se conocían las esencias de almendras amargas, espliego, canela, ginebra, rosa, salvia, lavanda y otras más. En el siglo XVII ya se habían aislado prácticamente todas las esencias de Europa y Oriente próximo. En el siglo XIX se comenzaron a realizar análisis de las esencias y principios activos de vegetales. El desarrollo del microscopio y la química analítica ayudaron a su estudio y al nacimiento de la farmacoquímica. Los extractos y hojas de plantas aromáticas han sido utilizados desde la antigüedad con fines culinarios y medicinales pero en el siglo XX se han descubierto gran cantidad de propiedades antes desconocidas o simplemente intuitas. A partir de los estudios realizados por Chipault *et al.* (1952, 1955), aumentó el interés y el estudio de las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y medicinales de los distintos tipos de extractos de plantas, existiendo hoy en día una amplia información acerca de los compuestos existentes en ellos.

1.4.2. Principios activos y principales utilidades.

Algunos de los principales principios activos encontrados en plantas aromáticas son los heterósidos, los alcaloides, los aceites esenciales, los terpenos, los taninos, los flavonoides, algunas vitaminas y minerales. Los heterósidos están formados por un glúcido y un cuerpo activo no azucarado como es el caso de la isocutelarina 7-O-glucósido del romero o el salicósido precursor de la aspirina. Los alcaloides son compuestos nitrogenados de química compleja y de gran interés médico, algunos ejemplos son la nicotina y la morfina. Los aceites esenciales son segregados por las plantas mediante tricomas glandulares o canales y contienen gran cantidad de compuestos, principalmente fenólicos. Los terpenos están entre estos compuestos y están formados por asociaciones de moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), por lo que son llamados también isoprenoides. Cuando los terpenos son modificados por oxidación o reorganización del esqueleto hidrocarbonato se llaman terpenoides. Los principales compuestos activos del romero y del tomillo pertenecen a los isoprenoides, como también las vitaminas A, E, y K.

Las plantas aromático-medicinales tienen gran cantidad de utilidades de acuerdo a los compuestos activos que poseen. Con el paso del tiempo el rango de aplicaciones se

va ampliando y haciendo más específico, debido a la importante investigación actual en este campo. Actualmente se conocen una serie de aplicaciones y beneficios que se resumen en la Figura 15.

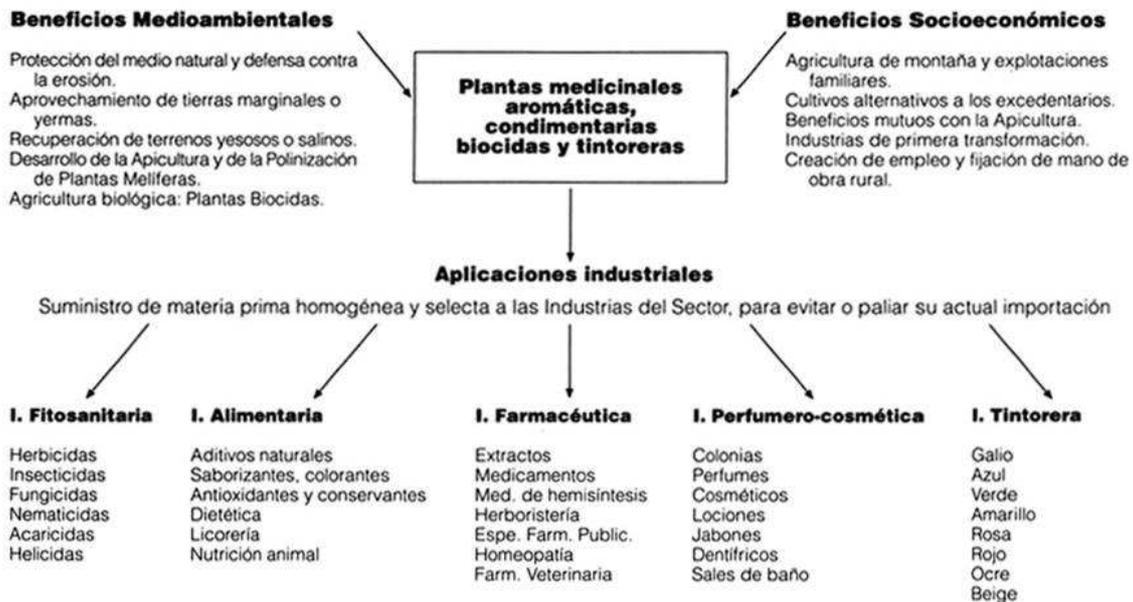


Figura 15. Beneficios y aplicaciones industriales de plantas con principios activos (Muñoz, 1987).

1.4.3. Plantas aromático-medicinales en la Región de Murcia

El Sureste Español está considerado uno de los territorios con mayor cantidad de especies nativas de plantas aromáticas, destacando las provincias de Murcia y Almería. Esto se debe a su climatología subárida y a la gran diversidad de hábitats. La compleja orografía que rodea a la Región (Cordilleras Béticas) hace que el viento de poniente llegue seco por el efecto Fohen, mientras que la proximidad del mediterráneo suaviza las temperaturas en la costa pero hace que sean comunes las precipitaciones torrenciales. Entre las plantas aromáticas de la Región las de mayor importancia social y económica son las labiadas, por la gran cantidad de especies con interés industrial. Ya en los años 80-90 había en la Región de Murcia unas 2.500 hectáreas de cultivo de estas plantas (Alcaraz *et al.*, 1989) y en la actualidad se está estudiando su diversificación tanto en cuanto a tipos de cultivo como en cuanto a aplicaciones industriales.

1.4.3.1. Romero



Figura 16. *Rosmarinus officinalis* en fase de floración.

El género *Rosmarinus* se encuentra dentro de la familia de las labiadas y comprende tres especies: *Rosmarinus officinalis*, *Rosmarinus eryocalix* y *Rosmarinus tomentosus*. Su distribución es circummediterránea, principalmente en el Mediterráneo occidental, pero presente de forma natural en ciertos enclaves desde Crimea hasta las islas Azores. También se puede encontrar creciendo salvaje en algunos puntos de América central y Sudamérica. Su hábitat fundamental son laderas soleadas de zonas semiáridas en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 1500 metros (Font Quer, 1981). El romero se adapta muy bien a suelos pobres y forma parte de los matorrales que aparecen en suelos secos de encinar y pinar, pero también en zonas degradadas por la quema o la tala. Por tanto, esta planta juega un papel muy importante en la recuperación del bosque mediterráneo tras catástrofes ambientales.

Rosmarinus officinalis es la especie más común y utilizada, de hecho las otras dos se encuentran entre las especies amenazadas de la lista roja de flora vascular y su hábitat reducido a zonas concretas del sureste ibérico y norte de África (Moreno, 2008). Se trata de un arbusto perenne, con tallos erectos y que puede llegar a medir de forma ocasional cerca de 2 metros (Figura 16). Sus hojas son simples, enteras, de lineares a lanceoladas y revolutas. Están cubiertas de tricomas, algunos de ellos glandulares y principalmente en el envés (Figura 17). Sus flores se agrupan en inflorescencias y tienen

la estructura típica de las labiadas con cáliz bilabiado y acampanado. La corola es de color morado, violeta, azulado o blanco con manchas coloreadas (Morales, 2010).

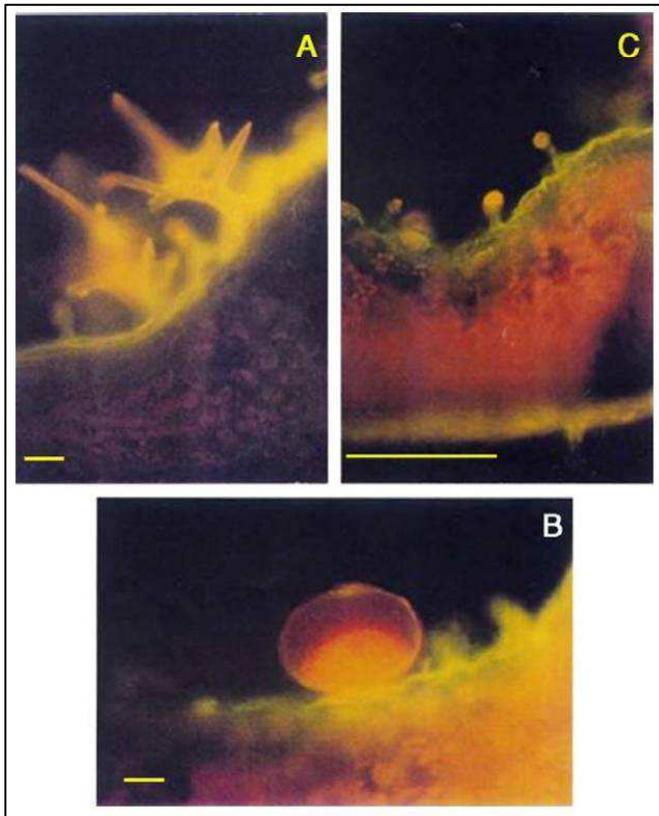


Figura 17. Tricomas en hojas de *Rosmarinus officinalis*: (A) tricoma no glandular, bar = 100 μ m; (B) tricomas peltados, bar = 100 μ m; (C) tricomas capitados, bar = 1000 μ m; (Marín *et al.*, 2006).

Aunque tradicionalmente su nombre fue interpretado como proveniente del latín *ros marinus* o rocío marino, se ha propuesto que proviene del griego *rophi myrinos* o arbusto aromático lo cual describe mejor sus características (Morales, 2010). Los principales usos históricos del romero han sido el aromático, el medicinal y el culinario. El romero ha estado relacionado con la religión, con el amor, el matrimonio, el nacimiento y la muerte. En Inglaterra y Alemania se considera un símbolo de recuerdo y todavía se utiliza en ramos de novia o en la cuna de los niños recién nacidos para protegerlos de energías negativas. También se usa tradicionalmente para proteger los libros y la ropa de las polillas. Su utilización es generalizada en todo el mundo y está siendo estudiado en muchos campos de la ciencia médica y biológica por sus propiedades beneficiosas. Cada vez se utiliza menos la recolección para abastecer el mercado y son muchos los países en que se cultiva, principalmente en Rusia, Inglaterra, Francia, España, Portugal, la península balcánica, Túnez, China, Australia y, dentro de los Estados Unidos, en el estado de California (Morales, 2010). Existen grandes diferencias intraespecíficas en el rendimiento y la calidad del aceite esencial del romero.

Los factores intrínsecos, especialmente la herencia genética (Zaouali *et al.*, 2012.) y/o la fase de desarrollo de la planta cuando se cosecha (Jordán *et al.*, 2013), además de los factores extrínsecos, tales como condiciones de suelo y clima (Brewer *et al.*, 2011) explican este elevado grado de variabilidad en la calidad y potencia del aceite.

Históricamente se han utilizado las hojas de la planta directamente o su aceite esencial, obtenido mediante alambiques tradicionales. Sin embargo el aceite esencial tiene muy bajas concentraciones de algunos conservantes muy activos que sí se presentan en la planta o en extractos metanólicos o acuosos. Algunos de estos compuestos son carnosol, ácido carnósico, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, rosmariquinona y ácido rosmarínico (Figura 18).

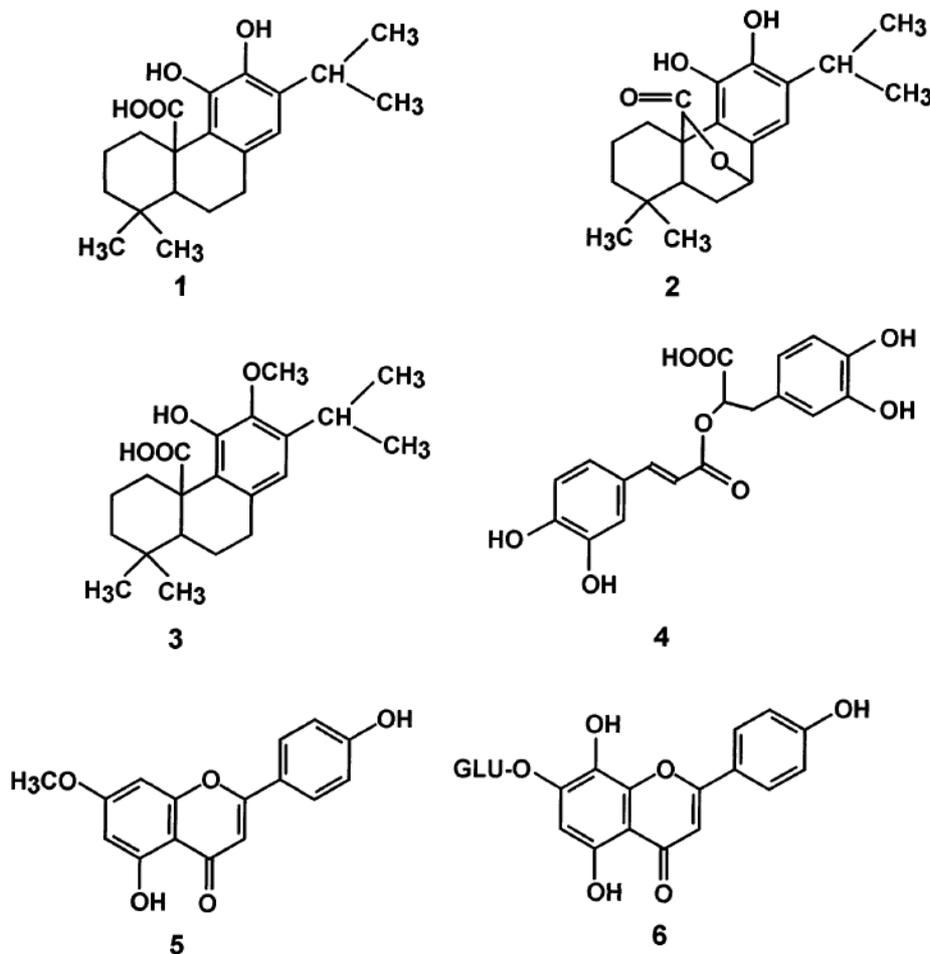


Figura 18. Compuestos fenólicos activos aislados de romero (*Rosmarinus officinalis*) mediante extracción con metanol; ácido carnósico (1), carnosol (2), ácido 12-O-metilcarnósico, ácido rosmarínico (4), genkwanina (5) e isoescutellareina 7-O-glucósido (6) (del Baño *et al.*, 2003).

Mediante la extracción con metano, acetona o agua se pueden obtener los principales diterpenos presentes en el romero. La extracción con metanol produce un extracto rico en ácido carnósico y carnosol en proporción 1:1, tras lo cual se puede aumentar la concentración de carnosol mediante sucesivas extracciones con acetona y agua. Por otro lado, el extracto acuoso de romero es rico en ácido rosmarínico e isocutelarina 7-O-glucósido (del Baño, 2003). Todos estos compuestos han demostrado tener una gran actividad antioxidante, sobre todo el ácido rosmarínico, el ácido carnósico y el carnosol. Además de esto se han descubierto recientemente otras propiedades en estos compuestos: varios de ellos son anticancerígenos, antiinflamatorios, immunoestimulantes y estimuladores del metabolismo lipídico, pudiendo ser en un futuro promotores de fármacos naturales.

1.4.3.2 Tomillo

Las plantas conocidas en todo el mundo como “tomillos” corresponden al género *Thymus*, uno de los ocho más importantes en número de especies (215) dentro de la familia de las labiadas. Se trata de plantas aromáticas que se han usado tradicionalmente con fines medicinales y culinarios en casi todas partes del mundo. El género *Thymus* es muy frecuente en la región mediterránea con unas 110 especies, formando comunidades de matorral llamadas tomillares junto con otras plantas de los géneros *Sideritis*, *Satureja*, *Salvia* o *Lavandula*.

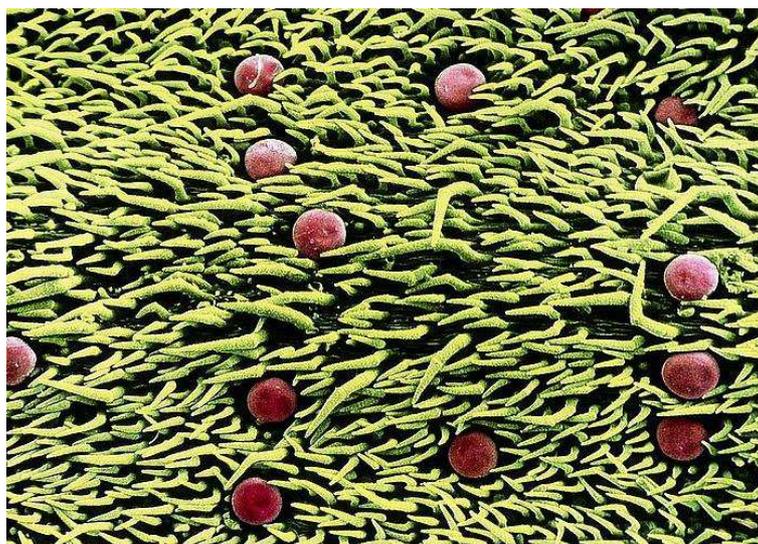


Figura 19. Tricomas glandulares esféricos y no glandulares de tomillo (www.sciencephoto.com)

Existen dos grupos diferenciados: plantas rastreras a menudo con ramas enraizantes como en los géneros *Serpyllum* o *Hyphodromi* o plantas arbustivas que son las que aparecen en el sur y el sureste peninsular. Al igual que otras plantas aromáticas, se caracterizan por tener tricomas glandulares (Figura 19) que contienen aceites esenciales los cuales son liberados al romperlos y producen su olor característico.

Los tomillos son plantas heliófilas que pueden vivir sobre rocas o suelos poco evolucionados, pero sobre todo, deben ser suelos bien drenados. Debido a la gran diversidad de especies dentro del género *Thymus* y su amplia distribución, sus hábitats son muy variados. Los podemos encontrar desde zonas circumpolares en Groenlandia con temperaturas por debajo de los 0°C durante gran parte del año hasta zonas subdesérticas con escasez de agua y temperaturas extremadamente altas. Las especies encontradas en el Sureste peninsular tienen una gran resistencia a condiciones extremas de temperaturas altas y precipitaciones escasas, en parte debido a sus pequeñas hojas aciculares densamente cubiertas de tricomas. La producción de aceites esenciales puede ser una estrategia adaptativa ya que la atmósfera saturada producida por los compuestos volátiles hace más difícil la evaporación de agua (Morales, 2002).

Podemos encontrar varias explicaciones sobre el origen del nombre “tomillo”. Algunos autores sugieren que proviene del griego *thyo* (perfume), mientras que otros lo achacan a la palabra griega *thymos* que significa coraje o fuerza. Para los griegos, el tomillo era símbolo de gracia y elegancia, utilizaban la expresión de “oler como el tomillo” como símbolo de placer. Los egipcios lo usaron para embalsamar a sus difuntos y los soldados romanos tomaban baños con tomillo para adquirir vigor. En la edad media, los caballeros llevaban motivos de tomillo bordados en sus telas para darles coraje antes del torneo de justas. Durante las grandes epidemias de peste en Europa, se pensaba que el tomillo ofrecía cierta protección, por lo que se quemaban en el interior de las estancias para limpiar el aire. El tomillo también estaba asociado con la muerte y con la magia. En las tumbas de Gales se plantaba tomillo desde antiguo y existía la creencia de que plantando un lecho de tomillo en el jardín se atraía a la hadas y era posible verlas. Mas recientemente, en la I Guerra Mundial, se usaba como antiséptico y

en la actualidad se utiliza en líquidos conservantes, sobre todo antifúngicos para preservar especies botánicas (Figueredo *et al.*, 2008)

En la Región de Murcia se pueden encontrar dos especies de tomillo de cierto valor económico, social e histórico que han sido estudiadas durante la realización de esta Tesis Doctoral: *Thymus zygis* subespecie *gracilis* (Figura 21) y *Thymbra capitata* (Figura 22).

1.4.3.2.1. *Thymus zygis* subespecie *gracilis*.

El tomillo salsero (*Thymus zygis*) es abundante en la península ibérica y comprende tres subespecies. La subespecie *gracilis*, de gran interés en nuestra Región, crece en el sureste de España y norte de África, estando principalmente representado en Andalucía oriental, Albacete y Murcia (Figura 20). Las otras dos subespecies también se encuentran en España pero en zonas diferentes. La subespecie *sylvestris* aparece en el centro y oeste peninsular, mientras que la subespecie *zygis* aparece en la mitad norte. *Thymus zygis* florece de mayo a julio y crece en zonas soleadas desde el nivel del mar hasta 2.000 m.s.n.m., sobre todo tipo de sustrato, desde arenas hasta calizas, aunque deben ser suelos muy bien drenados.

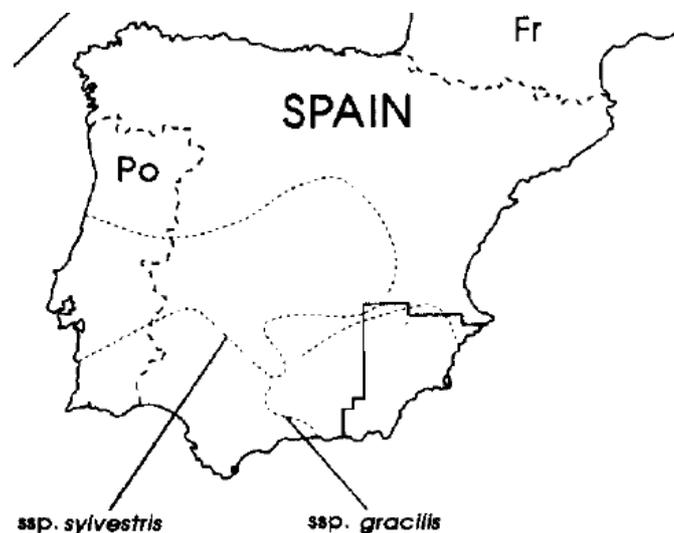


Figura 20: Distribución geográfica de las dos subespecies de *Thymus zygis* que abundan en el sur de España (Sáez, 1995)

El tomillo rojo (*Thymus zygis* subsp. *gracilis*) es la especie de mayor valor económico y la más comercializada en España, destilándose para extraer su aceite esencial o comercializándose como hoja para alimentación. El aceite esencial de este

tomillo tiene, por lo general, como componente mayoritario el timol y por eso es el tomillo español más apreciado y cultivado. Existe otro quimiotipo con linalol como componente mayoritario pero es menos abundante (Morales, 1986). Estudiando las poblaciones del sureste peninsular, se ha demostrado que existen ciertas correlaciones de la producción de fenoles con características bioclimáticas, favoreciendo su producción las altitudes bajas y los climas cálidos y secos (Sáez, 1995).



Figura 21: Tomillo rojo (*Thymus zygis* subsp *gracilis*) en floración.

1.4.3.2.2. *Thymbra capitata*



Figura 22. Tomillo andaluz (*Thymbra capitata*) en floración.

Esta especie de tomillo no pertenece al género *Thymus* sino al género *Thymbra*, también dentro de la tribu *Menthae*. Tradicionalmente se ha incluido entre los tomillos y

de hecho sus principales nombres comunes son tomillo andaluz, tomillo aceitunero o tomillo cabezudo. También recibe en ocasiones el nombre de orégano español, ya que posee un alto contenido en carvacrol, como el orégano. Al igual que *Thymus zygis*, es un arbusto pequeño con ramas erectas y leñosas. Sus hojas son aciculares y glabras, cubiertas de tricomas. Sus flores se encuentran en inflorescencias redondeadas y densas características de este tomillo. Tienen la forma básica de las flores de labiadas aunque con 20-22 nervios, lo que la diferencia de la mayoría de especies de *Thymus* (Bayer , 1989).

Crece por lo general en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 600m, en laderas soleadas, frecuentemente en bosques de pinos, y se puede encontrar en el sur de España y de Italia, norte de África y otros países cálidos mediterráneos. Se pueden identificar tres quimiotipos principales: timol, carvacrol y timol/carvacrol. El más frecuente en el sur de España y el más estudiado es el quimiotipo carvacrol pero en otras zonas del Mediterráneo como el sur de Italia o en Oriente Próximo predomina el quimiotipo timol. Miceli *et al.* (2006) estudiaron la composición de su aceite esencial encontrando los tres quimiotipos pero siempre siendo la cantidad de monoterpenos totales de un 78%. Varios autores han observado escasas diferencias en la composición del aceite esencial en función del clima y de la edafología del terreno, por lo que esta especie parece ser menos dependiente que otras de las condiciones ambientales para la producción del aceite esencial (Bakhi *et al.*, 2013).

1.5. Propiedades y aplicaciones de las plantas aromático-medicinales en la industria agroalimentaria.

1.5.1. Propiedades intrínsecas

1.5.1.1. Actividad antioxidante

De las propiedades que poseen los extractos y aceites esenciales de plantas aromáticas, la capacidad antioxidante ha sido la más estudiada. Se han realizado numerosos estudios en los que se demuestra la actividad antioxidante del romero y del tomillo (Chipault *et al.*, 1952; Farag *et al.*, 1989; Baratta *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 2001; Sáenz-López *et al.*, 2002).

En el extracto de romero están bien caracterizados los compuestos con actividad antioxidante y se conocen varios procesos para su extracción a partir de la planta (Chang *et al.*, 1977). Entre las moléculas descritas en el extracto de romero hay varios diterpenos fenólicos, destacando el ácido carnósico y sus derivados el carnosol, el rosmanol, el epirosmanol, el 7-metil-epirosmanol y el carnosato de metilo, más abundantes en la fracción liposoluble. También se han descrito flavonoides como la genkwanina, la hispidulina-O-glucósido, la crisimaritina, la luteolina y la isocutelarina 7-O-glucósido, y otros compuestos fenólicos como el ácido cafeico y el ácido rosmarínico, este último componente principal de la fracción hidrosoluble (del Baño *et al.*, 2003). Nakatani & Intani (1984) y Houlihan *et al.* (1984, 1985) ya evidenciaron la presencia en la oleoresina de romero de compuestos con una actividad antioxidante hasta 4 veces superior al BHA y equiparable a la del BHT. En un estudio comparativo con extractos comerciales, Cuvelier *et al.* (1996) demostraron que los compuestos más activos fueron el carnosol, el ácido rosmarínico y el ácido carnósico.

Para el estudio de la capacidad antioxidante de compuestos o extractos complejos es importante tener en cuenta el medio en el que se lleva a cabo, ya que por lo general los resultados no son extrapolables (Frankel, 1998). Wada & Fang, (1992), estudiaron la actividad antioxidante de extracto de romero en aceite de sardina con o sin α -tocoferol, observando que la mezcla de ambos tuvo una capacidad antioxidante comparable al BHA y que tenían un efecto sinérgico. Posteriormente estudiaron el efecto de estos extractos en aceite de sardina y sobre mioglobina y hemoglobina (Fang & Wada 1993) atribuyendo al extracto de romero una fuerte capacidad protectora sobre el α -tocoferol añadido y el grupo “hemo” de las proteínas citadas.

La actividad antioxidante del aceite esencial de tomillo es comparable a la del α -tocoferol y el BHT (Miguel *et al.*, 2004). Muestra una gran capacidad para secuestrar radicales libres e inhibe la oxidación lipídica inducida por Fe^{+2} (Bozin *et al.*, 2006). Aunque el aceite esencial al completo es más efectivo que cualquiera de sus componentes, se han estudiado sus compuestos activos por separado y se han ordenado por capacidad antioxidante: timol > carvacrol > γ -terpineno > mirceno > linalol > p-cimeno > limoneno > 1,8-cineol > α -pineno. (Youdim *et al.*, 2002). Esta actividad parece estar relacionada con la presencia de anillos aromáticos y el número y

disposición de los grupos hidroxilo. El timol y el carvacrol son isómeros que sólo difieren en la disposición del grupo -OH.

1.5.1.2. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana también juega un papel muy importante en la conservación de alimentos ya que, junto con la oxidación lipídica, la proliferación de microorganismos es un proceso determinante del deterioro de los alimentos en refrigeración. Los aceites esenciales de plantas aromáticas tienen un gran potencial como agentes antimicrobianos de uso alimentario. Además, su actividad antimicrobiana puede ser aprovechada como conservantes de alimentos y como agentes profilácticos y terapéuticos, alternativos a los antibióticos, en la producción de animales para consumo humano (Ivanovic *et al.*, 2012). Existen gran cantidad de compuestos antimicrobianos obtenidos a partir de plantas aromáticas, y se sigue una continua búsqueda y estudio en este sentido, siendo las labiadas objeto de muchos estudios. Entre ellas, el romero y el tomillo contienen gran cantidad de estos compuestos cuya actividad se describe a continuación.

En cuanto a la actividad antimicrobiana del romero, el 1,8 cineol, el α -pineno y el alcanfor son los compuestos más activos. Davidson (1993) observó mayor actividad de los compuestos polifenólicos no polares del romero sobre bacterias gram-positivas que sobre las gram-negativas. Estos compuestos pueden actuar afectando a la membrana celular, a su composición en ácidos grasos e incluso interactuar con proteínas de membrana, causando cambios en su estructura y funcionalidad (Fung *et al.*, 1977). La actividad antimicrobiana del extracto completo de romero depende en gran medida del método de extracción, siendo la técnica de fluidos supercríticos la más efectiva. Este extracto tiene menor efectividad que el de tomillo y mayor que la salvia sobre varias especies de la familia *Enterobacteriaceae* y del género *Bacillus* (Ivanovic *et al.*, 2012).

El tomillo presenta una gran capacidad antimicrobiana, mayor que otros aceites de plantas aromáticas como el romero o la salvia. El timol y el carvacrol parecen ser los compuestos con mayor actividad antimicrobiana, actuando además de forma sinérgica (Ivanovic, 2012). La actividad de los aceites esenciales está favorecida por factores como bajo pH, baja temperatura y bajos niveles de oxígeno (Burt, 2004). En concreto,

el timol y el carvacrol muestran un marcado carácter hidrofóbico, por lo que se acumulan en la membrana plasmática de la célula bacteriana. De esta manera la desestabilizan, provocando la salida de elementos intracelulares y el cambio en el potencial de membrana, con el consiguiente deterioro y muerte de la bacteria (Shapiro & Guggenheim, 1995). Los alcoholes presentes en el aceite esencial de tomillo como el linalol también son activos frente a gran variedad de bacterias por su capacidad para desnaturalizar proteínas (Rota *et al.*, 2008).

1.5.2. Aplicaciones como conservante alimenticio mediante aplicación exógena

La aplicación de conservantes sobre los alimentos se viene usando desde antiguo para poder disponer de ellos durante mayor tiempo y en mejores condiciones de calidad sensorial y nutricional. La aplicación de conservantes en los alimentos de forma exógena tiene como ventajas su rapidez, bajo coste y control de las cantidades que llegan al consumidor. Dado que la función de los conservantes es mantener las características originales del alimento durante el mayor tiempo posible, en pescado se utilizan con dos objetivos principales:

- Evitar la autólisis o transformación de sus componentes principalmente por oxidación.
- Evitar el crecimiento bacteriano que produce cualidades indeseables.

Para evitar la oxidación lipídica, importante causa de deterioro del pescado, se utilizan de forma industrial antioxidantes sintéticos como el BHT, el BHA y otros naturales como tocoferoles y ácido ascórbico en el empaquetado. Estos últimos antioxidantes han demostrado una gran potencia en la inhibición de la peroxidación lipídica por el bloqueo de la propagación en cadena, la inhibición de la descomposición de hidroperóxidos y la inactivación de iones metálicos. Sin embargo, el BHT y el BHA han demostrado cierta capacidad carcinogénica en estudios de larga duración, o la alteración de la actividad de otros carcinógenos (Barlow, 1990). Es por ello que actualmente hay una tendencia a limitar y reducir su uso. La Comisión Europea estableció unos niveles máximos permitidos mediante tres directivas en 1995, atendiendo a los estudios realizados en animales (Ito *et al.*, 1985)

Para evitar el crecimiento bacteriano, se utilizan conservantes en principio inocuos para el ser humano como son el benzoato sódico, el nitrito sódico, el sorbato potásico y el lactato sódico. Sin embargo, la OMS establece unos límites aceptables de consumo diario para algunos de estos compuestos de 5mg/kg, por lo cual su seguridad a dosis altas no está comprobada (Vartiainen *et al.*, 2003). La ventaja de conservantes naturales, como pueden ser los aceites esenciales y los extractos de plantas aromáticas, es que son compuestos presumiblemente seguros y tienen menos limitaciones legales en su aplicación. La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) reconoce muchos aceites esenciales como “generalmente reconocidos como seguros” lo que autoriza para su uso en alimentos (Pokorny, 1991), mientras que eliminó de la lista ciertos antioxidantes sintéticos como el BHA (Shahidi, 1997). Además, están socialmente aceptados tanto por sus conocidas propiedades saludables, como por su uso común en la gastronomía tradicional.

1.5.2.1. Romero

El extracto de romero se ha estado estudiando desde hace décadas como aditivo para mejorar la estabilidad oxidativa de los alimentos. Barbut *et al.* (1985) comprobaron su actividad antioxidante en salchichas y después Stoick *et al.* (1991) lo hicieron en filetes de vacuno. Wong *et al.*, (1992) y Fernández-López *et al.* (2001) observaron una inhibición de la degradación de hemopigmentos y la formación de sabores indeseables. Wong *et al.* (1995), Wada & Fang (1992) y Fang & Wada, (1993) estudiaron la regeneración del α -tocoferol por algunos de los componentes del romero pudiendo ser utilizados como sustitutos del ácido ascórbico para potenciar la estabilidad de la vitamina E. En pollo se estudió la sustitución de terbutil-hidroquinona (TBQH) por oleorresina de romero en nuggets durante su almacén en refrigeración y en congelación, obteniendo resultados comparables (Lai *et al.*, 1991). En pavo cocinado al que se añadió extracto hidrosoluble de romero se observó un efecto protector frente a la oxidación lipídica y a la pérdida de color durante su almacén (Yu *et al.*, 2002).

También se ha estudiado su uso combinado con otros tratamientos en empaquetados de carne al vacío. Ntzimani *et al.* (2010) utilizaron aceite esencial de romero junto con EDTA y lisozima en pollo semi-cocinado envasado al vacío. El tratamiento conjunto alargó la vida útil en 7-8 días basándose tanto en datos

microbiológicos como sensoriales. El aceite de romero produjo un cambio en olor y sabor, pero fue aceptable y bien recibido por los panelistas. El aceite esencial de romero también se ha utilizado en carne de pavo envasada al vacío, aumentando su vida útil en refrigeración (2 °C) en 7-8 días (Vasilatos *et al.*, 2013).

La aplicación exógena del romero sobre pescado envasado se ha estudiado también por muchos autores. Estos estudios se han basado en almacenar el pescado fresco en congelación y en refrigeración o pescado cocinado de distintas formas, estudiando también la protección del romero durante el propio proceso de cocinado. Todos ellos han demostrado el efecto protector del extracto de romero frente a la oxidación lipídica y la reducción de varios índices de frescura. Varelziz *et al.* (1997) añadieron extracto de romero a pescado fileteado o triturado y almacenado en congelación durante 120 días. Los cambios en el índice de TBARS y de bases volátiles mostraron una menor oxidación en las muestras tratadas. Akhtar *et al.* (1998) realizaron un experimento con filete de trucha arcoíris rociado superficialmente con oleoresina de romero, que además había sido alimentada con pienso suplementado con α -tocoferol. Se estudió el almacén en refrigeración y en congelación. Las diferencias en los TBARS respecto al tratamiento control demostraron que tanto el α -tocoferol en la dieta como la aplicación externa de oleoresina de romero mejoraban la estabilidad oxidativa de los lípidos. Giménez *et al.* (2004) estudiaron el efecto del extracto de romero en pescado almacenado al vacío en refrigeración, junto con otro aspecto importante, las condiciones de iluminación. El extracto de romero redujo de forma eficiente la oxidación lipídica bajo cualquier tipo de iluminación (fluorescente o baja en ultravioleta), mientras que la actividad del ácido ascórbico se ve afectada por la luz fluorescente común en supermercados.

El departamento de tecnología del procesado de pescado de la Universidad de Cukurova (Turquía) ha trabajado con el extracto de romero en distintos aspectos durante los últimos años, realizando en conjunto una exhaustiva investigación sobre su uso en el procesado de pescado. En su primer trabajo en este aspecto (Ozogul *et al.*, 2009) estudiaron su efecto protector sobre los PUFAs de muestras de dorada cocinadas de varias formas (asadas, fritas y gratinadas), demostrando una menor oxidación durante el almacén en muestras tratadas y la ausencia de deterioro mediante el recalentamiento en horno convencional o microondas. Más tarde estudiaron el efecto de distintas dosis de extracto de romero sobre filetes de sardina almacenados en refrigeración y al vacío, esta

vez en un amplio rango de parámetros sensoriales, bioquímicos y microbiológicos (Ozogul *et al.*, 2010). Sus resultados mostraron una mejora de las características organolépticas con la adición de un 1% de extracto de romero, mientras que los mejores resultados bioquímicos se observaron con la dosis del 2%. Otro trabajo estudiando los mismos parámetros durante el almacén en congelación de filetes de sardina (Ozogul *et al.*, 2011) mostró resultados similares, observando la mejor calidad sensorial con la dosis del 1% ya que la dosis superior aportaba cierto sabor amargo. En varios estudios similares con dorada realizados por el mismo grupo de investigación observaron los mismos efectos que en los trabajos anteriores durante su cocinado y su almacén (Tokur y Özyurt, 2010; Özyurt *et al.*, 2011).

También estudiaron la adición de extracto de romero en el propio hielo que se añade al pescado durante su almacén (Özyurt *et al.*, 2012), observando una mejora en la calidad y seguridad del producto atendiendo a todo tipo de aspectos incluyendo la creación de aminos biógenos. Con anterioridad, Quitral *et al.* (2009) habían probado este sistema novedoso en jurel chileno con extracto de romero y extracto de orégano, indicando una mejor conservación mediante el análisis de indicadores del deterioro. Otra aplicación novedosa ha sido el uso conjunto de coberturas de quitosano y extracto de romero (Li *et al.*, 2012), alargando la vida útil del producto en 8-10 días.

También se ha estudiado el efecto de la aplicación exógena del extracto de romero en otras especies de agua dulce como el mangar (*Luciobarbus esocinus*) (Çoban y Özpolat, 2012) o la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Peiretti *et al.*, 2012)

Tras años de investigación se ha propuesto el uso de extracto de romero en alimentos como conservante y, de hecho, ya está regulado en la legislación europea como aditivo alimentario para productos ecológicos recibiendo el código E392 (Reglamento Europeo 344/2011). Además, la termorresistencia que ha demostrado (Hall *et al.*, 1962) y su buena actividad a temperatura ambiente (Wang *et al.*, 2011) lo hacen muy apropiado para incluirlo en comidas preparadas incluso antes del cocinado.

1.5.2.2. Tomillo

El aceite esencial de tomillo también ha sido muy estudiado como conservante en productos cárnicos y pescado, aún así la bibliografía al respecto es menos abundante

que para el romero y su regulación como aditivo a nivel europeo también. El-Alim *et al.* (1999) estudiaron el efecto del tomillo desecado y su extracto etanólico en carne de pollo durante su almacén y cocinado observando una mejor conservación durante el almacén y la protección de los lípidos durante el cocinado. Tanabe *et al.* (2002) compararon la actividad de 22 plantas o especias en carne de cerdo entre ellas el tomillo, que redujo la oxidación lipídica medida en TBARS. Miralles *et al.* (2008) realizaron un estudio en carne picada de vacuno, al que añadieron aceite esencial de tomillo y comprobaron una disminución de la oxidación en muestras suplementadas. También se han probado algunas aplicaciones más novedosas como la incorporación de aceite esencial de tomillo en recubrimientos comestibles de empanadillas de ternera ejerciendo un efecto antimicrobiano (Emiroğlu *et al.*, 2010).

El efecto del aceite esencial de tomillo sobre la conservación del pescado se ha estudiado principalmente como aditivo durante su procesado o envasado. La mayor parte de los estudios son de la última década y frecuentemente no explican los componentes principales del aceite. Esto hace difícil extrapolar los datos de los estudios dada la existencia de distintos quimiotipos dentro de cada especie que tienen aceites esenciales con una composición radicalmente distinta.

Harpaz *et al.*, (2003) añadieron aceite esencial de tomillo al 0,05% a lubinas asiáticas (*Lates calcarifer*) almacenadas enteras, mejorando su conservación en términos bacteriológicos y sensoriales. Mahmoud *et al.* (2004) estudiaron componentes aislados de aceites esenciales además de algunas mezclas, observando en el timol y el carvacrol la mayor actividad antimicrobiana y que la mezcla de ambos alargó la vida útil del filete de carpa en refrigeración en 8 días. Más tarde, Goulas & Kontominas (2007) estudiaron el efecto del aceite esencial de orégano en la calidad y vida útil de la dorada de una forma amplia atendiendo a aspectos bioquímicos y sensoriales. Las propiedades del aceite esencial de orégano se pueden relacionar con las de los aceites esenciales de tomillo de quimiotipo carvacrol, pues ambos comparten el mismo compuesto mayoritario. Las muestras tratadas alargaron su vida útil unos 5 días en refrigeración y atmósfera modificada, adquiriendo un sabor distinto pero agradable.

Selmi & Sadok (2008) aplicaron extracto de tomillo en atún (*Thunnus thynnus*) envasado al vacío con lo que se mejoró la conservación del mismo en refrigeración,

mostrando menores valores de TBARS y un perfil de ácidos grasos estable. En lubina se estudió la combinación de aceite esencial de tomillo con distintos tipos de atmósfera modificada y su aplicación sobre muestras de lubina en almacenamiento de forma aerobia (Kostaki *et al.*, 2009). En este último formato incrementó su vida útil en 3 días, igualando el efecto de un tipo de atmósfera modificada (40%CO₂/50%N₂/10%O₂). Esto demuestra que el efecto de la aplicación de aceite esencial de tomillo puede ser equiparable a otras técnicas industriales ampliamente establecidas.

En dorada se estudió la aplicación de extracto de tomillo en filetes almacenados en hielo por Attouchi & Sadok (2010), observando menores valores de indicadores de deterioro como NBVT, TMA y TBA y mejor capacidad de retención de agua. Además incrementó la vida útil en unos 5 días. Otros autores han realizado estudios similares atendiendo a aspectos bioquímicos, microbiológicos y sensoriales en otras especies (Erkan *et al.*; 2011; Alçiçek, 2011; Angis & Oguzhan, 2013). La menor efectividad de los aceites esenciales a bajas temperaturas y bajas concentraciones de oxígeno lo hace, posiblemente, menos útil que el romero para su uso en alimentos precocinados. Sin embargo, en peces no parece haber investigación en este sentido, como sí existe en modelos lipídicos o en otros animales (Murkovic *et al.*, 1998; Nieto *et al.*, 2011).

1.5.3. Aplicaciones como conservante alimenticio mediante aplicación endógena

La incorporación de un compuesto con actividad antioxidante al pienso puede tener una doble función, protegiendo, en primer lugar, a la propia grasa del pienso para después, el compuesto activo o alguno de sus metabolitos, actuar sobre la carne del animal. En acuicultura se utiliza desde hace tiempo la administración oral de vitamina E y carotenoides como precursores de la vitamina A, ya que han demostrado un efecto más completo y duradero que su aplicación exógena. En la actual tendencia de desarrollar alimentos orgánicos, naturales y seguros los extractos de plantas aromáticas están ganando importancia por su demostrada transmisión al músculo y la consiguiente actividad conservante en el mismo.

1.5.3.1. Romero

Se han realizado estudios mediante la suplementación del alimento con romero en varios tipos de animales terrestres. López-Bote *et al.* (1998) alimentaron pollos con

dietas a las que añadieron 500mg/kg de extracto de romero y observaron una mayor estabilidad oxidativa en carne cruda o cocinada, tanto en refrigeración como en congelación. En pavo se obtuvieron resultados similares con dosis de 5 y 10 g de romero (Govaris *et al.*, 2007), existiendo importantes diferencias en crecimiento bacteriano. También se ha estudiado el efecto de la suplementación de dietas de gallinas con romero, sobre la estabilidad oxidativa de los huevos mostrando un efecto beneficioso (Parpinello *et al.*, 2006; Florou-Paneri *et al.*, 2006). En ternera, O'Grady *et al.* (2006) suplementaron la dieta con una dosis de 1000 mg/animal/día y no observaron diferencias en cuanto a estabilidad oxidativa o propiedades sensoriales. Janz *et al.* (2007) tampoco observaron diferencias significativas en cuanto a estabilidad oxidativa y calidad sensorial al añadir oleoresina de romero al 0,05%, proponiendo el uso de dosis mayores. Moñino *et al.* (2008), utilizaron hojas de romero tras su destilación (subproducto de la producción industrial de aceite esencial) en un porcentaje del 10 y 20% de la dieta de cordero, lo que mejoró la capacidad antioxidante de la carne de acuerdo a indicadores como FRAP y DPPH. Nieto *et al.* (2010a) utilizaron las mismas dietas en cordero para luego medir indicadores del deterioro durante el almacén de la carne. Tanto indicadores fisicoquímicos (TBARS y color) como sensoriales (menor rancidez), así como los recuentos microbianos indicaron una mejor conservación independientemente de la dosis aplicada. También se comprobó la capacidad de estas dietas para mejorar la conservación de carne precocinada y recalentada o carne en atmósfera modificada (Nieto *et al.*, 2011, 2013). En cabra se ha observado que la utilización de las dietas produce una transferencia de compuestos aromáticos, principalmente diterpenos, a la carne y la leche del animal, mejorando su capacidad antioxidante y produciendo un alimento más saludable (Jordan *et al.*, 2007, 2010).

En peces se ha estudiado el efecto conservante del extracto de romero mediante suplementación en la dieta en tres especies: pacu (*Piaractus mesopotamicus*), lubina y dorada. Sant'Ana & Mancini-Filho (2000) añadieron 1,4 g/kg de extracto de romero a la dieta de pacu, observando un cierto efecto protector frente a tratamientos con radiación gamma. En lubina se observó una mejora del índice de calidad (QIM) y un aumento de un día en su vida útil al suplementar la dieta con 200 ppm de aceite de romero (Di Turi *et al.*, 2009) y en dorada se observó una mejora tanto en el índice de calidad como en distintos indicadores fisicoquímicos del deterioro (Álvarez *et al.*, 2012).

1.5.3.2. Tomillo

El uso del tomillo como conservante endógeno o dietético ya se estudió por Botsoglou *et al.* (1997) en huevos de gallinas alimentadas con dietas con tomillo, estudiando la estabilidad oxidativa de los lípidos. Además de observar una menor oxidación propusieron un efecto sinérgico del timol, el componente mayoritario, con el resto de compuestos presentes en el tomillo a partir de la actividad de algunos compuestos por separado. El aceite esencial de tomillo en la dieta de pollo también ha demostrado un efecto posterior en la carne en refrigeración, reduciendo la oxidación lipídica en un periodo de 42 días (Böyükbaşı *et al.*, 2006). Nieto *et al.* (2010b) suplementaron dietas para cordero con hojas de tomillo observando una mejoría en todos los indicadores del deterioro durante un periodo de almacén de 21 días. Los mejores resultados se observaron en el grupo que se alimentó con la dosis más alta (7,5% de hojas de tomillo). También estudiaron el efecto de estas dietas en cordero sobre la carne cocinada (Nieto *et al.*, 2011). Las hojas de tomillo destiladas, una vez extraído el aceite esencial, han demostrado conservar compuestos con actividad antioxidante al igual que sucede con el romero. La suplementación de dietas de cordero con un 10 y un 20% de estas hojas reduce la oxidación y los recuentos microbianos en la carne durante el almacén y mejoran ciertos aspectos como el color (CIEL_{ab}) y aspectos sensoriales (Nieto *et al.*, 2012).

En peces también se ha estudiado la adición de aceite esencial de tomillo, o alguno de sus componentes, en el pienso de peces, principalmente como inmunoestimulante o para mejorar ciertos aspectos fisiológicos (Navarrete *et al.*, 2010, Ahmadifar *et al.*, 2011; Giannenas *et al.*, 2012; Volpatti *et al.*, 2013; Yilmaz *et al.*, 2012). Sin embargo, su efecto como conservante en la calidad del producto mediante la aplicación endógena o dietética solo se ha estudiado de forma amplia en el estudio de Álvarez *et al.*, (2012). En este se utilizó aceite esencial de tomillo de dos especies distintas (*Thymus zygis* subsp. *gracilis* –quimiotipo timol- y *Thymbra capitata* – quimiotipo carvacrol-), el primero con un 55% de timol y el segundo con un 50% en carvacrol. Los resultados mostraron una mejora de la capacidad antioxidante en el músculo únicamente con el grupo al que se dio aceite quimiotipo timol, además este fue el que mayor actividad antimicrobiana desarrolló. En conjunto, la adición del aceite

esencial de tomillo rico en carvacrol aumentó la vida útil en un día y el aceite rico en timol en dos días.

1.5.4. Efectos sobre la fisiología del animal.

En animales terrestres se ha estudiado ampliamente el uso de aceites esenciales y extractos provenientes de plantas aromático-medicinales como promotores del crecimiento y de la salud de los mismos. Muchos de los resultados que aparecen en la bibliografía son difíciles de interpretar, ya que se suele omitir información sobre la composición de los aceites esenciales y extractos utilizados. En algunos casos esta falta de información se debe a que los estudios son promovidos por la industria de aditivos veterinarios que evita dar la composición exacta de sus productos.

El principal modo de acción de los aceites esenciales para promover el crecimiento y la salud de animales parece ser la modulación del ecosistema de la microflora intestinal. También se han encontrado otros efectos en animales terrestres que pueden proporcionar una mejor funcionalidad al intestino. Entre ellos está la reducción de la producción de toxinas bacterianas (Kroismayr *et al.*, 2008), la estimulación de las secreciones digestivas, la mejora de la actividad de enzimas como la tripsina o la amilasa (Lee *et al.*, 2003, Jang *et al.*, 2004, Platel & Srinivasan, 2004) y el retraso del vaciado gástrico (Manzanilla *et al.*, 2004). La estimulación de las secreciones digestivas y el mucus se ha atribuido a la posible irritación del epitelio intestinal, como se ha observado en humanos (Franz *et al.*, 2010). La cantidad de trabajos publicados sobre el uso de aceites esenciales en el alimento de animales, especialmente los que contienen timol y carvacrol entre sus componentes fenólicos ha crecido exponencialmente en los últimos años basándose la mayoría de ellos en parámetros de producción. En modelos animales como ratón o conejo se han observado gran cantidad de efectos fisiológicos de extracto de romero y aceites esenciales de tomillo que pueden tener alguna repercusión en la producción animal. Algunos de ellos son un efecto antidiabético (Bakirel *et al.*, 2008; Al-Jamal & Alqadi, 2011), hepatoprotectivo (Hoefler *et al.*, 1987; Romo Vaquero *et al.*, 2012), antiadipogénico (Gaya *et al.*, 2013) y antiinflamatorio (Nakhai *et al.*, 2006; Ocaña & Reglero, 2012)

En cerdo se han observado mejoras en el crecimiento de hasta el 9%, lo cual es comparable a los incrementos observados con antibióticos o probióticos que rondan un 4%. Además del tipo de aceite esencial, las condiciones de experimentación parecen tener un efecto importante en los resultados de crecimiento y aprovechamiento del alimento. En estudios con cerdo se obtuvo un incremento del crecimiento del 23% en condiciones de producción a gran escala, mientras que en otros trabajos con mayor higiene se han observado peores resultados (Franz *et al.*, 2010).

El uso de aceites esenciales de orégano, tomillo y mezclas comerciales, o extractos como el de pimienta, ajo o romero en aves de corral se ha estudiado ampliamente mostrando resultados contradictorios. En ocasiones no se han observado cambios en el rendimiento de los animales, mientras que algunos autores, utilizando extractos de ajo, tomillo o mezclas de aceites esenciales han observado una mejora del rendimiento y cambios en el intestino en cuanto a su morfología y su peso (Brenes, 2010). Alcicek *et al.* (2004) observaron una mejora en el crecimiento, la ingesta y el índice de conversión en pollos alimentados con dietas que contenían aceite esencial de romero, proponiéndolo como promotor del crecimiento. Cross *et al.*, (2007) también observaron una mayor ganancia de peso al suplementar la dieta con 1g/kg de aceite de tomillo (10% de timol y 7% de carvacrol), sin embargo no observaron cambios en el crecimiento al utilizar hojas de tomillo (10g/kg). Al utilizar extracto de tomillo en la dieta a una concentración de 5 g/kg en la dieta de pollos se observó un aumento de la ganancia de peso mientras que con la dosis de 10 g/kg se observó un aumento del colesterol HDL en sangre (Toghyani *et al.*, 2013), pudiendo ejercer algún efecto en el metabolismo lipídico. Además observaron un aumento del peso relativo del intestino mayor con dosis altas. Otros autores han encontrado el efecto contrario en el intestino de pollos al utilizar tomillo triturado (El-Ghousein & Al-Beitawi, 2009). Por lo general han mostrado mejor efecto los aceites esenciales que otros formatos y que los compuestos activos por separado (Franz *et al.*, 2010)

En peces, tras su demostrada utilidad como conservante exógeno, se ha estudiado el efecto de su inclusión en la dieta sobre distintos aspectos de rendimiento, la inmunidad y el estatus antioxidante.

Navarrete *et al.*, (2010) añadieron dosis crecientes (hasta 20 mg/kg) de aceite esencial de tomillo a dietas de trucha arcoíris para estudiar su efecto sobre la microbiota intestinal. Sin embargo el efecto fue nulo probablemente debido a las dosis excesivamente bajas.

Ahmadifar *et al.* (2011) alimentaron trucha arcoíris con dietas conteniendo un extracto de timol-carvacrol en dosis crecientes (0, 1, 2 y 3 g/kg). Observaron un mejor índice de conversión con las dosis de 2 y 3 g/kg y un aumento de linfocitos a dosis altas. Además el contenido corporal en lípidos fue mayor a dosis bajas y el contenido en proteína fue mayor con 3 g/kg de extracto.

Giannenas *et al.* (2012) estudiaron el efecto de dos extractos, uno rico en timol y otro rico en carvacrol, añadidos a la dieta, en el rendimiento, la microbiota intestinal y el estatus antioxidante de la trucha arcoíris. Ambos extractos mejoraron el índice de conversión y redujeron los recuentos de anaerobios. La suplementación de estos extractos en la dieta aumentó la actividad de enzimas con capacidad antioxidante y la de varios parámetros inmunológicos. Además, durante el almacén en refrigeración, la producción de TBARS fue menor para los peces alimentados con las dietas suplementadas con extractos.

Volpattiet *al.* (2013) estudiaron la capacidad inmunoestimulante del carvacrol en lubina añadiéndolo al pienso en cantidades de 250 mg/kg y 500 mg/kg. Aunque no afectó al crecimiento, la utilización del alimento o la biometría, el carvacrol afectó al sistema inmune reduciendo inmunoglobulinas y la actividad de la lisozima pero aumentando la fagocitosis y pinocitosis en macrófagos. Además de todo esto la suplementación del pienso con carvacrol mejoró la resistencia a la infección por *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum*.

Mediante la incorporación de tomillo, romero y fenogreco al 1% en la dieta de lubina (Yilmaz *et al.*, 2012) se observó que el tomillo produjo ciertos cambios fisiológicos. Mejoró la eficiencia de la proteína, el porcentaje de proteína del músculo y la eficiencia en la absorción de energía y proteína. Posteriormente observaron una reducción de los índices viscerosomático, hepatosomático y de grasa mesentérica a la vez que aumentó el peso del riñon y de la vesícula biliar (Yilmaz *et al.* 2013).

RESUMEN GLOBAL

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

España es el Estado miembro de la Unión Europea con un volumen mayor de producción en acuicultura, con un 21,5% del total, aunque en valor de producción ocupa el cuarto lugar con un 11,9% del total. En el 2012 la producción de peces en Murcia alcanzó un valor de 8.760 toneladas, ocupando la segunda posición a nivel nacional por detrás de la Comunidad Valenciana. Se trata por tanto de un sector de gran importancia económica y en expansión. El engorde de dorada comenzó en la Región de Murcia en el año 1991 con una producción de 5 toneladas y ha experimentado un gran crecimiento alcanzando un máximo de 6.510 toneladas en 2009, que tras la crisis económica y del sector ha caído hasta las 3.880 toneladas en 2012. En el momento actual, la sostenibilidad del sector pasa por mejorar la rentabilidad de las explotaciones y para ello se necesita aumentar los ingresos tanto en cuanto a incremento de la producción como al precio de venta, siendo de capital importancia en ambos casos aumentar la confianza de los consumidores a través de la calidad garantizada del producto.

Los peces son un alimento altamente nutritivo, ya que presentan un porcentaje elevado de proteínas con un alto valor biológico para el ser humano. Los peces también contienen micronutrientes tales como yodo, selenio y vitaminas liposolubles (A y D) con efectos positivos en la salud humana. Además, son una fuente muy buena de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de los que son sobradamente conocidos sus efectos beneficiosos. Son precisamente los contenidos en ciertos ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (20:5 n-3, ácido eicosapentaenoico-EPA, y 22:6 n-3, ácido docosahexaenoico-DHA) y el balance entre los ácidos grasos n-3 y n-6 lo que hacen del pescado un alimento altamente saludable. Una de las ventajas de la acuicultura frente a la pesca extractiva es la posibilidad de controlar el producto y conseguir, mediante la aplicación de las nuevas tecnologías, una constante mejora en la calidad tanto desde el punto de vista nutricional como sensorial.

El pescado es uno de los productos alimenticios más perecedero debido a su composición química. Los fenómenos de autólisis tras la resolución del *rigor mortis* y la posterior degradación bacteriana, así como la peroxidación de los lípidos provocan la aparición de olores y sabores extraños, la alteración del color y en general una reducción de la calidad sensorial del alimento. También se produce una disminución de su valor nutritivo y la generación de compuestos potencialmente nocivos para la salud que se han relacionado con el riesgo de padecer diversas patologías.

El uso de antioxidantes es un camino efectivo para minimizar o prevenir la oxidación de los alimentos, retrasando la formación de productos tóxicos de la oxidación, manteniendo la calidad nutricional y prolongando la vida útil. El creciente interés por encontrar antioxidantes naturales para utilizar en los alimentos ha llevado a la búsqueda de extractos de plantas ricos en polifenoles y otros compuestos con actividad antioxidante y antimicrobiana. Diversos estudios han demostrado que la suplementación dietética de los animales con conservantes naturales es muy eficaz, pues los compuestos activos son metabolizados y depositados convenientemente en las estructuras tisulares. En la actualidad, se encuentran cada vez más referencias bibliográficas de estudios sobre alimentación de animales terrestres con raciones suplementadas con aditivos naturales que presentan actividad antioxidante, con el objeto de mejorar las características productivas de los animales e incluso para transmitir las cualidades derivadas de dichos componentes a la carne, reduciendo la oxidación lipídica y produciendo una mejora en la aptitud bromatológica y sanitaria del producto.

Los antioxidantes naturales tienen un gran impacto en la seguridad y en la aceptación de un alimento. No sólo consiguen que el alimento sea más estable frente a la oxidación, sino que además pueden controlar de forma efectiva el crecimiento bacteriano. Al aumentar los niveles endógenos de antioxidantes a través del consumo por parte de los animales de dietas suplementadas, se están consiguiendo productos que el consumidor acepta de buen grado. Aún es necesario definir las combinaciones óptimas y los niveles mínimos en la dieta de estos compuestos necesarios para obtener la mayor estabilidad en el producto resultante.

Junto a lo anteriormente expuesto, el Sureste Ibérico tiene como característica muy significativa el poseer la flora espontánea más rica en plantas aromáticas de Europa. Esta realidad ha propiciado el asentamiento en la Región de Murcia de una importante industria transformadora y exportadora de plantas aromático-medicinales. Romero y tomillo son las especies más explotadas, destinando su uso fundamentalmente a la extracción de sus aceites esenciales y extractos antioxidantes. En relación al tomillo, es de destacar que la importancia económica del género *Thymus* radica tanto en su aceite esencial como en la producción de hoja seca, siendo España el productor del 90% de aceite esencial de tomillo que se comercializa en todo el mundo. El romero se ha utilizado históricamente para la obtención de su aceite esencial en alambiques

tradicionales, pero este aceite esencial es pobre en algunos de los compuestos que mayor actividad antioxidante han demostrado en las últimas décadas como son el ácido carnósico, el carnosol y el ácido rosmarínico. Actualmente se comercializan extractos que son ricos en ácido carnósico y carnosol y que han demostrado un amplio rango de aplicaciones.

En base a todo ello, el objetivo principal que se planteó en la presente Tesis Doctoral fue estudiar la incorporación de compuestos naturales en el pienso de dorada, como estrategia para incrementar la estabilidad oxidativa del pienso y posiblemente la del pescado.

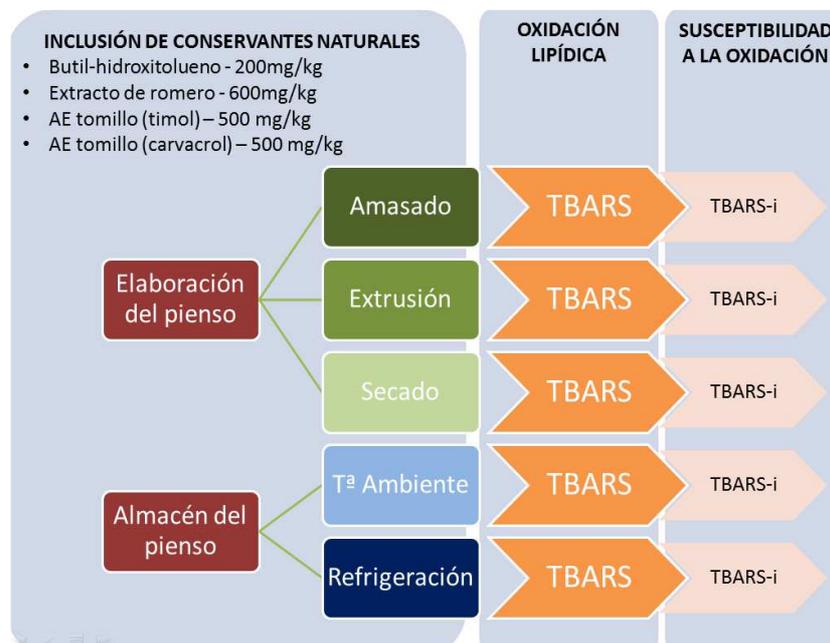
Los objetivos parciales de la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Valorar la efectividad de la incorporación de conservantes naturales en el pienso para peces evaluando su capacidad antioxidante, tanto en el proceso de elaboración como durante su almacén.
2. Determinar la dosis óptima de conservantes naturales ricos en componentes fenólicos a añadir al pienso para conseguir los mejores parámetros de calidad en el músculo del pescado, tanto fisicoquímicos como sensoriales.
3. Describir la evolución del deterioro tras el sacrificio de las doradas alimentadas con los diferentes piensos durante el almacenamiento en hielo hasta su consumo, en función del conservante utilizado y su dosis.
4. Estudiar los efectos de la incorporación de conservantes naturales en la fisiología de la dorada, y su influencia sobre el metabolismo y la funcionalidad del sistema digestivo.

PLAN EXPERIMENTAL

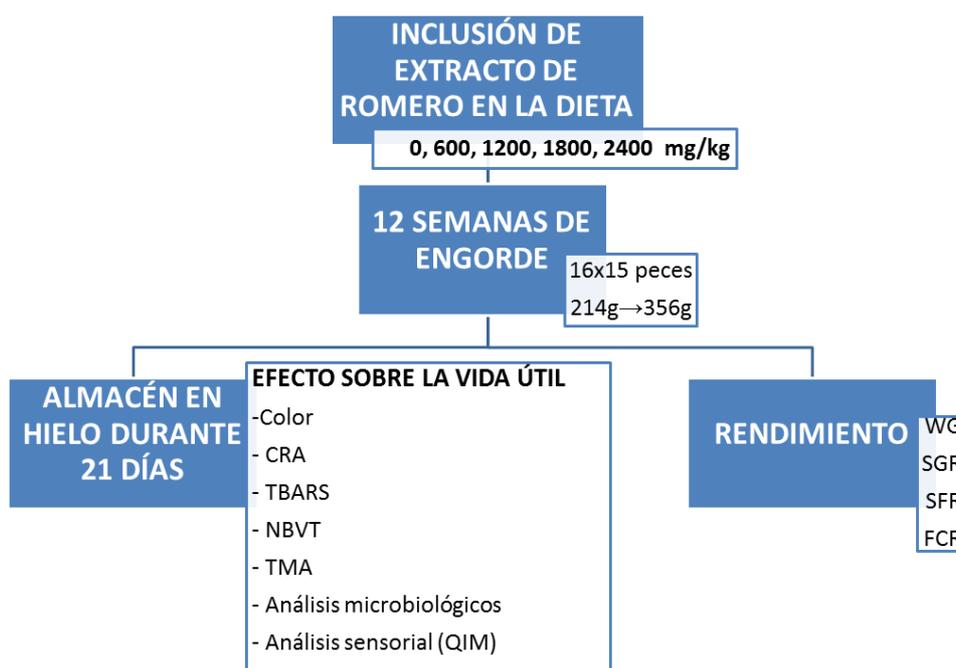
Todos los experimentos de la presente Tesis Doctoral se llevaron a cabo en la Estación Experimental de Cultivos Marinos del IMIDA en San Pedro del Pinatar. Los análisis se realizaron en los laboratorios del IMIDA y se complementaron con dos estancias de un mes en el IUSA de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

El primer experimento (Publicación I) se llevó a cabo simulando las condiciones industriales tanto en la producción como en el almacén de piensos para peces. Se prepararon cinco piensos diferentes, un pienso basal o control negativo, un pienso con un antioxidante sintético (butil-hidroxitolueno, 200 mg/kg) o control positivo y tres con los siguientes conservantes naturales añadidos: extracto de romero, *Rosmarinus officinalis* (600 mg/kg), aceite esencial de tomillo, *Thymbra capitata* -quimiotipo carvacrol- (500 mg/kg), aceite esencial de tomillo, *Thymus zygis* subsp. *gracilis* -quimiotipo timol- (500 mg/kg). Se elaboraron dos lotes de cada uno de los piensos en las mismas condiciones. Estas dietas fueron formuladas de acuerdo a los estándares comerciales para dorada. Los compuestos aromáticos fueron disueltos en el aceite de pescado antes de mezclar éste con el resto de ingredientes. Las dietas fueron fabricadas usando una extrusora semi-industrial (E 19/25 D, Brabender®) y se desecaron en una estufa con ventilación forzada. Se almacenaron 5 kg de cada pienso extruído y seco en bolsas cerradas y protegidas de la luz, dos lotes en refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) y dos lotes a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de la masa cruda, del pienso recién extruído y del pienso seco. Durante el almacén se extrajeron muestras a las 4, 8, 12 y 24 semanas. En todas las muestras se determinaron los TBARS y los TBARS inducidos.



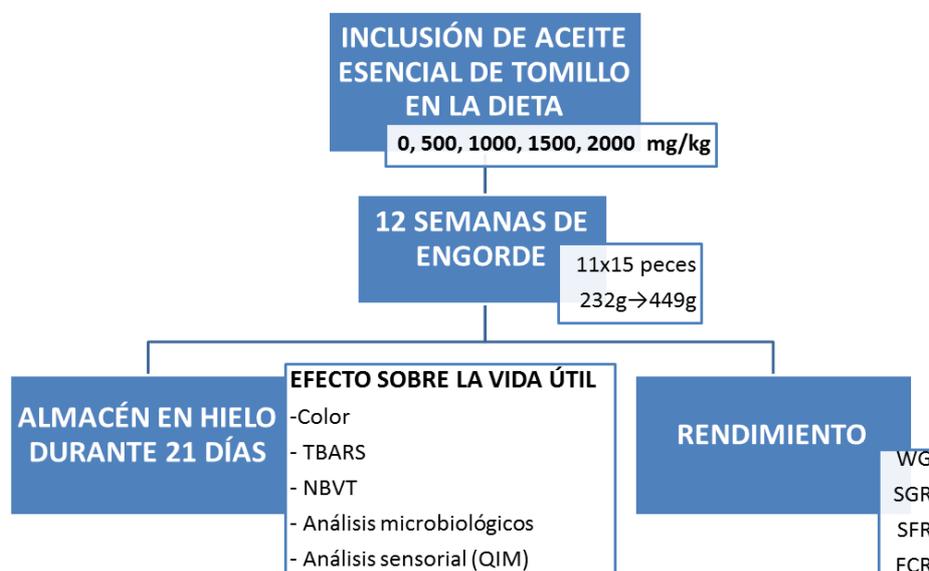
El segundo experimento (Publicación II) tuvo el objetivo de evaluar el efecto del extracto de romero incorporado a la dieta, sobre la calidad final y durante la conservación de la dorada. En él se utilizaron peces con un peso medio inicial de 214 g, siendo probada cada dieta por triplicado. Los peces fueron alimentados con cinco dietas experimentales: una dieta control (dieta basal) y cuatro dietas a las que se les incorporó 600, 1200, 1800 y 2400 mg kg⁻¹, respectivamente, de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*). Aproximadamente cada mes se pesaron y se midieron todos los individuos, y la ingesta fue controlada diariamente. El experimento se llevó a cabo a lo largo de 12 semanas, hasta que los peces alcanzaron talla comercial (356 ± 37). Entonces se calculó la tasa de crecimiento relativo, la tasa de alimentación relativa y el índice de conversión de alimento.

Al final del experimento se sacrificaron 16 peces de cada grupo experimental mediante hipotermia. Los peces fueron almacenados en refrigeración a 4±1°C durante 0, 7, 14 y 21 días en cajas de poliestireno cubiertos con hielo en escamas. La ratio hielo/peces (1:1) fue mantenida constante a lo largo de todo el periodo de almacenamiento. En cada punto de muestreo se sacaron cuatro peces para su procesado y análisis. En primer lugar se llevó a cabo la evaluación sensorial de frescura y después los peces fueron fileteados. Los parámetros fisicoquímicos se determinaron en el filete izquierdo (color, CRA, TBARS, NBVT, TMA) y los análisis microbiológicos se realizaron en el filete derecho.

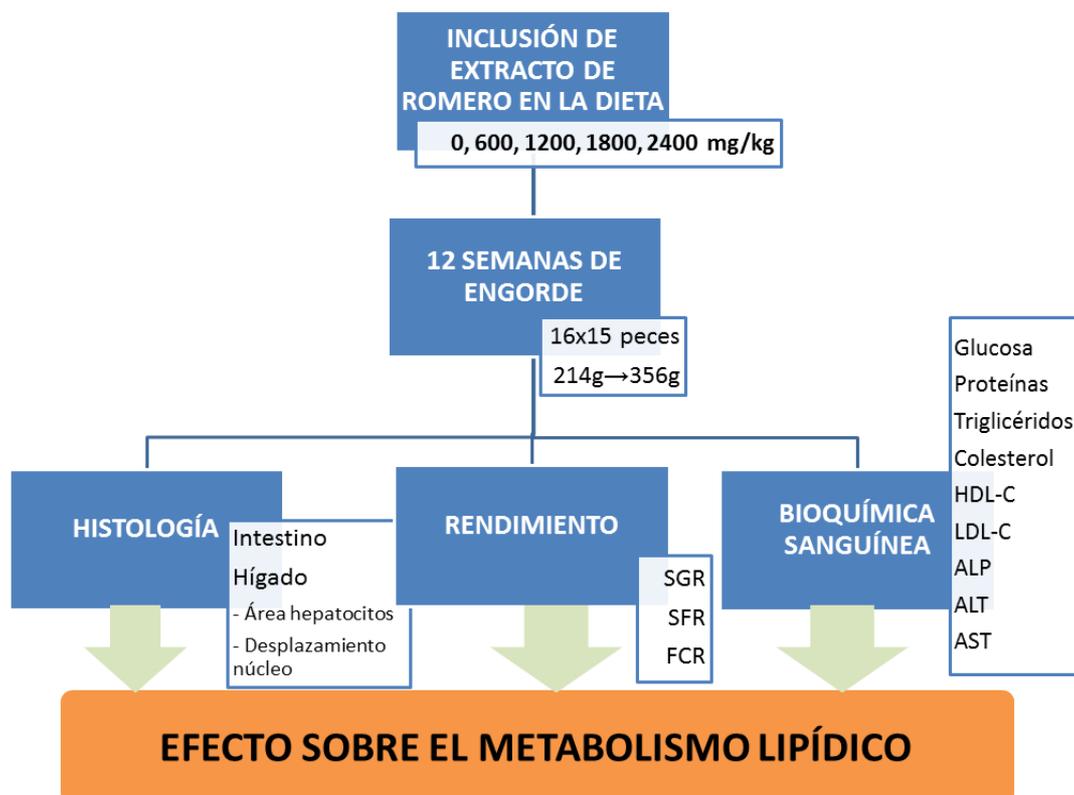


El tercer experimento (Publicación III) consistió en evaluar el efecto del aceite esencial de tomillo *Thymus zygis* subespecie *gracilis* -quimiotipo timol-, incorporado a la dieta, sobre la calidad final y durante la conservación de la dorada en refrigeración. Se seleccionó este aceite esencial en base a los resultados obtenidos por Álvarez *et al.* (2012), quienes observaron un mejor efecto conservante que el quimiotipo carvacrol. Para ello se utilizaron peces con un peso medio inicial de 232 g, siendo probada cada dieta por triplicado. Los peces fueron alimentados con cinco dietas experimentales: una dieta control y cuatro dietas a las que se les incorporó 500, 1000, 1500 y 2000 mg kg⁻¹ de aceite esencial de tomillo, respectivamente. Aproximadamente cada mes se pesaron y se midieron todos los individuos, y la ingesta fue controlada diariamente. El experimento se llevó a cabo a lo largo de 12 semanas, hasta que los peces alcanzaron talla comercial (449.3 g). Se calcularon los índices de crecimiento y aprovechamiento del alimento al igual que en el experimento anterior.

Al final del experimento se sacrificaron 16 peces de cada grupo experimental mediante hipotermia. Los peces fueron almacenados en refrigeración a 4±1°C durante 0, 7, 14 y 21 días en cajas de poliestireno cubiertos con hielo en escamas. La ratio hielo/peces (1:1) fue mantenida constante a lo largo de todo el periodo de almacenamiento. En cada punto de muestreo se sacaron cuatro peces para su procesado y análisis. En primer lugar se llevó a cabo la evaluación sensorial de frescura y después los peces fueron fileteados. Los parámetros fisicoquímicos se determinaron en el filete izquierdo (color, TBARS, NBVT) y los análisis microbiológicos se realizaron en el filete derecho.

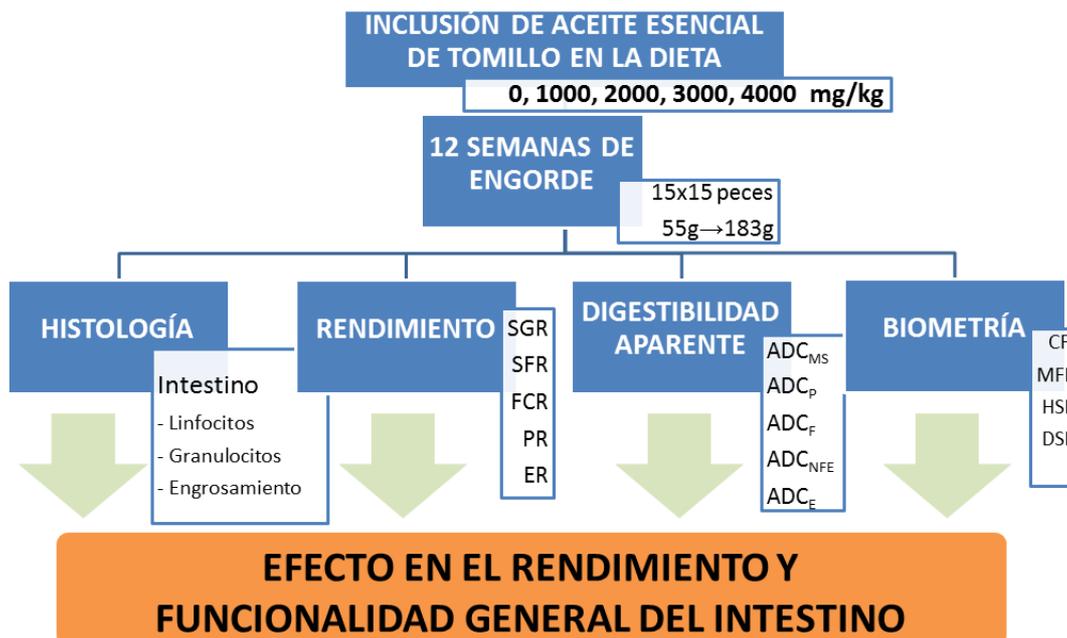


El cuarto experimento (Anexo I) se llevó a cabo a partir de peces engordados junto a los pertenecientes al segundo experimento y en las mismas condiciones. Se sacrificaron 6 peces por tratamiento a las 4, 8 y 12 semanas del inicio del periodo de engorde mediante sobredosis de 2-fenoxi-etanol. De ellos se obtuvo plasma sanguíneo y se diseccionaron los hígados e intestinos de cada pez para su análisis histológico. En las láminas de intestino se evaluaron la cantidad y tamaño de agregados linfocitarios, la cantidad de granulocitos y el engrosamiento de la lámina propia. En las láminas de hígado se evaluó la infiltración de grasa peripancreática, la estructura del parénquima hepático y el desplazamiento del núcleo de los hepatocitos. Se tomaron microfotografías tanto de hígado como de intestino. Las microfotografías de hígado (100X) se utilizaron para medir, en hepatocitos elegidos al azar, el área y el desplazamiento del núcleo. En total se tomaron 198 medidas de cada parámetro por dieta y día. En cada muestra de plasma se determinaron glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, fosfatasa alcalina (ALP), alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST).



El quinto experimento (Anexo II) se realizó con dosis crecientes de aceite esencial de tomillo *Thymus zygis* subespecie *gracilis*, al igual que el segundo. En este caso se utilizaron dosis más altas en función de bibliografía existente sobre suplementación de timol en dietas para peces (Ahmadifar *et al.*, 2011) y teniendo en cuenta los resultados del segundo experimento.

Se utilizaron doradas con un peso inicial de 55,1 g. El experimento se llevó a cabo a lo largo de 12 semanas y fueron alimentados con cinco dietas experimentales (por triplicado): una dieta control (dieta basal) y cuatro dietas con 1000, 2000, 3000 y 4000 mg kg⁻¹ de aceite esencial de tomillo, respectivamente. A partir de los datos de peso e ingesta se calcularon los índices de crecimiento y aprovechamiento del alimento. Al final del periodo de engorde se sacrificaron 9 peces de cada tanque, de los cuales 3 fueron triturados enteros para la determinación de macronutrientes y los 6 restantes fueron diseccionados. De ellos se extrajo el hígado, el intestino y la grasa mesentérica, que fueron pesados por separado. Con el peso de estos órganos se calcularon índices somáticos y los intestinos fueron procesados para su análisis histológico. En ellos se evaluaron la cantidad de agregados linfocitarios, de granulocitos y el engrosamiento de la lámina propia mediante un sistema de puntuación histológica. El último mes de engorde se suplementaron las dietas con 1g kg⁻¹ de óxido de itrio. Las heces fueron recolectadas durante 30 días, 4 días a la semana. De esta forma se pudieron calcular los coeficientes de digestibilidad aparente (ADC) para materia seca (ADC_{DM}), proteína (ADC_P), grasa (ADC_F) y MELN (ADC_{NFE}).



DISCUSIÓN

2.3.1. Efectividad de conservantes naturales incorporados al pienso para peces en la protección frente a la oxidación lipídica durante la elaboración y el almacenamiento del mismo.

El primer aspecto estudiado en la presente Tesis Doctoral ha sido el efecto de la incorporación de conservantes naturales sobre el propio pienso, durante su elaboración y su almacén. Esto es fundamental para el posterior estudio de su actividad sobre el pez, ya que los compuestos aromáticos tienen cierta sensibilidad a temperaturas y concentraciones de oxígeno altas y podrían degradarse parcial o totalmente antes de llegar al pez. En otros compuestos antioxidantes como ácido ascórbico, vitamina E y carotenoides ya se había constatado su degradación durante el procesado y el almacén del pienso (Sandnes & Utne, 1982; Hung *et al.*, 1980; Gouveia *et al.*, 2003), sin embargo, existen pocos trabajos acerca del deterioro de compuestos aromáticos naturales en el pienso. Únicamente Hamre *et al.* (2010) estudiaron antioxidantes naturales en el pienso para peces durante la elaboración y la posterior conservación en congelación, entre ellos un extracto de romero comercial. En nuestro caso hemos utilizado temperaturas más relacionadas con las condiciones que se dan en una granja acuícola, pues el almacén del pienso en congelación queda muy lejos de las posibilidades actuales de la acuicultura mediterránea. De hecho, las empresas de acuicultura que utilizan pienso extruido suelen almacenarlo en naves cercanas al puerto, convenientemente ventiladas pero sin refrigeración (Rubio, 2004). Por tanto, utilizamos dos temperaturas: temperatura ambiente (20-28 °C), con el fin de simular las condiciones industriales, y refrigeración (4°C), como condiciones óptimas aunque improbables en el sector acuícola.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren que el sistema de almacén actual, al menos durante 6 meses es apropiado, ya que no observamos un nivel alto de oxidación en ningún caso. El almacén del pienso en su envoltura hermética y protegido de la luz permite que se conserve en condiciones aceptables en cuanto a oxidación lipídica. Además, el periodo de almacén estudiado es superior al tiempo que se suele almacenar el pienso en una empresa acuícola. Aun así, la ausencia de oxidación lipídica es crucial para la posterior calidad del pescado (Zhong *et al.*, 2008) y también para su crecimiento y su salud (Obach & Laurencin, 1992; Alves *et al.*, 2007; Lall & Lewis McCrea, 2007). Existe la posibilidad de sustituir los antioxidantes artificiales por

antioxidantes naturales más seguros y aceptados socialmente. Además, este tipo de utilización puede tener la doble función de incorporar un compuesto con actividad antioxidante al pienso, protegiéndolo, para después, el compuesto activo o alguno de sus metabolitos, actuar sobre la carne del pez. Los aceites y extractos de plantas aromáticas han demostrado ejercer un efecto protector sobre ciertas vitaminas que se incluyen en el pienso mediante estudios de conservación en otras matrices (Wang & Fang, 1992; Fang & Wada, 1993; Wong *et al.*, 1995), proponiéndose el extracto de romero como sustituto del ácido ascórbico en la potenciación de la actividad de la vitamina E. Por tanto, la adición de conservantes naturales al pienso podría mejorar, además, la funcionalidad de las vitaminas en el pienso.

El estudio de la actividad de los compuestos activos en el pienso antes y después de la extrusión permitió observar una variación durante el proceso, que se dio de diferente forma en función del conservante añadido. Además la pérdida de estos compuestos activos estuvo inversamente relacionada con su potencia en la protección de los lípidos del pienso. Esta relación entre la actividad de un antioxidante y su inestabilidad es común, ya que desempeñan su actividad oxidándose y modificándose a sí mismos. En algunos casos se han estudiado las vías de oxidación de estos compuestos y el efecto de la proporción de cada uno en el extracto o el aceite esencial en la actividad antioxidante del mismo (Zhang *et al.*, 2012; Jordán *et al.*, 2014). Las complejas relaciones encontradas y el efecto protector que ejercen unos compuestos sobre otros –como es el caso del carnosol sobre el ácido carnósico–, demuestran la importancia de estudiar las cantidades de cada uno de los compuestos en el extracto o aceite esencial y su evolución durante el desarrollo de su actividad antioxidante.

La oxidación lipídica no fue importante durante el periodo de almacén, no encontrándose diferencias entre tratamientos. Sin embargo, la susceptibilidad a la oxidación sí fue diferente en función del conservante añadido y, a temperatura ambiente, aumentó de forma importante entre las semanas 12 y 24 (Figura 1). El extracto de romero ejerció una actividad antioxidante en los lípidos del pienso similar al butil-hidroxitolueno (BHT) a ambas temperaturas, por lo que podría ser un buen sustituto de este antioxidante sintético que, además, tiene demostrados efectos perjudiciales para la salud (Imaida *et al.*, 1984; Ito *et al.*, 1985; Barlow, 1990; Chen *et al.*, 1992). Ambos aceites esenciales de tomillo tuvieron importantes diferencias frente

al extracto de romero y al BHT en su actividad en función de la temperatura. Ya se conocía la mejor actividad antimicrobiana de los aceites esenciales a bajas temperaturas (Burt, 2004) y este experimento demostró, en los aceites esenciales y la matriz estudiados, que la mejor actividad antioxidante también se da a bajas temperaturas.

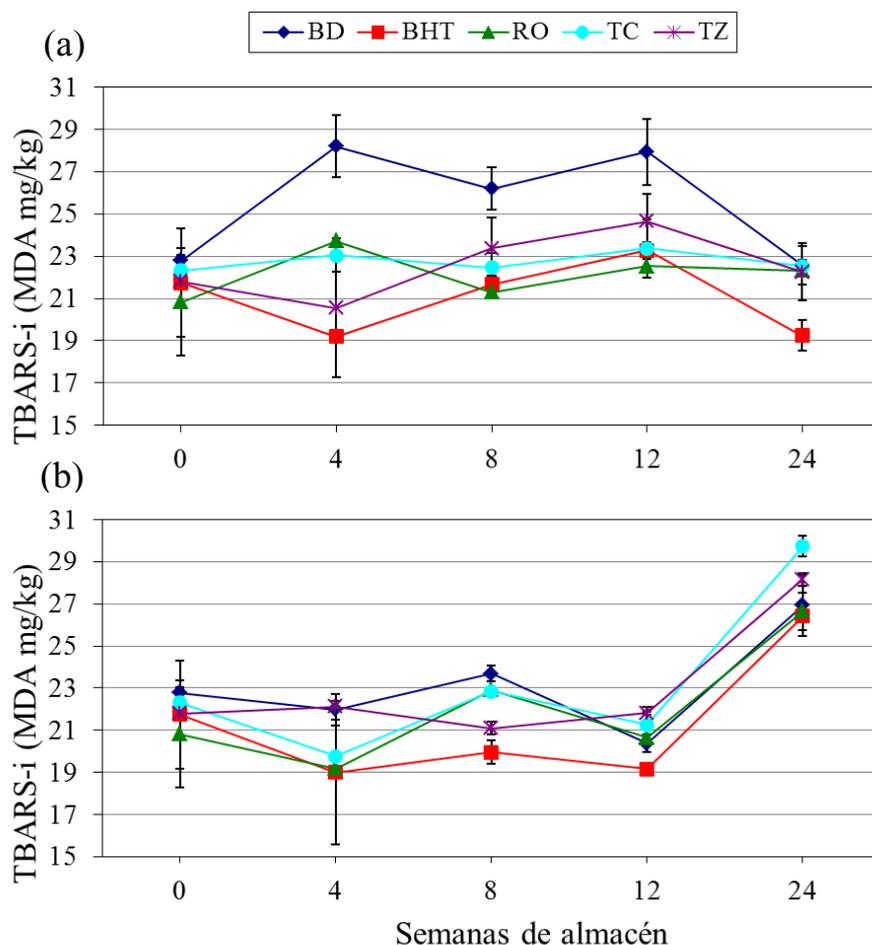


Figura 1. . Evolución de los TBARS-i (mg MDA/kg) en piensos extruidos con distintos conservantes añadidos durante su almacén en refrigeración (a) y a temperatura ambiente (b).

En este experimento también pudimos observar cambios que podrían indicar el desarrollo de la reacción de Maillard, también llamada glucosilación no enzimática de proteínas y muy tenida en cuenta en el estudio de alimentos y piensos extruidos (Singh *et al.*, 2007). Esta tiene lugar al reaccionar los grupos amino de la proteína con el grupo carbonilo de azúcares reductores, generándose compuestos aromáticos con capacidad antioxidante (Osada & Shibamoto, 2006). Sin embargo se pierden determinados aminoácidos, por lo que se reduce el valor biológico de la proteína y, en definitiva, la calidad nutritiva del alimento. En nuestro caso, durante el proceso de secado se observó

cierta mejora de la estabilidad de los lípidos, posiblemente propiciada por estos compuestos, y un descenso en los TBARS. El descenso en TBARS (equivalentes de malondialdehído) podría deberse a la alta reactividad de este último con los productos de la reacción de Maillard (Gómez Sánchez *et al.*, 1992).

La extrusión y posterior secado de alimentos se lleva a cabo en unas condiciones que propician el desarrollo de esta reacción (Nursten, 2005), algunas de ellas son:

- pH ligeramente alcalino, con un máximo a pH 10.
- Temperaturas elevadas, aunque la energía de activación es baja y se da incluso en refrigeración.
- Actividad de agua entre 0,6 y 0,9 (humedad intermedia) que permita la movilidad de los reactantes pero evite el efecto inhibitorio del agua por ser producto de la reacción.
- Ciertos metales como el cobre y el hierro que actúan como catalizadores.

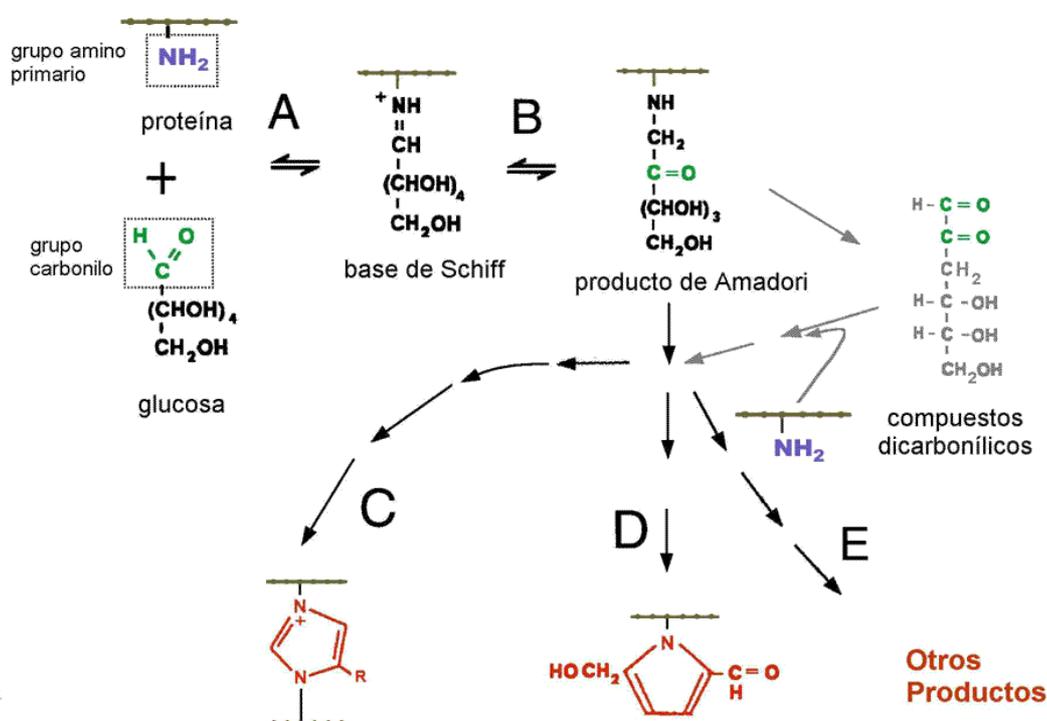


Figura 2. Formación de compuestos aromáticos durante la glucosilación no enzimática de proteínas o Reacción de Maillard.

2.3.2. Efecto de la dosis de conservantes naturales sobre la calidad final de la dorada.

El efecto de los antioxidantes incorporados al pienso en la calidad final del pescado ha sido otro de los objetivos de la presente Tesis. El efecto sobre la calidad final del producto se ha estudiado en animales terrestres de forma más o menos amplia. La incorporación de vitamina E en la dieta ha demostrado su transmisión a la carne y el desempeño de su capacidad antioxidante en ella. En trucha, Akhtar *et al.* (1998) observaron una mejora en la estabilidad oxidativa del músculo tras la inclusión en la dieta de vitamina E, observándose más tarde en otras especies como el rodaballo (Ruff *et al.*, 2003). El extracto de romero es capaz de modificar la estabilidad oxidativa y la composición de ácidos grasos de la carne almacenada, aumentando la proporción de ácidos grasos poliinsaturados n3 y n6 (Liotta *et al.*, 2010). También se ha comprobado que su incorporación en la dieta produce la transmisión de componentes polifenólicos con actividad antioxidante a la carne de cordero (Moñino *et al.* 2008).

Existen pocos trabajos en los que se haya incorporado un extracto o aceite esencial procedente de una planta aromática en la dieta de un pez para el estudio de la calidad del pescado. Sant' Ana y Mancini-Filho (2000) alimentaron al “pacu” (*Piaractus mesopotamicus*), con una dieta que contenía 100 ppm de acetato de α -tocoferilo, 100 ppm de BHT o 1,4 g/kg de un extracto comercial de romero y encontraron diferencias en la composición en ácidos grasos del músculo y en la estabilidad de mismos frente a radiación γ (romero > tocoferol > BHT > control). Di turi *et al.* (2009) estudiaron la calidad de lubinas alimentadas con pienso suplementado con aceite esencial de romero, no encontrando diferencias en el pescado fresco. Más tarde, Álvarez *et al.* (2012) estudiaron el efecto de antioxidantes naturales en el pienso en la calidad del pescado incluyendo extracto de romero y dos aceites esenciales de tomillo (quimiotipo timol y quimiotipo carvacrol). La calidad del pescado se valoró de una forma amplia, con parámetros físico-químicos, microbiológicos y sensoriales. La mayoría de parámetros físico-químicos no fueron diferentes entre tratamientos, solamente el color mostró algunas diferencias teniendo los peces del grupo “carvarol” mayor componente rojo y amarillo que los grupos “romero” y “timol”. Aunque la predominancia del componente rojo del color puede indicar un mejor estado oxidativo reflejado en los grupos hemo de la mioglobina, el aumento del componente amarillo es

indicativo de una mayor oxidación lipídica. El grupo “carvacrol” mostró por tanto unos valores de color indicativos de una mayor oxidación lipídica que los peces de los grupos “romero” o “timol”. Los recuentos microbianos a día 0 sólo fueron negativos para el grupo “timol”, no existiendo diferencias entre el resto de grupos. A pesar de esto no hubo diferencias en ninguno de los atributos sensoriales estudiados en pescado fresco. Por todo lo anterior se puede decir que en este estudio el aceite esencial de tomillo -quimiotipo timol- mostró los mejores resultados en general, seguido del extracto de romero. Teniendo en cuenta estos resultados y el efecto en la conservación se eligieron estos dos conservantes para realizar los experimentos dosis-respuesta.

En los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral tanto el extracto de romero como el aceite esencial de tomillo -quimiotipo timol- tuvieron un efecto beneficioso en la calidad del pescado fresco, no tanto en parámetros físico-químicos como en la calidad sensorial. Los peces alimentados con dietas con extracto de romero sufrieron una menor oxidación lipídica y se observó cierta tendencia a aumentar la capacidad de retención de agua (CRA), reduciéndose también los recuentos microbianos del pescado fresco. En ningún caso pareció haber un efecto claro de la dosis. En el análisis sensorial se observó un efecto beneficioso de la dosis de extracto de romero en el olor corporal y de la dosis de aceite esencial de tomillo en el color de las agallas y la mucosidad. Hay gran cantidad de atributos que no mostraron diferencias, lo cual es obvio en algunos como la firmeza, la forma de los ojos y la superficie corporal, ya que es difícil que no reciban la puntuación máxima en su primer día *post mortem*. El olor corporal puede ser importante a la hora de la aceptación por el consumidor. Las diferencias encontradas, aunque pequeñas, pueden significar la elección por el consumidor de este producto u otro en el mercado. El color de las agallas también es importante por ser un indicador tradicional de frescura utilizado por los consumidores.

Como resumen de la calidad sensorial, el índice de calidad mejoró al aumentar la dosis de extracto de romero, mientras que las distintas dosis de aceite esencial de tomillo no mostraron un efecto en el índice de calidad del pescado fresco.

2.3.3. Evolución del deterioro durante el almacenamiento en hielo de doradas alimentadas con dietas con distintas dosis de conservantes naturales.

El estudio de la conservación de la dorada almacenada en hielo aportó datos interesantes acerca del efecto protector del aceite esencial de tomillo y del extracto de romero. Entre los parámetros fisicoquímicos estudiados, el color siguió el patrón típico del pescado en deterioro con algunas singularidades dependiendo del conservante utilizado. El aumento de la luminosidad es común durante un almacén prolongado del pescado fresco y va asociado a la desnaturalización de proteínas y al descenso de la CRA. La pérdida de color rojo se ha relacionado con la oxidación de los grupos “hemo” de la mioglobina, que es muy abundante en el músculo de pescado. Esta oxidación hace que se transforme en metamioglobina, de color marrón (Hamre *et al.*, 2003). En cambio, el aumento del color amarillo está relacionado con la oxidación de los lípidos, un cambio apreciable durante el enranciamiento de las grasas y descrito por varios autores (Ruff *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2009; Tuckey *et al.*, 2012). Aunque todos los grupos experimentales evolucionaron en estos tres aspectos, la diferente velocidad o intensidad de estos cambios nos permiten evaluar el efecto conservante de los compuestos activos utilizados.

En ambos casos los datos de luminosidad estuvieron relacionados con los del indicador de deterioro proteico, el nitrógeno básico volátil total (NBVT), apoyando la hipótesis de Pavlidis *et al.*, (2006). Según esta, los cambios de luminosidad estarían relacionados con la desnaturalización de proteínas, la pérdida de CRA y una mayor reflexión de la luz. El componente rojo del color (a^*) no mostró grandes cambios. Al final del periodo de almacén tendió a descender con dosis crecientes de aceite esencial de tomillo. En el experimento de extracto de romero se mantuvo estable con todas las dosis frente al aumento observado en el grupo control. Por último, el componente amarillo (b^*) del color fue menor con dosis altas de aceite esencial de tomillo el día 7 de almacén, pudiendo atribuirse a una menor oxidación con esas dosis. En el experimento con extracto de romero este componente del color se mantuvo estable con las dosis intermedias.

La capacidad de retención de agua (CRA) solo se determinó en el experimento con extracto de romero. En él se observó una tendencia a aumentar con la dosis de 600

mg/kg al final del periodo de almacén, siendo el único grupo en que no se redujo significativamente durante todo el periodo (Figura 3). La CRA está relacionada con la integridad de las proteínas musculares y del colágeno (Suarez *et al.*, 2005) por lo que parece obvia la relación encontrada con los datos de NBVT en este experimento. Aunque no hemos comprobado la efectividad del aceite esencial de tomillo en este aspecto, otros autores lo han estudiado mediante aplicación exógena observando un efecto beneficioso (Attouchi & Sadok, 2010).

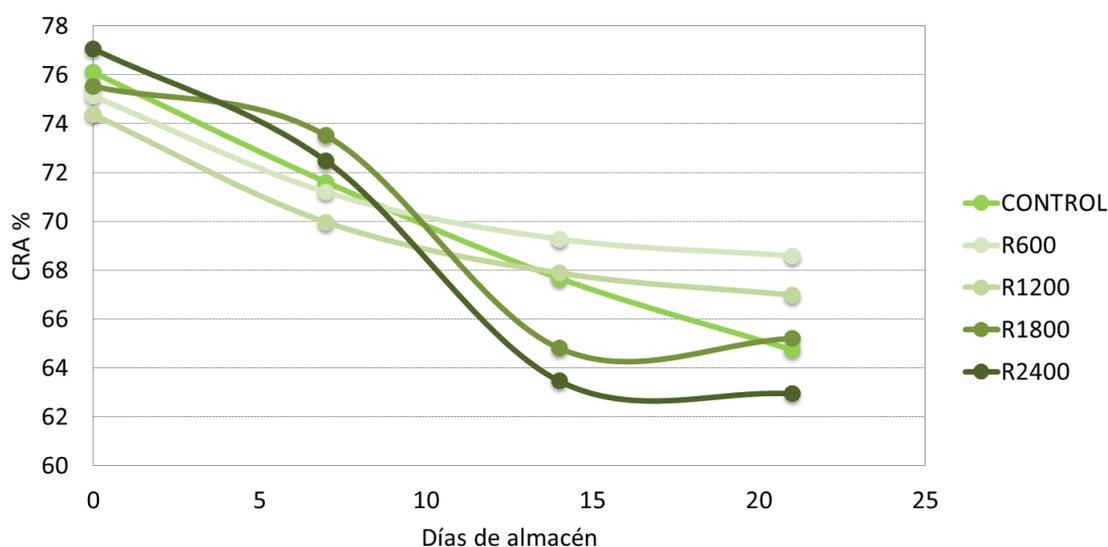


Figura 3. Evolución de la CRA del filete de doradas alimentadas con dietas suplementadas con distintas dosis extracto de romero durante durante su almacén en hielo.

La oxidación lipídica fue uno de los parámetros más importantes en la evaluación de los conservantes naturales, ya que es uno de los mecanismos principales en el deterioro del pescado. El índice de TBARS (Figura 4) mostró claramente la evolución de la oxidación lipídica durante los 21 días de almacén aumentando desde valores de 0,10-0,20 mg/kg sin superar 1mg/kg en ningún momento, posiblemente debido al contenido moderado en grasa de la dorada y el método de almacenamiento, sin eviscerar, que protege al músculo del contacto con el aire. La inclusión de aceite esencial de tomillo en la dieta tuvo un efecto dosis-dependiente en la oxidación lipídica, observándose valores menores de TBARS conforme aumentaba la dosis, aunque con la dosis de 500 mg/kg el índice de TBARS fue igual o superior al control. El efecto del extracto de romero fue diferente, de forma que la oxidación lipídica tendió a disminuir con la dosis de 600 mg/kg y a aumentar con dosis altas. La fuerte relación de estos datos

con el análisis sensorial en ambos experimentos apoya la idea de que la oxidación lipídica es crucial en el proceso de deterioro del pescado.

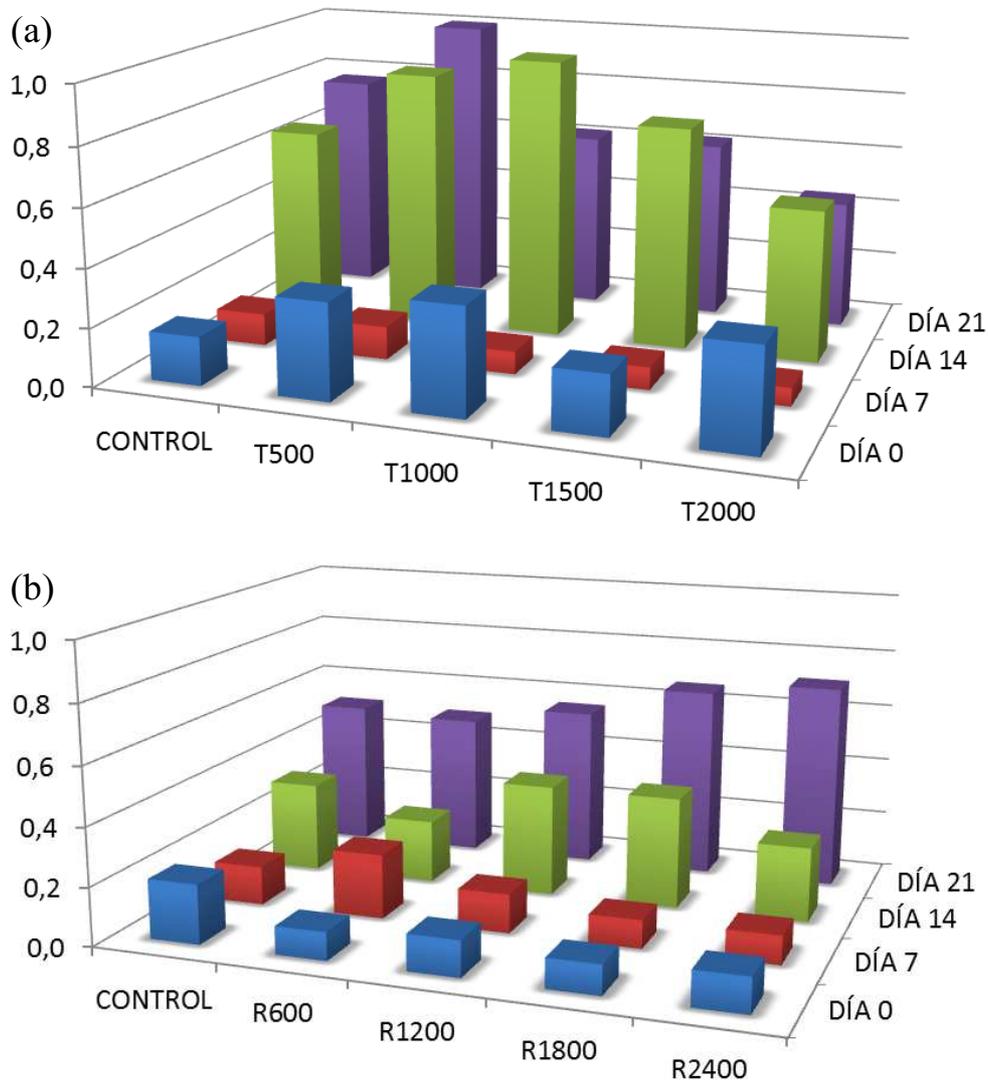


Figura 4. Contenido en TBARS (mg MDA/kg) de doradas alimentadas con dietas suplementadas con distintas dosis de aceite esencial de tomillo (a) o extracto de romero (b) durante su almacén en hielo.

El deterioro proteico también es un aspecto importante ya que interviene en la modificación de atributos sensoriales importantes en la calidad del pescado, como son la elasticidad, la firmeza y el color (Estévez & Cava, 2004). El indicador utilizado para estudiar este aspecto fue el NBVT, estrechamente relacionado con la luminosidad y la CRA de la carne del pescado. El principal cambio en NBVT se observó entre los días 14 y 21 (Figura 5), ya que es un indicador de deterioro tardío y las moléculas implicadas se forman durante el deterioro avanzado de las proteínas. El efecto de ambos conservantes

fue diferente, al igual que en la oxidación lipídica. Además siguió las mismas tendencias, lo que sugiere que el mecanismo de protección sobre lípidos y proteínas es similar. En ambos experimentos se alcanzó el límite propuesto para este índice (25 mg N/100g) por Giménez *et al.* (2004) entre los días 14 y 21, entre los que se situó también la vida útil en cuanto a calidad sensorial.

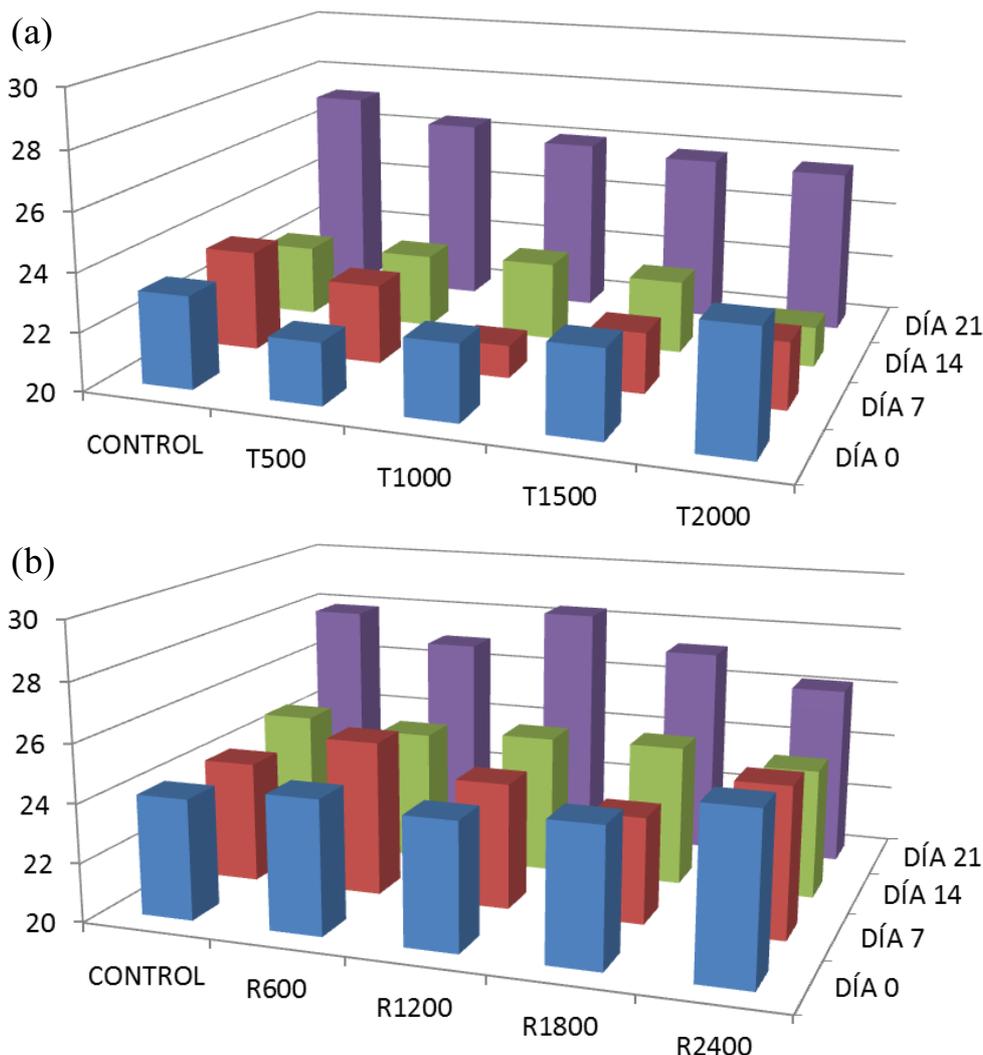


Figura 5. Contenido en NBVT (mg N/100 g) de doradas alimentadas con dietas suplementadas con distintas dosis de aceite esencial de tomillo (a) o extracto de romero (b) durante su almacén en hielo.

El nitrógeno de trimetilamina (TMA) solo se estudió en el experimento con aceite esencial de romero (Figura 6). También está relacionado con el deterioro proteico pero es más específico de la actividad microbiana. Se observó la misma tendencia que en el NBVT, lo que es comprensible ya que se encuentra dentro de los compuestos

determinados en el mismo. El límite propuesto para TMA en dorada (1 mg/kg; Kyrana *et al.*, 1997; Tejada & Huidobro, 2002) también se alcanzó entre los días 14 y 21.

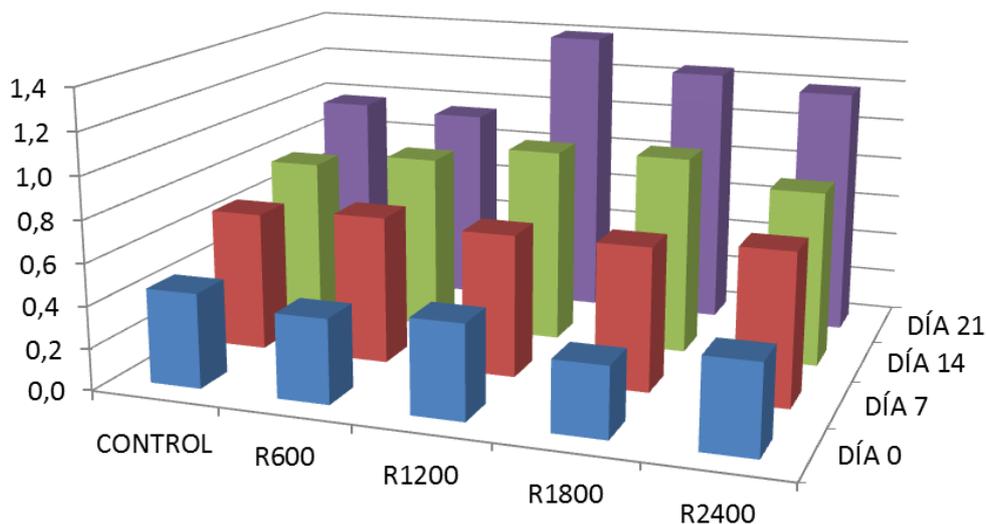


Figura 6. Contenido en TMA (mg N/100 g) de doradas alimentadas con dietas suplementadas con distintas dosis de extracto de romero durante durante su almacén en hielo.

La evolución de las poblaciones microbianas en el filete del pescado es un aspecto fundamental, ya que participan en la producción de gran cantidad de sustancias y atributos indeseables, y también en el deterioro de lípidos y proteínas. Sin embargo es un proceso difícil de estudiar por las complejas interacciones que se producen entre estas poblaciones en el filete (Gram *et al.*, 2002). La inclusión de aceite esencial de tomillo o de extracto de romero en el pienso afectó de forma diferente a las poblaciones microbiológicas del filete (Figura 7).

Aunque en ambos experimentos se observan pocas diferencias en recuentos totales de mesófilos y psicrófilos al final del periodo de almacén, algunos grupos de bacterias se comportan de manera distinta. El aceite esencial de tomillo parece ser un potente inhibidor del crecimiento de enterobacterias y coliformes a dosis altas, ya que en el grupo alimentado con la dieta con 2000 mg/kg no se observan recuentos positivos de estos grupos hasta el día 21. En cambio, el extracto de romero no parece ejercer ningún efecto sobre estos grupos bacterianos.

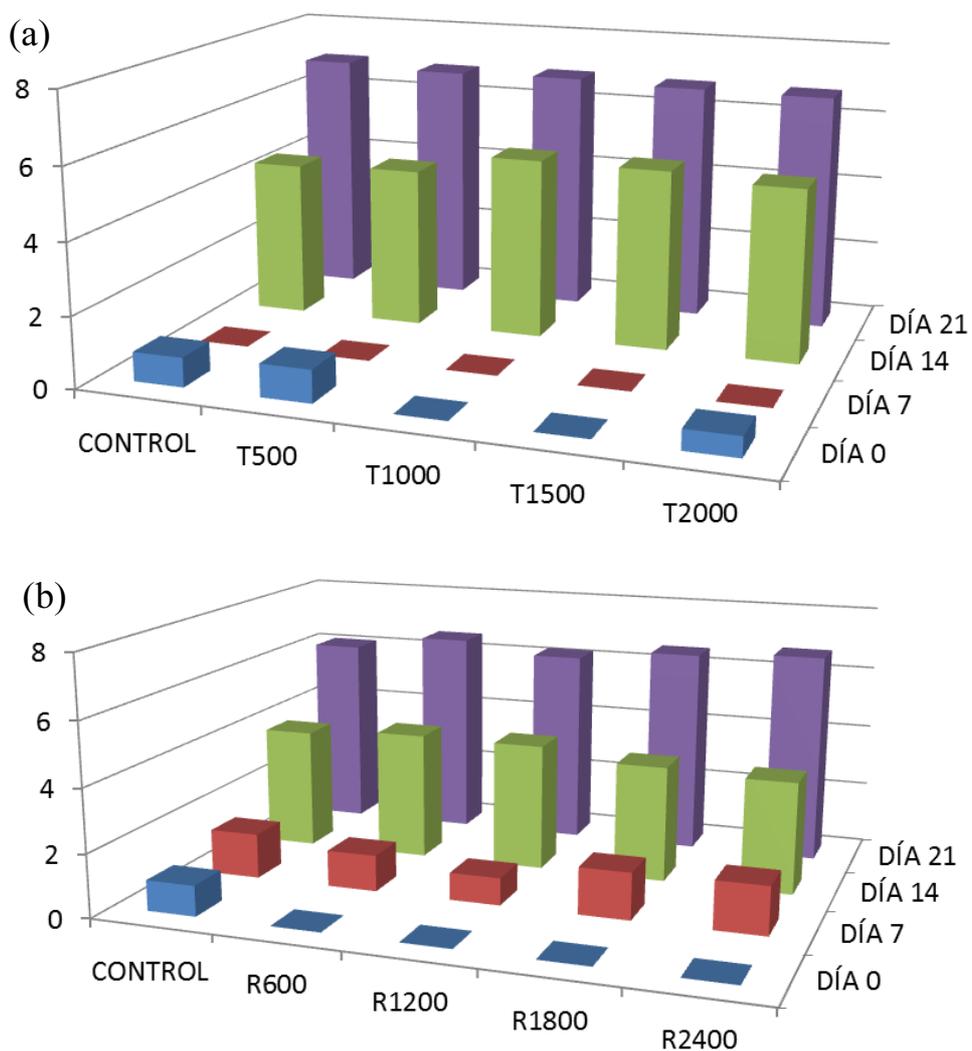


Figura 7. Recuentos de mesófilos durante el almacén en hielo de dorada alimentada con distintas dosis de dosis de aceite esencial de tomillo (a) o extracto de romero (b).

En el experimento con aceite esencial de tomillo se observó un menor crecimiento de enterobacterias y coliformes asociado a un mayor crecimiento de *Pseudomonas* (Figura 8) –que incluyen bacterias específicas del deterioro–. Resultados similares se han relacionado con la competencia que ejerce este último grupo bacteriano gracias a la generación de sideróforos, lo que destaca la importancia del estudio de las interacciones entre las poblaciones bacterianas en el filete del pescado (Gram *et al.*, 2002).

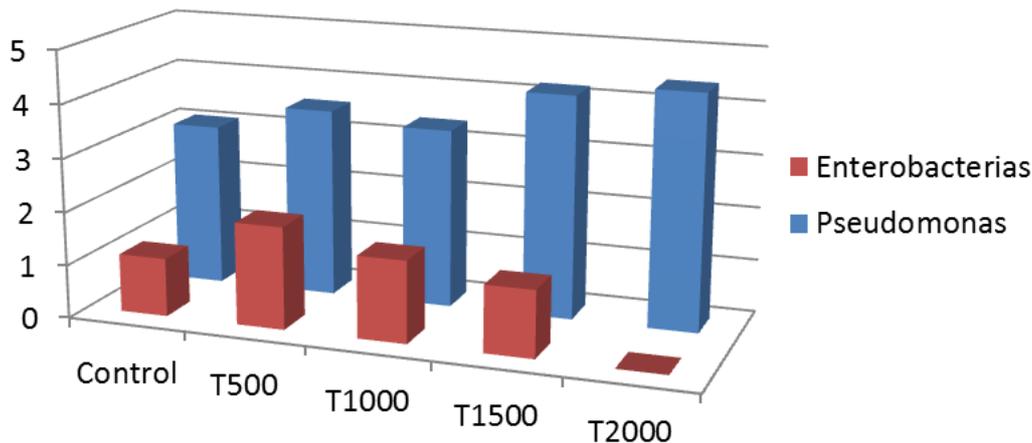


Figura 8. Recuentos de Enterobacterias y Pseudomonas tras 14 días de almacén en hielo de doradas alimentadas con dietas con aceite esencial de tomillo.

La calidad sensorial del pescado en conservación también fue afectada por la inclusión de conservantes naturales en la dieta. Las diferencias observadas en los aspectos fisicoquímicos y microbiológicos entre las distintas dosis de aceite esencial de tomillo no se tradujeron en muchas diferencias sensoriales. La aplicación exógena de este aceite esencial ha demostrado una buena actividad conservante mejorando la calidad microbiología, sensorial y físico-química del filete. Kostaki *et al.*, (2009) observaron un aumento de 3 días en la vida útil del pescado en refrigeración. Mediante la inclusión en la dieta hemos observado que afecta principalmente al olor corporal del pescado, observándose diferencias a partir del día 7 relacionadas con los indicadores de deterioro lipídico y proteico. El peor olor a dosis altas observado el día 14 coincide con un mayor crecimiento de *Pseudomonas*, lo que podría indicar la presencia entre ellas de bacterias específicas del deterioro. Sería necesario un estudio en profundidad para poder determinar esta relación.

El extracto de romero también ha mostrado buenos resultados en la calidad sensorial mediante su aplicación exógena en el pescado. En este sentido, Ozogul *et al.* (2010) realizaron un estudio bastante completo mostrando un importante efecto en el índice de calidad no dependiente de la dosis, al igual que observamos nosotros. En nuestro caso las diferencias en calidad sensorial se debieron a mayor cantidad de atributos que con el aceite esencial de tomillo. El olor corporal y la firmeza mejoraron conforme aumentaba la dosis de extracto de romero. La forma de los ojos, y el color y

olor de las agallas mostraron una mejor conservación en peces alimentados con dietas con extracto de romero, pero no se observó un efecto de la dosis.

En cuanto al índice de calidad, mostró los menores valores (mayor frescura) al final del almacén para la dosis de 1000 mg/kg en el caso del aceite esencial de tomillo y para la dosis de 600 mg/kg en el caso del extracto de romero. Aunque solo hubieron diferencias significativas para el extracto de romero, ambos conservantes aumentaron la vida útil del pescado almacenado en hielo en un día, independientemente de la dosis.

2.3.4. Influencia de la adición de extracto de romero en la dieta sobre el metabolismo lipídico de la dorada.

La inclusión de extracto de romero en el pienso de animales terrestres se ha estudiado sobre todo con el fin de promover el crecimiento o la digestibilidad y mejorar la calidad de la carne (Lopez-Bote *et al.*, 1998; Cross *et al.*, 2007). En modelos animales (conejo, ratón, etc.) se ha observado un amplio rango de efectos fisiológicos (Amin & Hamza, 2005; Bakirel *et al.*, 2008; Al-Jamal & Alqadi, 2011; Cui *et al.*, 2012; Romo Vaquero *et al.*, 2012; Gaya *et al.*, 2013). Éstos afectan en gran medida al metabolismo lipídico, observándose una modificación de la composición corporal, de parámetros sanguíneos, de la actividad enzimática, de la expresión génica y de la funcionalidad del hígado (Figura 9). El previsible efecto en peces nos llevó a estudiar el hígado, como órgano regulador del metabolismo lipídico y determinados parámetros sanguíneos indicadores del transporte y del metabolismo de los lípidos.

El estudio histológico del intestino permitió descartar cambios importantes en su morfología que indicaran algún efecto en el sistema inmune asociado al intestino (GALT) o en la funcionalidad del mismo, aunque se ha demostrado su efecto inhibitorio en enzimas digestivas de mamíferos (Romo Vaquero *et al.*, 2012). En cuanto al estudio histológico del hígado, mostró la capacidad del extracto de romero de reducir la esteatosis hepática producida por la alimentación *ad libitum* y las condiciones de hacinamiento de la acuicultura intensiva. Además, durante el desarrollo del experimento, se observaron cambios histológicos que sugieren la evolución desde una esteatosis aguda a una esteatosis crónica (Day *et al.*, 2003). La dosis de 600 mg/kg fue

la que tuvo el mayor efecto beneficioso tanto en el hígado como en los parámetros sanguíneos.

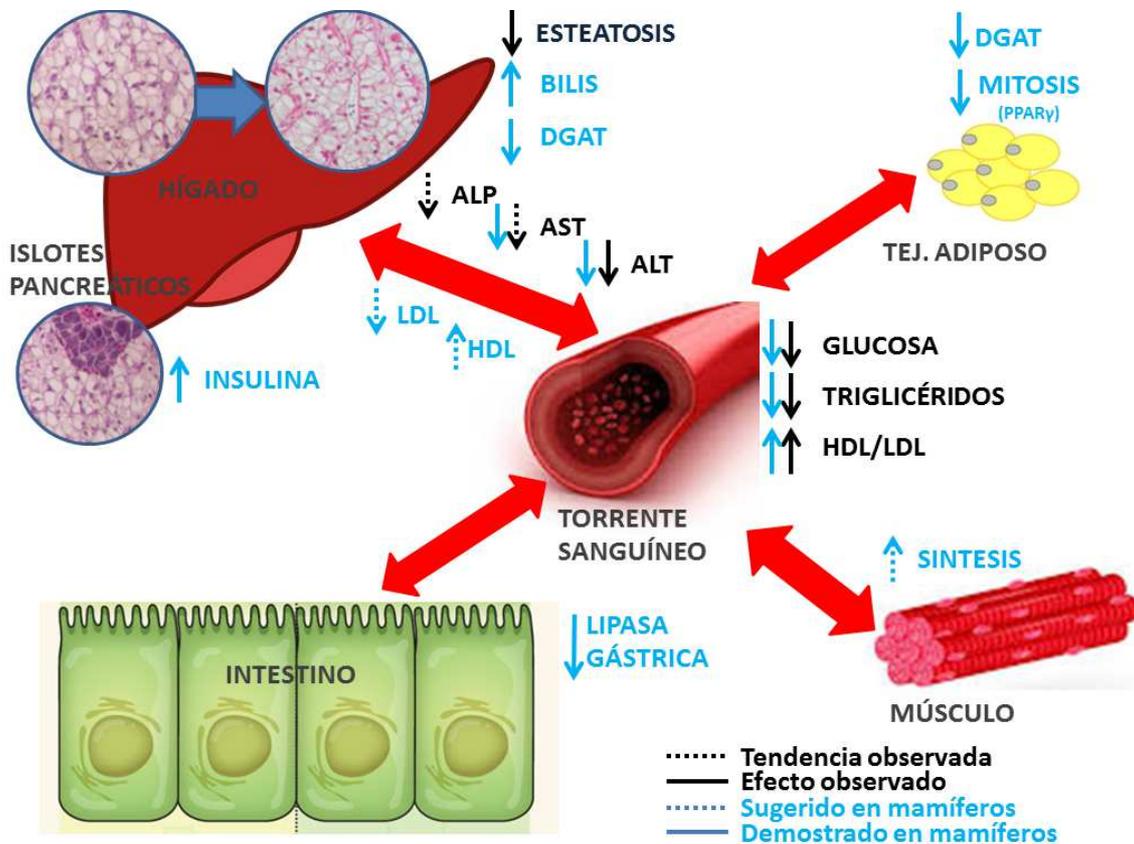


Figura 9. Efectos del extracto de romero en distintos órganos relacionados con el metabolismo lipídico de dorada y de mamíferos.

El extracto de romero ha demostrado ejercer un efecto sobre el metabolismo lipídico mediante varias vías de actuación, pudiendo ser la funcionalidad del hígado la principal de ellas (Figura 9). El efecto antidiabético, también observado al administrar extracto de romero en mamíferos (Bakirel *et al.*, 2008), ha sido atribuido a un mejor funcionamiento de las células β productoras de insulina, al estar protegidas frente a la oxidación lipídica. Se ha propuesto el estrés oxidativo como la conexión entre las distintas enfermedades diabéticas (Sepici-Dincel *et al.*, 2007). La hiperglucemia puede estar favorecida por una dieta de alta energía y alimentación a demanda, y es capaz de producir estrés oxidativo favoreciendo la formación de radicales libres (Kamalakkannan & Prince, 2006). El hígado de peces, donde se encuentran las células β en los islotes pancreáticos, posee gran cantidad de PUFAs. Estos son muy sensibles a la oxidación lipídica iniciada por radicales libres, por lo que pueden ser fácilmente afectados por este

proceso. De esta manera, la oxidación de los lípidos de la membrana reduce su funcionalidad afectando a la fluidez y a la actividad de enzimas y receptores acoplados a la misma (Arulselvan & Subramanian, 2007). Barkirel *et al.* (2008) demostraron la reducción de la oxidación lipídica en hígado de conejo al administrar extracto de romero en la dieta, mediante la reducción del índice de TBARS en este órgano. En nuestro estudio se observa una reducción del nivel de ALT en la sangre y tendencias a reducirse los niveles de ALP y AST, lo que también es indicativo de una mejor funcionalidad del hígado.

El efecto colerético observado por Hoefler *et al.*, (1987) también está relacionado con una mejor funcionalidad del hígado e implica una mayor eliminación de colesterol del torrente sanguíneo, al elevarse la producción de bilis. A su vez, la mayor producción de bilis puede mejorar la digestión de las grasas. El carnosol, presente en el extracto de romero, tiene la capacidad de inhibir la oxidación de la apolipoproteína B durante la formación de LDL (Zeng *et al.*, 2001), lo que podría significar una menor producción de esta lipoproteína por el hígado (Figura 9). Otros polifenoles son capaces de inhibir la ester colesterol transferasa (CETP) mejorando la estabilidad y la abundancia de la lipoproteína HDL en la sangre (Lam *et al.*, 2008)

Otra interesante vía de actuación del extracto de romero, más específica, es la inhibición de la enzima diacilglicerol-acil-transferasa (DGAT)(Cui *et al.*, 2008), presente en el hígado y en otros tejidos (Figura 9) y que participa en la síntesis de triglicéridos. Esta actividad podría ser, en parte, la base de varios de los efectos observados, ya que esta enzima es la diana de fármacos que reducen la cantidad de lípidos en la sangre y aumentan la sensibilidad a la insulina y el metabolismo energético (Chen *et al.*, 2005). Además el ácido carnósico bloquea la expresión de los genes PPAR γ , inhibiendo la mitosis de los adipocitos y afectando directamente al tejido adiposo.

Se ha demostrado un aumento de la eficiencia de retención de proteína en peces alimentados con dietas con compuestos procedentes de plantas aromáticas (Zheng *et al.*, 2009; Yilmaz *et al.*, 2012). Este efecto podría estar relacionado con la inhibición de la DGAT o la protección de las células β de los islotes pancreáticos, ya que la insulina promueve directamente la síntesis proteica (Dimitriadis *et al.*, 2011)(Figura 9).

El aceite esencial de tomillo parece tener un efecto similar en el metabolismo lipídico. Su inclusión en dietas para aves de corral produce cambios en índices somáticos, en la composición nutritiva del músculo (Bolukbasi *et al.*, 2006; El-Ghousein & Al-Beitawi, 2009) y en las lipoproteínas sanguíneas -principalmente HDL- (Toghyani *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta la alta capacidad antioxidante del aceite esencial de tomillo y del extracto de romero, tiene sentido que ejerzan un efecto similar en el metabolismo lipídico, al ser el estado oxidativo del hígado uno de los principales mecanismos de actuación (Bakirel *et al.*, 2008). Sin embargo, son necesarios estudios en este sentido con el aceite esencial de tomillo en peces para determinar la posible existencia de este efecto.

Varios de los parámetros sanguíneos que se modifican con la inclusión de extracto de romero en el pienso han sido propuestos como indicadores del bienestar de peces de acuicultura (Roncarati *et al.*, 2006). La mejora del bienestar de los peces de acuicultura puede influir en la calidad de los mismos y mejorar la imagen de la acuicultura intensiva. La reducción de estos indicadores, mediante la inclusión en la dieta de extracto de romero u otros antioxidantes naturales, le daría un doble valor al pescado. Sería un alimento más orgánico (sin aditivos sintéticos como el BHT) y a la vez mejoraría el bienestar durante el engorde para una producción más ecológica.

Además del beneficio en el bienestar animal existe una ventaja en cuanto a la utilización de nutrientes, ya que la acumulación de lípidos en el hígado implica un desperdicio de energía (Hansen *et al.*, 2008). En las últimas décadas se ha seguido la tendencia de mejorar el crecimiento y minimizar la producción de residuos nitrogenados mediante el aumento de la grasa de la dieta. Sin embargo, el nivel de grasa en la dieta suele estar estrechamente relacionado con el índice hepatosomático, que en algunas especies alcanza el doble que en peces salvajes (Shahidi & Dunajki, 1994). La capacidad del extracto de romero de reducir este índice y la esteatosis hepática asociada podría ser de gran utilidad para la optimización del aprovechamiento de dietas hipercalóricas.

2.3.5. Efecto de la adición de aceite esencial de tomillo sobre la funcionalidad del intestino de dorada.

El último experimento (Anexo II) mostró algunos de los efectos fisiológicos del aceite esencial de tomillo, sobre todo en el intestino. La elección de las dosis utilizadas y de varios de los aspectos estudiados fue con el objetivo de evaluar su efecto en el rendimiento y en la funcionalidad del intestino. En cerdo y aves de corral existen abundantes referencias bibliográficas acerca de estos efectos (Franz *et al.*, 2010). En peces, recientemente, se había demostrado el efecto beneficioso de un extracto de timol y carvacrol sobre el crecimiento y el aprovechamiento del alimento (Ahmadifar *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestros resultados muestran más bien lo contrario.

Aunque no se observan cambios en el crecimiento, el índice de conversión o la ingesta de proteína y energía digestible, se produce un descenso en la digestibilidad a las dosis de 2000 y 3000 mg/kg que puede indicar un leve empeoramiento de la funcionalidad del intestino. Además se producen importantes cambios histológicos, apreciándose una movilización de linfocitos a la mucosa subepitelial con dosis bajas - que sugiere una inmunoestimulación del GALT- y un efecto anti-inflamatorio con dosis altas de aceite esencial de tomillo (3000 y 4000 mg/kg).

La demostrada actividad antibacteriana de muchos aceites esenciales (Burt, 2004), los hace muy útiles en la sustitución de los antibióticos promotores del crecimiento, cuyo uso en animales está prohibido en la Unión Europea desde 2006. El modo de actuación de los compuestos antimicrobianos en la promoción del crecimiento puede deberse a cuatro mecanismos principales (Niewold, 2007):

- Inhibición de infecciones subclínicas, reduciendo por tanto el gasto metabólico del sistema inmune.
- Reducción de metabolitos que perjudican el crecimiento (p. ej. amonio)
- Reducción de la utilización microbiana de los nutrientes.
- Mejora de la absorción de nutrientes por una reducción del grosor de la pared intestinal (reducción de la inflamación normal).

Una de las ventajas que puede suponer el uso de aceites esenciales o extractos de plantas como sustitutos de antibióticos promotores del crecimiento es la gran cantidad

de compuestos antimicrobianos que poseen, lo que en principio debería dificultar la aparición de resistencias (Franz *et al.*, 2009).

La bibliografía existente acerca del efecto anti-inflamatorio “in vitro” del timol, el carvacrol y otros fenoles presentes en plantas (Ocaña & Reglero, 2012; Lima *et al.*, 2013; Romier *et al.*, 2009) y un estudio realizado en modelos animales (Nakhai *et al.*, 2006) nos hacen pensar que sea el principal efecto producido en el intestino de dorada a dosis altas. El punto de vista de Niewold *et al.*, (2007) del modo actuación de los antibióticos en el intestino es interesante para valorar posibles hipótesis sobre el modo de actuación de aceites esenciales y extractos de plantas. Este autor propone que la actividad intrínseca anti-inflamatoria de muchos antibióticos puede ser el principal modo de actuación de los antibióticos utilizados como promotores del crecimiento. Esta actividad anti-inflamatoria se había descrito ya en humanos proponiéndose una función inmunorreguladora (Labro *et al.*, 2000, 2001)

El intestino es un órgano en un estado de inflamación continua y controlada (Biancone *et al.*, 2002). Las citoquinas circulantes producidas durante la inflamación del intestino son capaces de inducir respuestas en varios tejidos, principalmente en el músculo, en el hígado y en el hipotálamo, produciendo en general un aumento del catabolismo energético y una reducción del apetito (Gruys *et al.*, 2006). Por tanto, el efecto anti-inflamatorio del timol podría ser una vía de actuación en el metabolismo energético de los peces.

La respuesta bifásica que encontramos ha sido observada para muchos fitobióticos y se suele achacar a una estimulación de ciertos sistemas antioxidantes y citoprotectores a dosis bajas y a la toxicidad del compuesto a dosis altas. Aunque la mejora del estatus antioxidante de animales que consumen polifenoles se ha atribuido a la actividad antioxidante de los mismos, existe una tendencia actual a dar más importancia a las vías de señalización de respuesta adaptativa al estrés que son activadas por estos compuestos a dosis bajas (Holst & Williamson, 2008; Murado & Vázquez, 2007; Mattson, 2008). Las concentraciones de fenoles que se pueden alcanzar en los tejidos son mucho más bajas que las de los antioxidantes propios y recientes estudios clínicos con dosis altas de antioxidantes han aportado resultados controvertidos (Mattson, 2008).

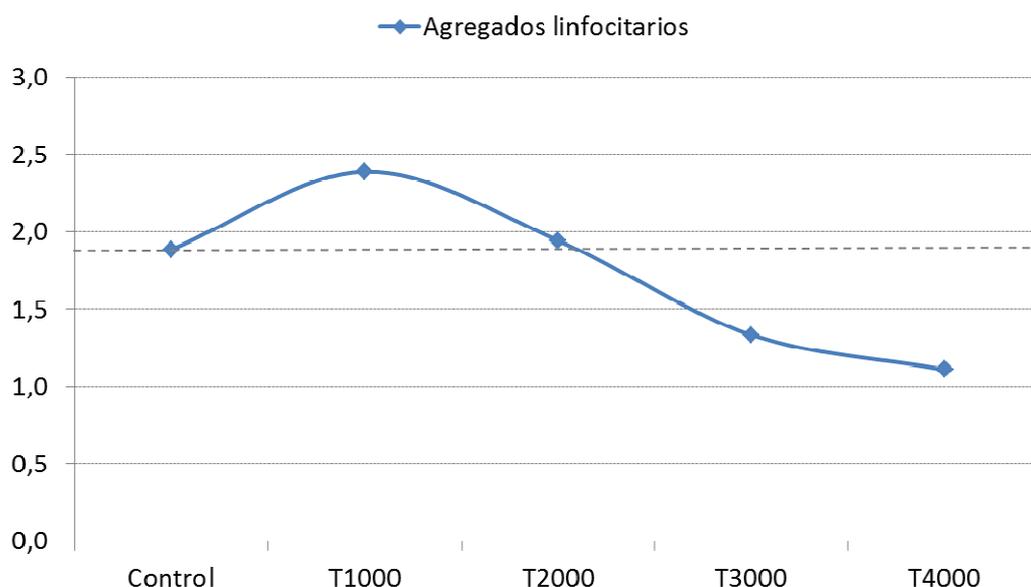


Figura 10. Cantidad de agregados linfocitarios (uds. relativas) en el intestino de dorada alimentada con dietas con distintas dosis de aceite esencial de tomillo.

Además la capacidad del timol de activar la expresión del grupo de genes “ARE”, que codifican enzimas citoprotectivas y con capacidad antioxidante como la glutatión-S-transferasa, apoya esta hipótesis. La amplitud del rango de dosis estudiado es crucial para la interpretación de la respuesta de organismos vivos frente a xenobióticos. En nuestro caso las diferencias observadas en agregados linfocitarios (Figura 10) concuerda con la definición de hormesis y los ejemplos expuestos por Murado & Vázquez (2008). Hasta la dosis de 2000 mg/kg se produciría una situación de hormesis o respuesta adaptativa y por encima de ésta existiría una inhibición del sistema inmune o un estado inflamatorio por debajo de lo normal.

Esto pone de manifiesto la importancia de la elección adecuada del rango de dosis a estudiar para evitar la pérdida de información en respuestas bifásicas. Los efectos adversos de dosis elevadas de vitaminas y/o antioxidantes es de creciente interés en la actualidad (Holst & Williamson, 2008) aunque ya era conocido en distintos fitoquímicos desde la antigüedad. De ahí la frase de Paracelso (S.XVI) “nada es veneno, todo es veneno; solo depende de la dosis”.

CONCLUSIONES

1.- El extracto de romero, añadido al pienso para peces, proporciona una protección similar al butil-hidroxitolueno frente a la oxidación lipídica, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración. La escasa actividad de los aceites esenciales de tomillo durante la elaboración del pienso y su almacenamiento a temperatura ambiente los hace poco apropiados como conservantes del pienso para peces.

2.- Tanto el extracto de romero como el aceite esencial de tomillo (quimiotipo timol) incorporados al pienso de dorada tienen un efecto beneficioso sobre la calidad final del pescado. La adición de extracto de romero al pienso produjo una mejora en la estabilidad oxidativa de los lípidos del pescado y un efecto beneficioso proporcional a la dosis en el índice de calidad. La adición de aceite esencial de tomillo al pienso no produjo cambios en parámetros físico-químicos ni en el índice de calidad del pescado fresco, únicamente mejoró el color de las agallas y aumentó la opacidad del mucus.

3.- El aceite esencial de tomillo y el extracto de romero añadidos al pienso de dorada tienen un efecto beneficioso sobre la conservación del pescado. Los parámetros físico-químicos muestran un efecto dosis-dependiente, con una dosis óptima de 600 mg/kg para el extracto de romero y proporcional a la dosis para el aceite esencial de tomillo. La calidad sensorial del pescado siguió tendencias similares y en ambos casos se tradujo en un incremento de la vida útil en un día, con independencia de la dosis.

4.- La adición de extracto de romero a la dieta de dorada reduce el desequilibrio en el metabolismo lipídico causado por la alimentación *ad libitum* con dietas hipercalóricas y condiciones intensivas de engorde. La reducción de la esteatosis hepática es el aspecto más evidente y posiblemente el más importante por el papel regulador del hígado. Tanto la histología como la bioquímica sanguínea señalan la dosis de 600 mg/kg como la óptima, mejorando notablemente la salud de los peces.

5.- El aceite esencial de tomillo añadido al pienso de dorada afecta a la funcionalidad del intestino en varios aspectos. El estado inflamatorio del intestino cambió en función de la dosis, aumentando con 1000 mg/kg y descendiendo con dosis superiores, hasta una marcada reducción aparente con 3000 y 4000 mg/kg. La digestibilidad de los nutrientes principales se ve reducida a dosis de 2000 y 3000 mg/kg, lo cual no se traduce en diferencias en índices de rendimiento.

PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN I

Natural antioxidants in extruded fish feed:
Protection at different storage temperatures.

Natural antioxidants in extruded fish feed: Protection at different storage temperatures.

A. Hernández, B. García García, M. J. Jordán, M. D. Hernández (2014).

Revista: Animal Feed Science and Technology.

DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2014.06.003

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840114001886>

ABSTRACT

This study examines five different specifically designed extruded fish feeds: BD (basal diet), without added antioxidants; BHT, with 200 mg/kg of butylhydroxytoluene; RO, with 600 mg/kg of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*); TC, with 500 mg/kg of thyme essential oil (*Thymbra capitata*, carvacrol chemotype); and TZ, with 500 mg/kg of thyme essential oil (*Thymus zygis*, subspecies *gracilis*, thymol chemotype). The feeds were produced by means of a cooking-extrusion process and were stored under standard conditions at two different average temperatures, either refrigerated (4 ± 1 °C) or at ambient temperature (20–28 °C). Samples were taken during processing (raw mix, recently extruded (moist) and dry feed) and at 4, 8, 12 and 24 weeks of storage. Both TBARS and induced TBARS were determined at each sampling point, as well as phenolic compounds content after feed processing. During the preparation process, the RO feed was the least oxidized and retained the least amount of phenols. The oxidative status of all feeds was maintained in cold storage, although the BD diet became less resistant to induced oxidation. At ambient temperature, the RO and BHT feeds showed the greatest protection against induced oxidation starting at week 8, and at the end of the storage period, the RO feed was the least oxidized. Overall, rosemary extract had a similar effect to that of butylhydroxytoluene on the processing and storage of extruded feed, and better than that of thyme essential oils.

PUBLICACIÓN II

Improved conservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in ice storage. The influence of doses of rosemary extract added to feed.

Improved conservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in ice storage. The influence of doses of rosemary extract added to feed.

A. Hernández, B. García García, M.J. Jordán, M.D. Hernández.

Revista: Aquaculture (2014), 426, 31-40.

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848614000337>

ABSTRACT

This study focused on the effects of the dose of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) on the quality of gilthead seabream. A control diet (basal diet) and four experimental diets (R600, R1200, R1800 and R2400) with 600, 1200, 1800 and 2400 mg kg⁻¹ of rosemary extract were administered, respectively. The fish were sacrificed and stored on ice at 4 °C for 0, 7, 14 and 21 days. Physical–chemical, microbiological and sensory tests were conducted at each sampling point to determine the degree of deterioration suffered by the gilthead seabream. The differences in water-holding capacity (WHC) and the trends in TBARS, TVBN and TMA observed suggest better preservation with the 600 mg kg⁻¹ dose. In addition, the Quality Index showed greater freshness in fish fed diets containing rosemary extract, regardless of the dose; shelf-life also increased by one day with all tested doses, as compared to the control group.

PUBLICACIÓN III

Study of the dose of thyme essential oil in feed to prolong the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*)

Study of the dose of thyme essential oil in feed to prolong the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*).

A. Hernández, B. García García, M.J. Jordán, M.D. Hernández.

Revista: Aquaculture Nutrition (2014)

DOI: 10.1111/anu.12196

URL: <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12196>

ABSTRACT

The effect of thyme essential oil (*Thymus zygis*, subspecies *gracilis*) on the quality and shelf life of gilthead seabream was studied, when added to the diet: a control diet and four experimental diets (T500, T1000, T1500, T2000) with 500, 1000, 1500 and 2000 mg kg⁻¹ of thyme essential oil, respectively. After 12 weeks of experimentation, the fish were stored on ice at 4 °C for 0, 7, 14 and 21 days. Physical–chemical, microbiological and sensory analyses were carried out at each sampling point to determine the degree of deterioration. A dose-dependent effect was observed on the colour, TBARS and total volatile basic nitrogen during the storage. Microbiological counts were lower for *Enterobacteriaceae* and coliforms at high doses of the essential oil. The sensory analysis showed an effect on the quality index that was not dependent on the dose, which extended the shelf life of gilthead seabream from 17 to 18 days for all doses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Adams, P.B., Lawson, S., Sanigorski, A., Sinclair, A.J., 1996. Arachidonic acid to eicosapentaenoic acid ratio in blood correlates positively with clinical symptoms of depression. *Lipids* 31(Suppl), S157–161.
- Ahmadifar, E., Falahatkar, B., & Akrami, R. (2011). Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(4), 1057-1060.
- Akhtar, P., Gray, J., Booren, A. M., & Garling, D. L. (1998). Effect of dietary components and surface application of oleoresin rosemary on lipid stability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle during refrigerated and frozen storage. *Journal of Food Lipids*, 5(1), 43-58.
- Al-Jamal, A., & Alqadi, T. (2011). Effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on lipid profile of diabetic rats. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 4(4), 199-204.
- Alcaraz, F., Sánchez-Gómez, P., & Correal, E., 1989. Catálogo de las plantas aromáticas, condimentarias y medicinales de la Región de Murcia. Monografías I.N.I.A. No. 67. Madrid.
- Alçiçek, Z. (2011). The effects of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil concentration on liquid-smoked vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) fillets during chilled storage. *Food Chemistry*, 128(3), 683–688.
- Alçiçek, A., Bozkurt, M., & Çabuk, M. (2004). The effect of an essential oil combination derived from selected herbs growing wild in Turkey on broiler performance. *South African Journal of Animal Science*, 33(2), 89-94.
- Álvarez, A., García García, B., Jordán, M. J., Martínez-Conesa, C., & Hernández, M. D. (2012). The effect of diets supplemented with thyme essential oils and rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during storage on ice. *Food Chemistry*, 132(3), 1395-1405.

Alves Martins, D., Afonso, L.O., Hosoya, S., Lewis-McCrea, L.M., Valente, L.M., & Lall, S.P., 2007. Effects of moderately oxidized dietary lipid and the role of vitamin E on the stress response in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 272 (1), 573-580.

Amin, A., & Hamza, A. A. (2005). Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sciences*, 77(3), 266-278.

Angiş, S., & Oğuzhan, P. (2013). Effect of thyme essential oil and packaging treatments on chemical and microbiological properties of fresh rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during storage at refrigerator temperatures. *African Journal of Microbiology Research*, 7(13), 1136-1143.

APROMAR, 2013. La Acuicultura Marina de Peces en España 2013. <http://www.apromar.es/informes.asp>

Arulselvan, P., & Subramanian, S. P. (2007). Beneficial effects of *Murraya koenigii* leaves on antioxidant defense system and ultra structural changes of pancreatic β -cells in experimental diabetes in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 165(2), 155-164.

Attouchi, M., & Sadok, S. (2010). The effect of powdered thyme sprinkling on quality changes of wild and farmed gilthead sea bream fillets stored in ice. *Food Chemistry*, 119(4), 1527-1534.

B

Bakhy, K., Benlhabib, O., Al Faiz, C., Bighelli, A., Casanova, J., & Tomi, F. (2013). Wild *Thymbra capitata* from Western Rif (Morocco): essential oil composition, chemical homogeneity and yield variability. *Natural Product Communications*, 8(8), 1155-1158.

Bakirel, T., Bakirel, U., Keleş, O. Ü., Ülgen, S. G., & Yardibi, H. (2008). In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus*

- officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 64-73.
- Bang, H. O., & Dyerberg, J. (1980). Lipid metabolism and ischemic heart disease in Greenland Eskimos. In *Advances in nutritional research* (pp. 1-22). Springer US.
- Baratta, M. T., Dorman, H. J., Deans, S. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and fragrance journal*, 13(4), 235-244.
- Barbut, S., Josephson, D. B., & Maurer, A. J. (1985). Antioxidant properties of rosemary oleoresin in turkey sausage. *Journal of Food Science*, 50(5), 1356-1359.
- Barlow, S. M. (1990). Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. En: B. J. F. Hudson (Ed.), *Food antioxidants* (pp. 253–307). London: Elsevier.
- Bayer, E.; Buttler K.P., Finkenzeller X., & Grau J. (1989). *Plantas del Mediterráneo*. Blume. Barcelona.
- Bell, J. G., McGhee, F., Dick, J. R., & Tocher, D. R. (2005). Dioxin and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Scottish farmed salmon (*Salmo salar*): effects of replacement of dietary marine fish oil with vegetable oils. *Aquaculture*, 243(1), 305-314.
- Berry, E.M., 1997. Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66 (Suppl), 991s–1007s.
- Biancone, L., I. Monteleone, G. Del Vecchio Blanco, P. Vavassori, and F. Pallone. 2002. Resident bacterial flora and immune system. *Digestive and Liver Disease*, 34, S37–S43.
- Bölükbaşı, S. C., Erhan, M. K., & Ozkan, A. (2006). Effect of dietary thyme oil and vitamin E on growth, lipid oxidation, meat fatty acid composition and serum lipoproteins of broilers. *South African Journal of Animal Science*, 36(3), p-189.

- Botsoglou, N. A., Yannakopoulos, A. L., Fletouris, D. J., Tserveni-Goussi, A. S., & Fortomaris, P. D. (1997). Effect of dietary thyme on the oxidative stability of egg yolk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 3711-3716.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., & Anackov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1822-1828.
- Bremner, H. A. (1985). A convenient easy-to-use system for estimating the quality of chilled seafoods. In D. N. Scott, & G. Summers (Eds.), *Proceedings of the fish processing conference*, Fish Processing Bulletin, vol. 7, 23–25 April (pp. 59–70). Wellington: DSIR ISSN 0112-4633.
- Brenes, A., & Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 158(1), 1-14.
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221-247.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 223-253.

C

- Caballero, M. J., Betancor, M., Escrig, J. C., Montero, D., Espinosa de los Monteros, A., Castro, P., Ginés, R., & Izquierdo, M. (2009). *Post mortem* changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture*, 291(3), 210-216.
- Chang, S.S., Ostric-Matijasevic, B., Hsieh, O.A.L., & Huang, C.L. (1977). Natural antioxidants from rosemary and sage. *Journal of Food Science*, 42: 1102-1106.
- Chen, H.C., Farese, R.V., 2005. Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity lessons from DGAT1-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 25 (3), 482-486.

- Chen, C., Pearson, A. M., & Gray, J. I. (1992). Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry*, 43(3), 177-183.
- Chipault, J. H., Mizuno, G. R., Hawkins, J. M., & Lundberg, W. O. (1952). The antioxidant properties of natural spices. *Journal of Food Science*, 17(1-6), 46-55.
- Chipault, J. R., Mizuno, G. R., & Lundberg, W. O. (1955). Antioxidant properties of spices in oil-in-water emulsions. *Journal of Food Science*, 20(5), 443-448.
- CIE (1978): Recommendations on Uniform Color Spaces. Color-difference Equations. Psychometric Color Terms. Supplement No. 2 to CIE Publication No. 15 (E-13.1)1971/(TC-1.3), Paris: Bureau Central de la CIE.
- Çoban, Ö.E. & Özpolat, E., 2013. The effects of different concentrations of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the shelf life of hot-smoked and vacuum-packed fillets. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37, 269–274.
- Cross, D. E., McDevitt, R. M., Hillman, K., & Acamovic, T. (2007). The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British poultry science*, 48(4), 496-506.
- Cui, L., Kim, M. O., Seo, J. H., Kim, I. S., Kim, N. Y., Lee, S. H., ... & Lee, H. S. (2012). Abietane diterpenoids of *Rosmarinus officinalis* and their diacylglycerol acyltransferase-inhibitory activity. *Food Chemistry*, 132(4), 1775-1780.
- Cuvelier, M.E., Richard, H., & Berset *Luciobarbus esocinus*, 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.

D

- Dalgaard, P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology* 26, 319-333.

Davidson P. M. (1993). Parabens and phenolic compounds. En: P. M. Davidson y A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in foods* (pp. 263–306). New York: Marcel Dekker.

Day C.P., Oliver F.W.J., 1998. Hepatic steatosis: Innocent bystander or guilty party? *Hepatology* 27 (6): 1463-1466.

del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., del Río, J. A., Ortuño, A., Quirin K.W., & Gerard, D. (2003). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4247-4253.

Di Turi, L., Ragni, M., Caputi, Jambrenghi A., Lastilla, M., Vicenti, A., Colonna, M.A., Giannico, F., Vonghia, G., 2009. Effect of dietary rosemary oil on growth performance and flesh quality of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Italian Journal of Animal Science*, 8, 857–859.

Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., & Raptis, S. A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93, S52-S59.

E

EEC, 1994. European Union Commission Decision 94/356/EC of 20 May 1994 laying down detailed rules for the application of Council Directive 91/493/EEC, as regards own health checks on fishery products. *Official Journal of the European Communities* L 156, 50-57.

El-Alim, S. S. L. A., Lugasi, A., Hóvári, J., & Dworschák, E. (1999). Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(2), 277-285.

El-Ghousein, S. S., & Al-Beitawi, N. A. (2009). The effect of feeding of crushed thyme (*Thymus vulgaris* L) on growth, blood constituents, gastrointestinal tract and

carcass characteristics of broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*, 46(2), 100-104.

Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat science*, 86(2), 283-288.

Erkan, N., Tosun, Ş. Y., Ulusoy, Ş., & Üretener, G. (2011). The use of thyme and laurel essential oil treatments to extend the shelf life of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) during storage in ice. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 6(1), 39-48.

Estévez, M., & Cava, R. (2004). Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pate. *Meat Science*, 68, 551–558.

F

Fang, X., & Wada, S. (1993). Enhancing the antioxidant effect of α -tocopherol with rosemary in inhibiting catalyzed oxidation caused by Fe^{2+} and hemoprotein. *Food Research Internacional*, 26: 405–411.

FAO, 2007. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2006. Departamento de Pesca y acuicultura de la FAO. Roma. Italia.

FAO, 2009). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Departamento de Pesca y acuicultura de la FAO. Roma. Italia.

FAO, 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Departamento de Pesca y acuicultura de la FAO. Roma. Italia.

Farag, R. S., Badei, A. Z. M. A., Hewedi, F. M., & El-Baroty, G. S. A. (1989). Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 66(6), 792-799.

Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Salgueiro, L., Miguel, M. G., & Faleiro, M. L. (2008). Portuguese *Thymbra* and *Thymus* species volatiles: chemical

composition and biological activities. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29), 3120-3140.

Florou-Paneri, P., Dotas, D., Mitsopoulos, I., Dotas, V., Botsoglou, E., Nikolakakis, I., & Botsoglou, N. (2006). Effect of feeding rosemary and α -tocoferol acetate on hen performance and egg quality. *The Journal of Poultry Science*, 43:143-149.

Font Quer, P., 1981. *Plantas medicinales. El Dioscórides renovado*. Editorial labor. Barcelona.

Frankel, E.N. (1985). Chemistry of autoxidation: Mechanism, products and flavor significance. En: *Flavour Chemistry of Fats and Oils*. pp. 1-37. D.B. Min; T.H. Smouse (Eds.). American Oil Chemists' Society: Champaign, IL.

Franz, C., Baser, K. H. C., & Windisch, W. (2010). Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. A review. *Flavour And Fragrance Journal*, 25(5), 327-340.

Fraser, O.P., y Sumar, S. (1998). Compositional changes and spoilage in fish (part II) parte II –microbiological induced deterioration. *Nutrition and Food Science* 6, 325-329.

Fung, D.Y.C., Taylor, S., & Kahan, J. (1977). Effect of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Safety*, 1: 39-51.

G

Gaya, M., Repetto, V., Toneatto, J., Anesini, C., Piwien-Pilipuk, G., Moreno, S., 2013. Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in *Rosmarinus officinalis*, is exerted through the C/EBPs and PPAR γ pathways at the onset of the differentiation program. *BBA-Gen. Subjects* 1830 (6), 3796-3806.

Ghaly, A. E., Dave, D., Budge, S., & Brooks, M. S. (2010). Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: review. *American Journal of Applied Sciences*, 7(7), 859.

- Giannenas, I., Triantafyllou, E., Stavrakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T., & Karagouni, E. (2012). Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350, 26-32.
- Giménez, B., Roncalés, P., & Beltrán, J. A. (2004). The effects of natural antioxidants and lighting conditions on the quality characteristics of gilthead seabream fillets (*Sparus aurata*) packaged in a modified atmosphere. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(9), 1053-1060.
- Gjedrem, T., Robinson, N., & Rye, M. (2012). The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. *Aquaculture*, 350, 117-129.
- Gómez-Sánchez, A., Hermosín, I., Maya, I., 1992. Influence of malondialdehyde on the Maillard degradation of Amadori compounds. *Carbohydrate Research*, 229 (2), 307-322.
- Goulas, A. E., & Kontominas, M. G. (2005). Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 93(3), 511-520.
- Gould, G.W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of Food Protection (Supl)*, 82-86.
- Gouveia, L., & Empis, J. (2003). Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(2), 227-233.
- Govaris, A., Florou-Paneri, P., Botsoglou, E., Giannenas, I., Amvrosiadis, I., & Botsoglou, N. (2007). The inhibitory potential of feed supplementation with rosemary and/or α -tocopheryl acetate on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*, 40(2), 331-337.

- Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International journal of food microbiology*, 33(1), 121-137.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1), 79-97.
- Gruys, E., M. J. M. Toussaint, T. A. Niewold, S. J. Koopmans, E. van Dijk, and R. H. Melen. 2006. Monitoring health by values of acute phase proteins. *Acta Histochemica*, 108, 229–232.
- Guallar, E., Sanz-Gallardo, M. I., Veer, P. V. T., Bode, P., Aro, A., Gómez-Aracena, J., Kark, J. D., Riemersma, R. A., Martin-Moreno, J. M. & Kok, F. J. (2002). Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*, 347(22), 1747-1754.

H

- Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., y Holzapfel, W. (1994). Biogenic amine and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology* 5, 42-49.
- Hall, J.L., Harrison, D.L., & Mackintosh, D.L. (1962). Counter effect of sodium chloride and sage on development of peroxide in frozen stored sausage. *Food Technology*, 16: 102-104.
- Hamre, K., Kolås, K., & Sandnes, K. (2010). Protection of fish feed, made directly from marine raw materials, with natural antioxidants. *Food chemistry*, 119(1), 270-278.
- Hamre, K., Lie, Ø., & Sandnes, K. (2003). Development of lipid oxidation and flesh colour in frozen stored fillets of Norwegian spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.). Effects of treatment with ascorbic acid. *Food Chemistry*, 82(3), 447-453.
- Hansen, J.Ø., Berge, G.M., Hillestad, M., Krogdahl, Å., Galloway, T.F., Holm, H., Holm, J., & Ruyter, B. (2008). Apparent digestion and apparent retention of

- lipid and fatty acids in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed increasing dietary lipid levels. *Aquaculture*, 284 (1), 159-166.
- Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., & Gelman, A. (2003). Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*, 66(3), 410-417.
- Hernández, M. D., López, M. B., Alvarez, A., Ferrandini, E., García García, B., & Garrido, M. D. (2009). Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage. *Food Chemistry*, 114(1), 237-245.
- Hoefler, C., Fleurentin, J., Mortier, F., Pelt, J.M., Guillemain, J., 1987. Comparative choleric and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of *Rosmarinus officinalis* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 19(2), 133-143.
- Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 73-82.
- Houlihan, C. M., Ho, C. T., & Chang, S. S. (1984). Elucidation of the chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(6), 1036-1039.
- Houlihan, C. M., Ho, C. T., & Chang, S. S. (1985). The structure of rosmariquinone—A new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62(1), 96-98.
- Howgate, P., Johnston, A., y Whittle, K.J. (1992). Multilingual guide to EC freshness grades for fishery products. Torry Research Station. Aberdeen, Escocia.
- Hughes, R.B. and N.R. Jones (1966). Measurement of hypoxanthine concentration in canned herring as an index of the freshness of the raw material, with a comment of flavour relations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 17, 434-436.

Huidobro, A., Pastor, A., & Tejada, M. (2000). Quality index method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science*, 65(7), 1202-1205.

Hung, S. S. O., Cho, C. Y., & Slinger, S. J. (1980). Measurement of oxidation in fish oil and its effect on vitamin E nutrition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(8), 1248-1253.

Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO fisheries technical paper*, (348).

I

Ibáñez, F.C., y Barcina, Y. (2001). *Análisis sensorial de los alimentos. Métodos y aplicaciones*. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica.

Imaida, K., Fukushima, S., Shirai, T., Masui, T., Ogiso, T., & Ito, N. (1984). Promoting activities of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and sodium L-ascorbate on forestomach and urinary bladder carcinogenesis initiated with methylnitrosourea in F344 male rats. *Gann*, 75(9), 769-775.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1986. Sampling plans for fish and shellfish. In: ICMSF, *Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications*, 2nd Edition, Vol. 2. University of Toronto Press, Toronto, Canada, pp. 181-196.

Ito, N., Fukushima, S., & Tsuda, H. (1985). Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 15(2), 109-150.

Ivanovic, J., Misic, D., Zizovic, I., & Ristic, M. (2012). *In vitro* control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. *Food Control*, 25(1), 110-116.

J

Jang, I. S., Ko, Y. H., Yang, H. Y., Ha, J. S., Kim, J. Y., Kim, J. Y., Kang, S. Y., Yoo, D. H., Nam, D. S., Kim, D. H. & Lee, C. Y. (2004). Influence of essential oil

- components on growth performance and the functional activity of the pancreas and small intestine in broiler chickens. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 17(3), 394-400.
- Janz, J.A.M., Morel, P.C.H., Wilkinson, B.H.P., & Purchas, R.H. (2007). Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. *Meat Science*, 75: 360-365.
- Jerrett, A. R., Stevens, J., & Holland, A. J. (1996). Tensile properties of white muscle in rested and exhausted chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Food Science*, 61(3), 527-532.
- Joint FAO/WHO Expert Consultation (2009) Fats and fatty acids in human nutrition. *Annals of Nutrition and Metabolism* 55, 1-3.
- Jonsdottir, S. (1992). Quality index method and TQM system. En R. Olafsson y A.H. Ingthorsson (Eds.), *Quality issues in the fish Industry*. Islandia: The Research Liaison Office, University of Iceland. En: H.H. Huss (Ed.), *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper No. 348. FAO, Rome, Italy.
- Jordán, M. J., Castillo, J., Bañón, S., Martínez-Conesa, C., & Sotomayor, J. A. (2014). Relevance of the carnosic acid/carnosol ratio for the level of rosemary diterpene transfer and for improving lamb meat antioxidant status. *Food chemistry*, 151, 212-218.
- Jordán, M. J., Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S., & Sotomayor, J. A. (2013). Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract. *Industrial Crops and Products*, 48, 144-152.
- Jordan, M. J., Martinez, C., Monino, M. I., Lopez, M. B., Ferrandini, E., Lafuente, A., & Sotomayor, J. A. (2007). Murciano-Granadina goat feeding with aromatic plant by-products. Effect on the milk production and presence of polyphenols in "Al Vino" Murciano goat cheese. *Planta Medica*, 73(09), P_321.

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.

K

Kamalakkannan, N., Prince, P.S.M., 2006. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98 (1), 97-103.

Kanner, J. & Rosenthal, I. (1992). An Assessment of Lipid Oxidation in foods - Technical Report. *Pure Appl. Chem.* 64, 1959-1964.

Kiessling, A., T. Aasgaard, T. Storebakken, L. Johansson and K.H. Kiessling (1991). Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. III. Chemical composition. *Aquaculture*. 93, 373-387.

Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, N.I., y Kontominas, M.G. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology* 26, 475-482.

Kroismayr A, Sehm J, Pfaffl M, Plitzner C, Foissy H, Etle T, Mayer H, Schreiner M, & Windisch W (2008) Effects of essential oils or Avilamycin on gut microbiology and blood parameters of weaned piglets. *Czech Journal of Animal Science* 53:377–387.

Kyranas, V. R., Lougovois, V. P., & Valsamis, D. S. (1997). Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *International Journal of Food Science & Technology*, 32(4), 339-347.

L

- Labro, M. T. (2000). Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 615-650.
- Labro, M. T., & Abdelghaffar, H. (2001). Immunomodulation by macrolide antibiotics. *Journal of Chemotherapy*, 13(1), 3-8.
- Lai, S.H., Gray, J.I., Smith, D.M., Booren, A.M., Crackel, R.L., & Buckley, D.J. (1991). Effects of oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. *Journal of Food Science*, 56: 616-620.
- Lall, S.P., Lewis-McCrea, L.M., 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish—an overview. *Aquaculture* 267 (1), 3-19.
- Lam, C. K., Zhang, Z., Yu, H., Tsang, S. Y., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2008). Apple polyphenols inhibit plasma CETP activity and reduce the ratio of non-HDL to HDL cholesterol. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(8), 950-958.
- LeBlanc, R.J., and T.A. Gill (1984). Ammonia as an objective quality index in squid. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 17, 195-201.
- Lee, K. W., Everts, H., Kappert, H. J., Frehner, M., Losa, R., & Beynen, A. C. (2003). Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *British Poultry Science*, 44(3), 450-457.
- Li, T., Hu, W., Li, J., Zhang, X., Zhu, J., & Li, X. (2012). Coating effects of tea polyphenol and rosemary extract combined with chitosan on the storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Food Control*, 25(1), 101-106.
- Lima, M. D. S., Quintans-Júnior, L. J., de Santana, W. A., Martins Kaneto, C., Pereira Soares, M. B., & Villarreal, C. F. (2013). Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *European journal of pharmacology*, 699(1), 112-117.

Liotta, L., Chiofalo, B., Presti, V. L., Piccolo, D., & Chiofalo, V. (2010). Rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) supplementation into the diet of Nero Siciliano pigs: effects on lipid oxidation. *Italian Journal of Animal Science*, 6(1s), 306-308.

Lopez-Bote, C. J., Gray, J. I., Gomaa, E. A., & Flegal, C. J. (1998). Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. *British Poultry Science*, 39(2), 235-240.

Love, R.M. (1970). *The Chemical Biology of Fishes*. Academic Press. London.

Lukiw, W. J., & Bazan, N. G. (2008). Docosahexaenoic acid and the aging brain. *The Journal of nutrition*, 138 (12), 2510-2514.

M

Mahmoud, B. S., Yamazaki, K., Miyashita, K., Il-Shik, S., Dong-Suk, C., & Suzuki, T. (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*, 21(6), 657-666.

Manzanilla, E. G., Perez, J. F., Martin, M., Kamel, C., Baucells, F., & Gasa, J. (2004). Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 82(11), 3210-3218.

Marin, M., Koko, V., Duletić-Laušević, S., Marin, P. D., Rančić, D., & Dajic-Stevanovic, Z. (2006). Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry. *South African Journal of Botany*, 72(3), 378-382.

Martinsdóttir, E., Sveinsdóttir, K., Luten, J., Schelvis-Smit, R., & Hyldig, G. (2001). Sensory evaluation of fish freshness. A reference manual for the fish industry. QIM-Eurofish, Ijmuiden, The Netherlands. Disponible en www.qim-eurofish.com.

Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 1-7.

- Miceli, A., Negro, C., & Tommasi, L. (2006). Essential oil variability in *Thymbra capitata* (L.) Cav. growing wild in Southern Apulia (Italy). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(6), 528-535.
- Miguel, G., Simoes, M., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Carvalho, L. (2004). Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food chemistry*, 86(2), 183-188.
- Miralles, S., Medina de Dias, R., Zimmermann, M. E., & Amadio, C. (2008). Efecto del aceite esencial de tomillo mendocino (*Acantolippia seriphioides*) en la cinética de la oxidación de lípidos. *La industria cárnica latinoamericana.*, 28(151), 58-63.
- Moñino, M.I., Martínez, C., Sotomayor, J. A., Lafuente, A. & Jordán, M. J. (2008). Polyphenolic transmission to segureño lamb meat from ewes dietary supplemented with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 3363-3367.
- Morales, R. (1986) Taxonomía de los géneros *Thymus* excluida la sección *Serpyllum* y *Thymbra* en la Península Ibérica. Monografías del Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Morales R. (2002). The history, botany and taxonomy of the genus. En: Stahl-Biskup E, Sáez F, Eds. *Medicinal and Aromatic Plants – industrial profiles 17*: 1-43. Taylor & Francis, London.
- Morales, R. (2010) *Rosmarinus* L. En: Morales R. et al. (eds.). *Flora iberica* 12: 327–331. Real Jardín Botánico, C.S.I.C., Madrid.
- Moreno, J.C., coord. (2008). Lista Roja 2008 de la flora vascular española. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas), Madrid, 86 pp.
- Muñoz, F. (1987). *Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado*. Madrid: Editorial Mundi-Prensa, pp 365.

Murado, M. A., & Vázquez, J. A. (2007). The notion of hormesis and the dose–response theory: a unified approach. *Journal of Theoretical Biology*, 244(3), 489-499.

Muramoto, M., Y. Yamamoto, and N. Seki (1989). Comparison of calpain of various fish myosins in relation to their thermal stabilities. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 55, 917-923.

Murkovic, M., Steinberger, D., & Pfannhauser, W. (1998). Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 207(6), 477-480.

N

Nakatani, N., & Inatani, R. (1984). Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) and a revised structure for rosmanol. *Agricultural and Biological Chemistry* 48, 2081-2085.

Nakhai, L.A., Mohammadirad, A., Yasa, N., Minaie, B., Nikfar, S., Ghazanfari, G., Zamani, M.J., Dehghan, G., Jamshidi, H., Boushehri, V.S., Khorasani, R., & Abdollahi, M. (2007). Benefits of *Zataria multiflora* Boiss in experimental model of mouse inflammatory bowel disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4(1), 43-50.

Nanto, H., H. Sokooshi and T. Kawai (1993). Aluminium-doped ZnO thin film gas sensor capable of detecting freshness of sea foods. *Sensors and Actuators* 13-14.

Navarrete, P., Toledo, I., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R., & Romero, J. (2010). Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. *Aquaculture Research*, 41(10), e667-e678.

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., Bañón, S., & Garrido, M. D. (2012). Administration of distillate thyme leaves into the diet of Segureña ewes: effect on lamb meat quality. *Animal*, 6(12), 2048-2056.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., & Garrido, M. D. (2010a). 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.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., & Garrido, M. D. (2010b). Effect on lamb meat quality of including thyme (*Thymus zygis* ssp. *gracilis*) leaves in ewes' diet. *Meat science*, 85(1), 82-88.
- Nieto, G., Jongberg, S., Andersen, M. L., & Skibsted, L. H. (2013). Thiol oxidation and protein cross-link formation during chill storage of pork patties added essential oil of oregano, rosemary, or garlic. *Meat Science*, 95(2), 177-184.
- Niewold, T. A. (2007). The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poultry Science*, 86(4), 605-609.
- Ntzimani, A. G., Giatrakou, V. I., and Savvaidis, I. N. (2010). Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4 °C: microbiological and sensory evaluation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), 187-196.
- Nursten, H. E. (2005) *The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry And Implications*. Royal Society of Chemistry: Londres.

O

- O'Grady, M.N., Maher, M., Troy, D.J., Moloney, A.P., & Kerry, J.P. (2006). An assessment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Science*, 73: 132-143.

- Obach, A., & Laurencin, F.B., 1992. Effects of dietary oxidized fish oil and deficiency of anti-oxidants on the immune response of turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 107 (2), 221-228.
- Ocaña, A., & Reglero, G. (2012). Effects of thyme extract oils (from *thymus vulgaris*, *thymus zygis*, and *thymus hyemalis*) on cytokine production and gene expression of oxLDL-stimulated THP-1-macrophages. *Journal of Obesity*, DOI:10.1155/2012/104706
- Olafsdottir, G., Nesvadba, P., Natale, C.D., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadóttir, S.V., Schubring, R., Kroeger, M., Heia, K., Esaiassen, M., Macagnano, A., & Jørgenseng, B. M. (2004). Multisensor for fish quality determination. *Trends in Food Science and Technology* 15, 86-93.
- B.O.E (1991): Orden de 2 de agosto de 1991 por la que se aprueban las normas microbiológicas, los límites de contenido en metales pesados y los métodos analíticos para la determinación de metales pesados para los productos de la pesca y de la acuicultura, publicada en el Boletín Oficial del Estado el 15/8/91.
- Ordóñez Pereda, J.A. (1998). Características generales del pescado. En *Tecnología de los alimentos* (1ª ed, Vol.II). Vallehermoso, Madrid: Editorial Síntesis.
- Orencia, A.J., Daviglius, M.L., Dyer, A.R., Shekelle, R.B., Stamler, J., 1996. Fish consumption and stroke in men: 30 year findings of Chicago Western Electric Study. *Stroke* 27 (7), 204–209.
- Osada, Y., & Shibamoto, T., (2006). Antioxidative activity of volatile extracts from Maillard model systems. *Food Chemistry*, 98 (3), 522-528.
- Ozogul, Y., Ayas, D., Yazgan, H., Ozogul, F., Boga, E. K., & Ozyurt, G. (2010). The capability of rosemary extract in preventing oxidation of fish lipid. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(8), 1717-1723.
- Ozogul, Y., Durmuş, M., Balıkcı, E., Ozogul, F., Ayas, D., & Yazgan, H. (2011). The effects of the combination of freezing and the use of natural antioxidant

- technology on the quality of frozen sardine fillets (*Sardinella aurita*). *International Journal Of Food Science & Technology*, 46(2), 236-242.
- Ozogul, Y., Ozyurt, G., & Kuley Boga, E. (2009). Effects of cooking and reheating methods on the fatty acid profile of sea bream treated with rosemary extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(9), 1481-1489.
- Özyurt, G., Kuley, E., Balıkçı, E., Kaçar, Ç., Gökdoğan, S., Etyemez, M., & Özogul, F. (2012). Effect of the icing with rosemary extract on the oxidative stability and biogenic amine formation in sardine (*Sardinella aurita*) during chilled storage. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7), 2777-2786.
- Özyurt, G., Özkütük, A. S., & Polat, A. (2011). Capability of the rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the oxidative stability of cooked sea bream (*Sparus aurata*) during frozen storage. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 6(2), 167-174.
- P**
- Parpinello, G.P., Meluzzi, A., Sirri, F., Tallarico, N., & Versari, A. (2006). Sensory evaluation of egg products and eggs laid from hens fed diets with different fatty acid composition and supplemented with antioxidants. *Food Research International*, 39: 47-52.
- Pavlidis, M., Papandroulakis, N., & Divanach, P. (2006). A method for the comparison of chromaticity parameters in fish skin: Preliminary results for colouration pattern of red skin Sparidae. *Aquaculture*, 258, 211–219.
- Peiretti, P. G., Gai, F., Ortoffi, M., Aigotti, R., & Medana, C. (2012). Effects of rosemary oil (*Rosmarinus officinalis*) on the shelf-life of minced rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during refrigerated storage. *Foods*, 1(1), 28-39.
- Piclet, G. (1987). Le poisson aliment. Composition-intérêt nutritionnel. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique*, 22(4), 317-336.
- Platel, K., & Srinivasan, K. (2004). Digestive stimulant action of spices: a myth or reality?. *The Indian Journal of Medical Research*, 119(5), 167-179.

Pokorný, J. (1991). Natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science & Technology*, 2, 223-227.

Q

Quitral, V., Donoso, M. L., Ortiz, J., Herrera, M. V., Araya, H., & Aubourg, S. P. (2009). Chemical changes during the chilled storage of Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*): Effect of a plant-extract icing system. *LWT-Food Science and Technology*, 42(8), 1450-1454.

R

Raskin, I., Ribnicky, D. M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., ... & Fridlender, B. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*, 20 (12), 522-531.

Reglamento Europeo 344/2011. Reglamento de ejecución (UE) n° 344/2011 de la comisión de 8 de abril de 2011 que modifica el Reglamento (CE) n° 889/2008, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) no 834/2007 del Consejo, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control.

Reglamento Europeo 834/2007. Council Regulation No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91. *Official Journal of the European Union* L 189(1), 28-7.

Rehbein, H. & Oehlenschlager, J. (1982). Zur Zusammensetzung der TVB-N fraktion (fluchtige Basen) in sauren Extrakten und alkalischen Destillaten von Seefischfilet. *Arch. für Lebensmittelhyg.* 33, 44-48.

Romier, B., Schneider, Y. J., Larondelle, Y., & During, A. (2009). Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutrition reviews*, 67(7), 363-378.

Romo Vaquero M., Yáñez-Gascón M.J., Rocío García Villalba R., Larrosa M., Fromentin E., Ibarra A., Soller M., Tomás-Barberá F., Espín de Gea J.C.,

- García-Conesa M.T., 2012. Inhibition of gastric lipase as a mechanism for body weight and plasma lipids reduction in Zucker rats fed a rosemary extract rich in carnosic acid. *Plos One* 7, e39773.
- Roncarati, A., Melotti, P., Dees, A., Mordenti, O., Angellotti, L., 2006. Welfare status of cultured seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and seabream (*Sparus aurata* L.) assessed by blood parameters and tissue characteristics. *Journal of Applied Ichthyology*, 22 (3), 225-234.
- Rose, D.P., 1997. Dietary fatty acids and cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66 (Suppl), 998s–1003s.
- Rota, M.C., Herrera, A., Martínez, R.M., Sotomayor, José A., & Jordán, M.J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oil. *Food Control*, 19: 687-687.
- Rubio, A. R. (2004). Acuicultura en Mar Abierto: Plataformas Nodrizas. *Ingeniería naval*, (813), 86-94.
- Ruff, N., Fitzgerald, R. D., Cross, T. F., Hamre, K., & Kerry, J. P. (2003). The effect of dietary vitamin E and C level on market - size turbot (*Scophthalmus maximus*) fillet quality. *Aquaculture Nutrition*, 9(2), 91-103.

S

- Saenz-López, R., Fernandez-Zurbano, P., & Tena, M.T. (2002). Capillary electrophoretic separation of phenolic diterpenes from rosemary. *Journal of Chromatography*, 953: 251-256.
- Sáez, F. (1995). Essential oil variability of *Thymus zygis* growing wild in southeastern Spain. *Phytochemistry*, 40(3), 819-825.
- Saito, T., K., Arai and M. Matsuyoshi (1959). A new method for estimating the freshness of fish. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 24, 749-50.

- Sandnes, K., & Utne, F., (1982). Processing loss and storage stability of ascorbic acid in dry fish feed. *Fiskeridirektoratets Skrifter, Serie Ernaering*, 2, 39–44.
- Sant'Ana, L. S., & Mancini-Filho, J. (2000). Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillets. *Food Chemistry*, 68(2), 175-178.
- Selmi, S., & Sadok, S. (2008). The effect of natural antioxidant (*Thymus vulgaris* Linnaeus) on flesh quality of tuna (*Thunnus thynnus* (Linnaeus)) during chilled storage. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3(1), 36-45.
- Sepici-Dincel, A., Açıkgöz, Ş., Çevik, C., Sengelen, M., & Yeşilada, E. (2007). Effects of in vivo antioxidant enzyme activities of myrtle oil in normoglycaemic and alloxan diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(3), 498-503.
- Shahidi, F. (1997). *Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications*. The American Oil Chemists Society. ISBN: 0-935315-77-2.
- Shahidi, F., & Dunajski, E. (1994). Lipid fatty acids, growth and compositional characteristics of farmed cod (*Gadus morhua*). *Journal of Food Lipids*, 1(4), 265-271.
- Shapiro, S., & Guggenheim, B. (1995). The action of thymosin on oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 10(4): 241-246.
- Shewan, J.M., Macintosh, R.G., Tucker, C.G., & Ehrenberg, A.S.C. (1953). The development of a numerical scoring system for the sensory assessment of the spoilage of wet white fish stored in ice. *Journal of the Science of Food Agriculture* 4, 283-298.
- Sidhu, K.S., Hesse, J.L., Bloomer, A.W., 1993. Indoor air: potential health risks related to residential wood smoke as determined under the assumptions of the U.S. EPA risk assessment model. *Indoor Environ.* 2, 92–97.
- Sidhu, K. S. (2003). Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38(3), 336-344.

- Singh, S., Gamlath, S., & Wakeling, L. (2007). Nutritional aspects of food extrusion: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 42(8), 916-929.
- Stoick, S.M., Gray, J.I., Booren, A.M. & Buckley, D.J. (1991). Oxidative stability of restructured beef steaks processed with oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone and sodium tripolyphosphate. *Journal of Food Science*, 56: 597-600.
- Storebakken, T., Foss, P., Schiedt, K., Austreng, E., Liaaen-Jensen, S., & Manz, U. (1987). Carotenoids in diets for salmonids: IV. Pigmentation of Atlantic salmon with astaxanthin, astaxanthin dipalmitate and canthaxanthin. *Aquaculture*, 65(3), 279-292.
- Suarez, M. D., Abad, M., Ruiz-Cara, T., Estrada, J. D., & García-Gallego, M. (2005). Changes in muscle collagen content during post mortem storage of farmed sea bream (*Sparus aurata*): influence on textural properties. *Aquaculture International*, 13(4), 315-325.
- Suárez Medina, M.D. (2006). Calidad nutricional en peces cultivados: influencia de las condiciones del cultivo. En S. Zamora Ndavarro, F.J. Martínez López, y V.C. RubioFernández (Eds.), *Acuicultura III: cultivo y alimentación de peces*. Murcia, España: Universidad de Murcia.

T

- Tanabe, H., Yoshida, M., & 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: 389–393.
- Tejada, M., & Huidobro, A. (2002). Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter method and gutting. *European Food Research and Technology*, 215(1), 1-7.
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(2), 107-184.

Toghyani, M., Tohidi, M., Gheisari, A. A., & Tabeidian, S. A. (2013). Performance, immunity, serum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter. *African Journal of Biotechnology*, 9(40), 6819-6825.

Tokur, B., & Ozyurt, G. (2010). The effects of rosemary extract on protein quality of cooked gilthead sea bream (*Sparus aurata*) During Frozen Storage (-18 C). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(16), 2171-2178.

Tuckey, N. P., Forgan, L. G., & Jerrett, A. R. (2012). Fillet colour correlates with biochemical status in Australasian snapper (*Pagrus auratus*) during storage in refrigerated seawater. *Aquaculture*, 356, 256-263.

U

UNE 87-001-94 (ISO 5492:1992). Análisis sensorial. Vocabulario. Asociación española de Normalización y Certificación (AENOR).

V

Vareltzis, K., Koufidis, D., Gavriilidou, E., Papavergou, E., & Vasiliadou, S. (1997). Effectiveness of a natural rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 205(2), 93-96.

Vartiainen, J., Skytta, E., Enqvist, J., & Ahvenainen, R. (2003). Properties of antimicrobial plastics containing traditional food preservatives. *Packaging Technology and Science*, 16(6), 223-229.

Vasilatos, G. C., & Savvaidis, I. N. (2013). Chitosan or rosemary oil treatments, singly or combined to increase turkey meat shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 54–58.

Volpatti, D., Chiara, B., Francesca, T., & Marco, G. (2013). Growth parameters, innate immune response and resistance to *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum* of

Dicentrarchus labrax fed carvacrol supplemented diets. *Aquaculture Research*, 45(1), 31-44.

W

Waagbø, R., Sandnes, K., Torrissen, O. J., Sandvin, A., & Lie, Ø. (1993). Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three levels of N-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E. *Food Chemistry*, 46(4), 361-366.

Wada, S., & Fang, X. (1992). The synergistic antioxidant effect of rosemary extract and α -tocopherol in sardine oil model system and frozen-crushed fish meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 16: 263-274.

Wang, H., Liu, F., Yang, L., Zu, Y., Wang, H., Qu, S., & Zhang, Y. (2011). Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. *Food Chemistry*, 128(1), 93-99.

Wong, J.W., Hashimoto, K., & Shibamoto, T. (1995). Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2707-2712.

Y

Yılmaz, S., Ergün, S., Çelik E.Ş., 2012. Effects of herbal supplements on growth performance of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Change in body composition and some blood parameters. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, 1(3), 217-222.

Yılmaz, S., Ergün, S., & Çelik, E. Ş. (2013). Effect of dietary herbal supplements on some physiological conditions of Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of aquatic animal health*, 25(2), 98-103.

Youdim, K. A., Deans, S. G., & Finlayson, H. J. (2002). The antioxidant properties of thyme (*Thymus zygis* L.) essential oil: an inhibitor of lipid peroxidation and a free radical scavenger. *Journal of Essential Oil Research*, 14(3), 210-215.

Yu, L., Scanlin, L., Wilson, J., & Schmidt, G. (2002). Rosemary extracts as inhibitors of lipid oxidation and color change in cooked turkey products during refrigerated storage. *Journal of Food Science*, 67: 582-585.

Z

Zaouali, Y., Chograni H., Trimech R., & Boussaid M. (2012). Genetic diversity and population structure among *Rosmarinus officinalis* L.(*Lamiaceae*) varieties: var. *typicus* Batt. and var. *troglydytorum* Maire. based on multiple traits. *Industrial Crops and Products* 38, 166-176.

Zeng, H.H., Tu, P.F., Zhou, K., Wang, H., Wang, B.H., & Lu, J.F. (2001). Antioxidant properties of phenolic diterpenes from *Rosmarinus officinalis*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 22(12), 1094-1098.

Zhang, Y., Smuts, J.P., Dodbiba, E., Rangarajan, R., Lang, J.C., Amstrong, D.W., 2012. Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9305-9314.

Zheng, Z. L., Tan, J. Y., Liu, H. Y., Zhou, X. H., Xiang, X., & Wang, K. Y. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292(3), 214-218.

Zhong, Y., Lall, S.P., Shahidi, F., 2008. Effects of dietary oxidized oil and vitamin E on the growth, blood parameters and body composition of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* (Linnaeus 1758). *Aquaculture Research* 39 (15), 1647-1657

ANEXO I

Influencia del extracto de romero sobre el metabolismo lipídico de la dorada.

Influencia del extracto de romero sobre el metabolismo lipídico de la dorada.

A. Hernández¹, B. García García¹, M.J. Caballero², M.D. Hernández¹

(a) IMIDA - Acuicultura. Carretera del puerto s/n, P.O. Box 65, 30740 San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain.

(b) Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Transmontaña s/n. 35413 Arucas, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

Resumen

Este estudio evalúa el efecto de la dosis de extracto de romero sobre el metabolismo lipídico y la morfología hepática e intestinal. Para ello se alimentó a doradas con una dieta basal (control) y cuatro dietas experimentales (R600, R1200, R1800 y R2400) con 600, 1200, 1800 y 2400 mg kg⁻¹ respectivamente de extracto de romero. A las 4, 8 y 12 semanas de engorde, los peces fueron sacrificados, se extrajo sangre para obtener plasma y se diseccionaron hígado e intestino. El exámen histológico del intestino no mostró diferencias entre dosis mientras que el hígado mostró una fuerte reducción de la esteatosis hepática en dietas suplementadas con extracto de romero. El extracto de romero redujo los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos y la relación HDL/LDL, indicando un mejor transporte y metabolismo energético de los lípidos. En conjunto, el efecto más patente del extracto de romero se observó con la dosis de 600 mg/kg.

Key words: Feed additives, lipid metabolism, rosemary extract, blood parameters, hepatic steatosis.

1.- Introducción

El uso de fitoquímicos en el pienso para peces está siendo ampliamente estudiado en la actualidad. Esto se debe a las propiedades que han mostrado como la reducción del estrés, la promoción del crecimiento, la estimulación del apetito, la inmunoestimulación o la mejora de la condición fisiológica del pez y en definitiva de su salud (Citarasu, 2010). Los efectos de estos fitoquímicos han resultado ser en general dosis dependientes, aunque se sabe poco acerca de las dosis óptimas para su uso en animales y de los mecanismos moleculares por los cuales actúan. Existe una tendencia global a implementar el bienestar animal y la Unión Europea sigue trabajando en completar los estándares mínimos contemplados en la Directiva Europea 98/58/EC (EC, 1998) junto con organizaciones internacionales. La World Organisation for Animal Health presentó en 2013 el Aquatic Animal Health Code, con recomendaciones concretas para el cultivo de peces y estableciendo la importancia de la salud de los peces en el bienestar de los mismos (OIE, 2013).

Una de las alteraciones fisiológicas más extendidas en la acuicultura intensiva es el hígado graso o esteatosis hepática. Ésta es casi omnipresente en la acuicultura intensiva y se caracteriza por la acumulación de grasa en el hígado y problemas en el transporte y consumo energético de los lípidos. Suele aparecer en peces criados de forma intensiva con dietas hiperenergéticas, alimentados *ad libitum* y con cierto hacinamiento (Roncarati et al., 2006; Lu et al., 2013). El uso de este tipo de dietas ha sido promovido por sus beneficios en la retención de proteína y en la excreción de nitrógeno, mejorando el aprovechamiento de nutrientes y reduciendo la contaminación ambiental (Cho et al., 1994). Otros aspectos relacionados con la calidad de los ingredientes utilizados y el balance nutricional de la dieta también influyen en el desarrollo de la esteatosis hepática

(Caballero et al., 2004). El metabolismo lipídico está principalmente regulado por el hígado, tanto la síntesis como la degradación de los lípidos (Tocher, 2003), por tanto, el correcto funcionamiento de este órgano es crucial para su aprovechamiento energético y estructural. Aparte de la obvia conexión entre la salud y el bienestar de los peces, la acumulación de grasa en el hígado implica un desperdicio al no aprovechar completamente un nutriente de la dieta con alto contenido energético (Hansen et al., 2008).

Entre los fitoquímicos más estudiados están los extractos de plantas aromáticas, muy ricos en polifenoles y con demostrados efectos beneficiosos para la salud. El extracto de romero se ha probado como aditivo alimentario en mamíferos mostrando un amplio rango de efectos fisiológicos (Amin & Hamza, 2005; Bakirel et al., 2008; Al-Jamal & Alqadi, 2011; Cui et al., 2012; Romo Vaquero et al., 2012; Gaya et al., 2013). En peces se ha estudiado el uso de extracto de romero como aditivo alimentario en otros aspectos, principalmente en la calidad del pescado (Sant'Ana et al., 2008, Álvarez et al., 2012; Hernández et al., 2014). Sin embargo, bajo nuestro conocimiento, no existen estudios de su efecto sobre el estado fisiológico del pez. Teniendo en cuenta todo esto, el objetivo de nuestro estudio fue estudiar la influencia de distintas dosis de extracto de romero sobre el metabolismo lipídico de dorada, valorando tanto aspectos histológicos del hígado y el intestino como aspectos bioquímicos de la sangre.

2.- Material y métodos

2.1.- Animales y estabulación

Se utilizaron 240 doradas de una granja del sur de España con un peso medio inicial de 214 ± 20 g. Se distribuyeron aleatoriamente en 15 tanques (16 peces por tanque) y se probó cada dieta por triplicado (tres tanques por tratamiento). Los tanques cilindro-

cónicos de 630 l formaban parte de un circuito con agua de mar (salinidad: 37 g/l; NO^{-2} : $<0.1 \text{ mg/l}$; NO^{-3} : $<0.1 \text{ mg/l}$; NH_3 : $<0.5 \text{ mg/l}$; pH: 7,7). Los animales fueron alimentados a saciedad aparente dos veces al día y la ingesta fue controlada diariamente. El experimento se llevó a cabo a lo largo de 84 días (de Mayo a Julio), hasta que los peces alcanzaron talla comercial (356 ± 37.3). Los animales estuvieron sujetos a las condiciones del fotoperiodo natural ($37^{\circ}50'N$, $0^{\circ}46'O$) y a una temperatura óptima para su crecimiento ($23.9 \pm 1.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$). A partir de los datos de peso y talla se calculó la tasa de crecimiento relativo (SGR), la tasa de alimentación relativa (SFR) y el índice de conversión de alimento (FCR). Para ello se utilizaron las siguientes fórmulas: $\text{SGR} = 100 (\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial}) / \text{n}^{\circ} \text{ días}$; $\text{SFR} = 100 (\text{alimento ingerido} / \text{n}^{\circ} \text{ días}) / \text{peso medio}$; $\text{FCR} = \text{alimento ingerido} / \text{peso ganado}$.

2.2.- Dietas experimentales

Los peces fueron alimentados con cinco dietas experimentales: una dieta control (dieta basal) y cuatro dietas a las que se les incorporó distintas dosis de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*; 30% de pureza en contenido de diterpenos, Nutrafur-Furfural S.A., Murcia, España): R600, R1200, R1800 y R2400 con 600, 1200, 1800 y 2400 mg kg^{-1} , respectivamente. Estas dietas se basaron en una formulación comercial estándar con los siguientes ingredientes: 550 g kg^{-1} de harina de pescado, 80 g kg^{-1} de gluten de trigo, 210 g kg^{-1} de harina de trigo, 150 g kg^{-1} de aceite de pescado y 10 g kg^{-1} de premix vitamínico-mineral (NRC, 1993). Las dietas fueron elaboradas por extrusión, usando una extrusora semi-industrial (E 19/25 D, Brabender® GmbH & Co.K.G., Duisburg, Alemania). Las condiciones de extrusión fueron: velocidad del tornillo de 50 rpm, diámetro de pellet de 4mm y temperaturas de 50/60/68 $^{\circ}\text{C}$. Estas temperaturas fueron escogidas con el objetivo de no superar los 70 $^{\circ}\text{C}$ a la salida de la extrusora y

mantener la estabilidad de los compuestos aromáticos. Todas las dietas fueron sometidas a análisis proximal para calcular materia seca, proteína, grasa, cenizas, fibra (AOAC, 1997) y energía (IKA Adiabatic Calorimeter). Éstos resultados se muestran en la Tabla 1.

2.2.- Toma de muestras

Previo ayuno de 24 horas, se sacrificaron 2 peces de cada tanque (6 por tratamiento) a las 4, 8 y 12 semanas del inicio del periodo de engorde, mediante sobredosis de 2-fenoxi-etanol (0,6mg/l; Panreac Química S.L.U., Barcelona, España). Rápidamente se extrajo sangre de la vena caudal con jeringuillas heparinizadas y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm (Eppendorf centrifuge 5415D, Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España) para obtener el plasma sanguíneo. El plasma se guardó en viales y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis. Tras la extracción de la sangre, se diseccionaron los hígados e intestinos de cada pez y se introdujeron, para su fijación, en formol al 10%, tamponado a pH 7 y estabilizado con metanol (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España) en una relación inferior a 1/10 (muestra/fijador). Las muestras se mantuvieron en el líquido fijador hasta su procesado y análisis histológico.

2.3.- Histología, microscopía óptica y morfometría

Para cada individuo, se obtuvieron 3 segmentos del intestino anterior y 4 segmentos del intestino posterior, para luego ser incluidos en parafina. A partir de cada hígado se obtuvieron 3 secciones (dos transversales y una longitudinal) que igualmente se incluyeron en parafina. Para la preparación de las láminas histológicas se hicieron cortes a 4µm y se tiñeron con hematoxilina-eosina. En las láminas de intestino se evaluaron la cantidad y tamaño de agregados linfocitarios, la cantidad de granulocitos y el engrosamiento de la lámina propia. En las láminas de hígado se evaluó la infiltración de

grasa peripancreática, la estructura del parénquima hepático y el desplazamiento del núcleo de los hepatocitos. Esta evaluación se llevó a cabo por dos científicos, de forma individual e ignorando la identidad de cada muestra y los tratamientos experimentales. Se tomaron microfotografías tanto de hígado como de intestino usando un microscopio Nikon Microphot-FXA y una cámara Olympus DP50. Las microfotografías de hígado (100X) se utilizaron para medir, en hepatocitos elegidos al azar, el área y las longitudes máxima (L_{\max}) y mínima (L_{\min}) pasando por el núcleo. L_{\max}/L_{\min} se tomó como indicador cuantitativo del desplazamiento del núcleo. Para realizar las medidas se utilizó el software Image Pro[®] Plus (Media Cybernetics Inc., MD, USA). En cada pez se midieron 33 hepatocitos sumando en total 198 medidas de cada parámetro por dieta y día.

2.4.- Parámetros sanguíneos y ensayos enzimáticos.

En cada muestra de plasma se determinaron glucosa (método Trinder GOD-POD), proteínas totales (método colorimétrico Biuret), triglicéridos (método enzimático colorimétrico GPO-POD), colesterol total (método enzimático colorimétrico CHOD-POD), colesterol asociado a lipoproteína de alta densidad (HDL-C; método enzimático colorimétrico, directo), colesterol asociado a lipoproteína de baja densidad (LDL-C; método enzimático colorimétrico, líquido), fosfatasa alcalina (ALP; método cinético DGKC), alanina aminotransferasa (ALT; método cinético UV IFCC) y aspartato aminotransferasa (AST; método cinético UV IFCC). Para ello se utilizaron kits comerciales (Spinreact S.A.U., Girona, España) y un espectrofotómetro UV/VIS LAMBDA 25 acoplado a un termostato tipo Peltier (Perkin Elmer, Inc., MA, USA). Cada determinación se llevó a cabo por duplicado.

2.5.- Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó ANOVA factorial y ANOVAs de una vía. Con éste se determinó el efecto del tiempo y de la dosis de extracto de romero en la dieta, en cada uno de los parámetros sanguíneos e histológicos estudiados. Las medias de los distintos grupos experimentales se compararon mediante el test de Fisher (LSD).

3.- Resultados

Todas las dietas fueron bien aceptadas por los peces y éstos mostraron un buen estado de salud aparente durante todo el periodo de alimentación. La mortalidad fue inferior al 3% en promedio. La dosis de extracto de romero no afectó de forma significativa al crecimiento ni a la ingesta (Tabla 2).

El examen histológico del intestino no mostró cambios con las distintas dosis de extracto de romero en cuanto a la aparición de nódulos linfáticos, la cantidad de granulocitos o el engrosamiento de la lámina propia, mostrando todos los grupos experimentales la morfología normal en un pez sano (Fig. 1).

La morfología del parénquima hepático (Fig. 2) fue diferente entre dosis de extracto de romero, siendo mayores estas diferencias con el paso del tiempo. En el grupo control se observó un tamaño y forma irregular de los hepatocitos y un desplazamiento del núcleo hacia la periferia. También se observó abundante infiltración de grasa en el parénquima peripancreático sobre todo en la semana 12. El grupo R600 mostró una morfología del parénquima muy distinta, con hepatocitos de forma regular y dispuestos a lo largo de los espacios sinusoidales. Además, la infiltración de grasa en el parénquima peripancreático se redujo considerablemente. En dosis altas se aprecian ciertos aspectos de la morfología encontrada en el grupo control sin llegar a ser tan prominentes. Estas diferencias entre dietas se observan durante todo el periodo de engorde aunque son mucho más patentes la semana 12 (Fig. 3 y Fig. 4).

En cuanto a las medidas tomadas por análisis de imagen en el hígado, mostraron efectos tanto del tiempo como de la dosis de extracto de romero en el desplazamiento del núcleo y en el área de los hepatocitos. En esta última medida, además, hubo interacción entre ambos factores. Se observaron diferencias significativas en el área de los hepatocitos la semana 4 y 8, en las que desciende con la dosis R600 para ascender con dosis superiores. La semana 12 no hay diferencias en el área pero sí en el desplazamiento del núcleo, de forma que éste desciende con la dosis R600 para ascender suavemente con dosis superiores. La máxima reducción en ambas medidas es de aproximadamente un 10%.

Los parámetros sanguíneos estudiados mostraron diferencias con el tiempo y entre las distintas dosis (Tabla 3).

En el nivel de glucosa en plasma, se observó un efecto tanto del tiempo como de la dosis de extracto de romero. La concentración de glucosa aumentó en general la semana 8 de tratamiento para descender después. El grupo control mostró valores superiores al resto en las semanas 4 y 12.

Las proteínas totales en plasma descendieron con el tiempo en general, existiendo un efecto significativo de este factor. La semana 12 los valores fueron diferentes entre dietas de forma que el valor de R600 fue el mayor y superior a R1800 y R2400.

Los triglicéridos mostraron un efecto significativo de la dosis. La semana 4 los valores del grupo control fueron superiores al resto y la semana 8 los valores de la dosis R600 fueron superiores a R1200, R1800 y R2400 y no diferentes del control.

El colesterol total no se vio afectado por el tiempo ni por la dosis, aunque se observa una tendencia a descender con las dietas que incluyen extracto de romero. Los niveles

de LDL-C mostraron un efecto del tiempo, descendiendo a lo largo del periodo de engorde. La semana 8 su concentración en plasma fue mayor al resto en el grupo control y la semana 12 se observó la misma tendencia, aunque no significativa. El HDL-C no cambió con el tiempo ni con la dosis, aunque si se observó cierta tendencia a aumentar con la dosis R600. La relación HDL-C/LDL-C mostró un efecto tanto del tiempo como de la dosis. Ésta aumentó con el tiempo y, las semanas 4 y 8 fue mayor al control en los peces alimentados con dietas con extracto de romero.

La actividad de las enzimas ALP, ALT y AST descendió en general con dietas con extracto de romero, aunque no siempre de forma significativa (Tabla 4). ALP no mostró un efecto de la dosis ni del tiempo, pero sí tendió a disminuir con dietas con extracto de romero. ALT aumentó con el tiempo y disminuyó con la dosis de extracto de romero, siendo ambos factores significativos. Las mayores diferencias se observaron la semana 12, cuando el valor del grupo control fue significativamente superior al resto. AST mostró la misma tendencia general que ALT aunque no hubo diferencias significativas.

4.- Discusión

En el presente trabajo el crecimiento y la utilización nutritiva del pienso no se ven afectados con la inclusión de extracto de romero, al igual que ha sido observado por otros autores (Yilmaz et al., 2012; Di Turi et al., 2009).

Mediante el examen histológico del intestino no se observan aspectos que pudieran implicar problemas en la absorción de los lípidos –vacuolas lipídicas supranucleares– o una alteración del sistema inmune asociado al intestino (GALT) –nódulos linfáticos, infiltración epitelial de linfocitos o engrosamiento de la lámina propia– (Caballero et al., 2003; Torrecillas et al., 2013). La ausencia de alteraciones estructurales en el intestino no descarta posibles cambios en la digestibilidad de nutrientes, de hecho, se ha visto que

el ácido carnósico y el carnosol, fenoles mayoritarios en el extracto de romero, son capaces de inhibir la lipasa pancreática, reduciendo también el incremento de peso y la cantidad de triglicéridos en plasma de mamíferos (Romo Vaquero et al., 2012).

Por el contrario, las diferencias encontradas en la morfología del parénquima hepático indican un distinto funcionamiento de este órgano cuando los peces son alimentados con dietas suplementadas con extracto de romero. La morfología observada en los peces del grupo control se identifica claramente con la esteatosis hepática. Se caracteriza macroscópicamente por un hígado hinchado, blanquecino y graso. Microscópicamente, los hepatocitos tienen abundantes vacuolas lipídicas –o una de gran tamaño– que desplazan el núcleo a la periferia y alteran la estructura normal del parénquima –los sinusoides dejan de formar líneas rectas con hepatocitos distribuidos a su alrededor y aparece o aumenta la grasa peri-pancreática– (Roncarati et al., 2006; Caballero et al., 2004). La disposición de los lípidos en una gran vacuola dentro del hepatocito desplazando el núcleo se da en situaciones crónicas, mientras que el reparto en pequeñas vacuolas por todo el citoplasma quedando el núcleo en el centro corresponde a situaciones agudas (Day et al., 2003). Esto concuerda con nuestros resultados de análisis de imagen, ya que hasta la semana 8 sólo existen diferencias en cuanto al área de los hepatocitos –típico de una situación aguda– y se reducen con el tiempo. Las diferencias encontradas en el desplazamiento del núcleo la semana 12 podría indicar que se ha llegado a una alteración crónica que el extracto de romero es capaz de reducir. En ambas situaciones se observa claramente el efecto beneficioso del romero produciendo en general el mayor impacto con la dosis de 600 mg/kg. El descenso de ALT y las tendencias a la baja en AST y ALP en plasma de peces alimentados con dietas con extracto de romero indica una mejora de las alteraciones hepáticas producidas por dietas

ricas en grasa y condiciones de cultivo intensivas (Roncarati et al., 2006), complementando el estudio histológico.

Los resultados de los parámetros sanguíneos nos proporcionan una imagen general del funcionamiento del transporte lipídico. El perfil metabólico sanguíneo de los peces alimentados con la dieta control se caracteriza por una alta concentración plasmática de glucosa, triglicéridos y colesterol, y una baja relación HDL-C /LDL-C, que es típica de desórdenes alimentarios por exceso de grasas y de determinadas patologías como el síndrome metabólico, la obesidad o la diabetes. Todas estas patologías suelen llevar asociada la aparición de esteatosis hepática la cual parece tener un efecto causal en desarrollo de resistencia a la insulina (Den Boer et al., 2004). El extracto de romero ha demostrado tener un fuerte efecto antidiabético (Bakirel et al., 2008; Al-Jamal & Alqadi, 2011), hepatoprotectivo (Amin & Hamza, 2005; Cui et al., 2012), colerético (Hoefler et al., 1987; Romo Vaquero et al., 2012) y antiadipogénico (Gaya 2013) en mamíferos. Nuestros resultados concuerdan en general con esos autores, seguramente debido a la similitud existente entre ambos grupos de animales en digestión, absorción y transporte lipídico (Tocher, 2003; Lu et al., 2013).

El efecto hipoglucémico del extracto de romero, también observado en nuestro estudio, ha sido atribuido a un efecto antioxidante y protector del mismo en las células β de mamíferos, manteniendo la producción de insulina (Bakirel et al., 2008). Se ha propuesto que el estrés oxidativo puede constituir la conexión entre diferentes complicaciones diabéticas. La hiperglucemia produce un estrés oxidativo que favorece la formación de radicales libres (Kamalakkannan & Prince, 2006). Estos atacan a los ácidos grasos y los más sensibles frente a ellos son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), tan abundantes en el hígado de peces marinos. La capacidad antioxidante del

extracto de romero puede evitar que se produzcan estos daños y mejorar el funcionamiento del hígado. Además, se ha demostrado que el carnosol inhibe la síntesis *de novo* de triglicéridos actuando sobre la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) (Cui et al., 2012). Esta enzima se encuentra en muchos tejidos relacionados con el metabolismo lipídico y es diana de fármacos que reducen la cantidad de lípidos en sangre y aumentan la sensibilidad a la insulina y el metabolismo energético (Chen et al., 2005).

La tendencia observada en el colesterol sanguíneo a disminuir en peces alimentados con dietas con extracto de romero puede estar relacionada con el efecto colerético del romero observado por Hoefler et al. (1987) ya que la producción de colesterol en la bilis permite eliminarlo del torrente sanguíneo. La capacidad del extracto de romero de aumentar la relación HDL/LDL ha sido descrita por Al-Jamal & Alqadi (2011) aunque el mecanismo por el cual lo hace no ha sido claramente elucidado. Zheng et al., 2001 demostró la capacidad del carnosol, el rosmanol y el epirosmanol, presentes en el extracto de romero, de inhibir la oxidación de la apolipoproteína “apo B” en la formación de LDL, lo que podría significar una menor producción de esta lipoproteína por el hígado de acuerdo a nuestros resultados. Aunque el efecto de estos compuestos aromáticos en la producción o eliminación de HDL no ha sido estudiado, se ha visto que los polifenoles presentes en la manzana son capaces de inhibir la enzima plasmática de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), implicada en la estabilidad de las lipoproteínas HDL, produciendo un incremento en HDL y un descenso en triglicéridos (Lam et al., 2008). Sería necesario estudiar esta enzima y otras relacionadas con el funcionamiento de las lipoproteínas para comprender mejor el efecto del extracto de romero sobre el transporte lipídico.

El efecto del romero en tejidos periféricos no se ha estudiado de forma amplia aunque algunos descubrimientos aportan luz a este tema. Se ha demostrado un aumento de la eficiencia de retención de proteína en peces alimentados con dietas con compuestos procedentes de plantas aromáticas (Zheng et al., 2009; Yilmaz et al., 2012). Este efecto podría estar relacionado con la inhibición de la DGAT o la protección de las células β del hepatopáncreas, ya que la insulina promueve directamente la síntesis proteica (Dimitriadis et al., 2011). A pesar de que la insulina estimula la acumulación de grasa en los adipocitos se ha demostrado que el ácido carnósico presente en el extracto de romero bloquea la expresión de receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR γ), inhibiendo la mitosis celular de los adipocitos y por tanto la adipogénesis (Gaya et al., 2012). La expresión de PPAR γ en humanos está muy relacionada con desórdenes metabólicos y existe un grupo de fármacos anti-obesidad cuya diana es esta molécula.

5.- Consideraciones finales

Podemos concluir que la adición de extracto de romero a la dieta reduce claramente el desequilibrio en el metabolismo lipídico producido por la alimentación *ad libitum* con dietas hiperenergéticas y condiciones de cultivo intensivas. La reducción en la esteatosis hepática es el efecto más patente y posiblemente el de mayor importancia, debido al papel central y regulador del hígado en el metabolismo lipídico. Tanto el estudio histológico como el perfil metabólico sanguíneo muestran como una dosis de 600mg/kg de extracto de romero en el pienso de dorada equilibra fuertemente el metabolismo lipídico, siendo ésta la dosis óptima entre las estudiadas. De esta forma, además, se mejora el estado de salud de los peces, con las implicaciones que esto tiene en la tendencia actual de implementación del bienestar animal en la acuicultura.

Referencias

- Álvarez, A., García García, B., Jordán, M.J., Martínez-Conesa, C., Hernández, M.D., 2012. The effect of diets supplemented with thyme essential oils and rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during storage on ice. *Food Chem.* 132 (3), 1395-1405.
- Amin, A., Hamza, A.A., 2005. Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sci.* 77 (3), 266-278.
- Al-Jamal, A.R., Alqadi, T., 2011. Effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on lipid profile of diabetic rats. *Jordan j. biol. sci.* 4 (4).
- Bakirel, T., Bakirel, U., Keleş, O.Ü., Ülgen, S.G., Yardibi, H., 2008. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 116 (1), 64-73.
- Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjørsvik, E., Fernández, A.J., Rosenlund, G., 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short-or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *J. Fish Dis.* 27 (9), 531-541.
- Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjørsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, A. J., Rosenlund, G., 2003. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture* 225 (1), 325-340.

- Chen, H.C., Farese, R.V., 2005. Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity lessons from DGAT1-deficient mice. *Arterioscl. Throm. Vas.* 25 (3), 482-486.
- Citarasu, T., 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquacult. Int.* 18 (3), 403-414.
- Cui, L., Kim, M.O., Seo, J.H., Kim, I.S., Kim, N.Y., Lee, S.H., Parkb, J., Kim, J., Lee, H.S., 2012. Abietane diterpenoids of *Rosmarinus officinalis* and their diacylglycerol acyltransferase-inhibitory activity. *Food Chem.* 132 (4), 1775-1780.
- Cho, C.Y., Hynes, J.D., Wood, K.R., Yoshida, H.K., 1994. Development of high-nutrient-dense, low-pollution diets and prediction of aquaculture wastes using biological approaches. *Aquaculture* 124 (1), 293-305.
- EC, 1998. Council Directive 98/58/EC of 20 July 1998 concerning the protection of animals kept for farming purposes. *Official Journal of the European Communities* L 221, 23-27.
- Day C.P., Oliver F.W.J., 1998. Hepatic steatosis: Innocent bystander or guilty party? *Hepatology* 27 (6): 1463-1466.
- Den Boer, M., Voshol, P.J., Kuipers, F., Havekes, L.M., Romijn, J.A., 2004. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscl. Throm. Vas.* 24 (4), 644-649.
- Di Turi, L., Ragni, M., Caputi, Jambrenghi A., Lastilla, M., Vicenti, A., Colonna, M.A., Giannico, F., Vonghia, G., 2009. Effect of dietary rosemary oil on growth

- performance and flesh quality of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Ital. J. Anim. Sci.* 8, 857–859.
- Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., Raptis, S.A., 2011. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res. Clin. Pr.* 93, S52-S59.
- Gaya, M., Repetto, V., Toneatto, J., Anesini, C., Piwien-Pilipuk, G., Moreno, S., 2013. Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in *Rosmarinus officinalis*, is exerted through the C/EBPs and PPAR γ pathways at the onset of the differentiation program. *BBA-Gen. Subjects* 1830 (6), 3796-3806.
- Hansen, J.Ø., Berge, G.M., Hillestad, M., Krogdahl, Å., Galloway, T.F., Holm, H., Holm, J., Ruyter, B., 2008. Apparent digestion and apparent retention of lipid and fatty acids in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed increasing dietary lipid levels. *Aquaculture*, 284 (1), 159-166.
- Hernández, A., García García, B., Jordán, M.J., Hernández, M.D., 2014. Improved conservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in ice storage. The influence of doses of rosemary extract added to feed. *Aquaculture* 426-427, 31-40.
- Hoefler, C., Fleurentin, J., Mortier, F., Pelt, J.M., Guillemain, J., 1987. Comparative choleric and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of *Rosmarinus officinalis* in rats. *J. Ethnopharmacol.* 19 (2), 133-143.
- Kamalakkannan, N., Prince, P.S.M., 2006. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98 (1), 97-103.

- Lam, C.K., Zhang, Z., Yu, H., Tsang, S.Y., Huang, Y., Chen, Z.Y., 2008. Apple polyphenols inhibit plasma CETP activity and reduce the ratio of non-HDL to HDL cholesterol. *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (8), 950-958.
- Lu, K.L., Xu, W.N., Li, X.F., Liu, W.B., Wang, L.N., Zhang, C.N., 2013. Hepatic triacylglycerol secretion, lipid transport and tissue lipid uptake in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed high-fat diet. *Aquaculture* 408, 160-168.
- OIE - World Organization for Animal Health, 2013. Welfare of Farmed Fish. Section 7. Chapter 7.1., Article 7.1.1. In: *Aquatic Animal Health Code 2008*. OIE, Paris.
- Romo Vaquero M., Yáñez-Gascón M.J., Rocío García Villalba R., Larrosa M., Fromentin E., Ibarra A., Soller M., Tomás-Barberá F., Espín de Gea J.C., García-Conesa M.T., 2012. Inhibition of gastric lipase as a mechanism for body weight and plasma lipids reduction in Zucker rats fed a rosemary extract rich in carnosic acid. *Plos One* 7, e39773.
- Roncarati, A., Melotti, P., Dees, A., Mordenti, O., Angellotti, L., 2006. Welfare status of cultured seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and seabream (*Sparus aurata* L.) assessed by blood parameters and tissue characteristics. *J. Appl. Ichthyol.* 22 (3), 225-234.
- Sant'Ana, L.S., Mancini-Filho, J., 2000. Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillets. *Food Chem.* 68 (2), 175-178.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish Sci.* 11 (2), 107-184.

- Torrecillas, S., Makol, A., Betancor, M.B., Montero, D., Caballero, M.J., Sweetman, J., Izquierdo, M., 2013. Enhanced intestinal epithelial barrier health status on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immun.* 34 (6), 1485-1495.
- Yılmaz, S., Ergün, S., Çelik E.Ş., 2012. Effects of herbal supplements on growth performance of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Change in body composition and some blood parameters. *J. BioSci. Biotech.*, 1 (3), 217-222.
- Zeng, H.H., Tu, P.F., Zhou, K., Wang, H., Wang, B.H., & Lu, J.F. (2001). Antioxidant properties of phenolic diterpenes from *Rosmarinus officinalis*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 22(12), 1094-1098.

Tabla 1

Análisis proximal de las dietas experimentales (en % de materia seca).

Componentes	Control	R600	R1200	R1800	R2400
Materia seca	92.2	91.2	93.3	91.6	93.6
Proteína bruta	43.8	43.6	43.5	43.4	43.5
Grasa bruta	20.6	20.7	20.9	20.6	20.9
Cenizas	10.3	10.0	10.1	10.1	9.9
MELN ⁽¹⁾	24.8	25.3	25.3	25.3	25.4
Fibra	0.5	0.5	0.3	0.4	0.4
Energía bruta (MJ/kg dieta)	20.5	20.4	20.7	20.7	20.4

⁽¹⁾ Materia Extraíble Libre de Nitrógeno.

Tabla 2

Efecto de la incorporación de extracto de romero en la dieta sobre la utilización nutritiva de la misma.

	Control	R600	R1200	R1800	R2400
Wi	212.8 ± 1.2	214.0 ± 1.7	214.7 ± 1.2	214.4 ± 1.7	214.2 ± 1.0
Wf	353.5 ± 15.8	358.2 ± 24.4	357.4 ± 7.3	352.5 ± 9.1	356.6 ± 5.0
WG	140.7 ± 14.7	144.2 ± 25.6	142.6 ± 6.3	138.2 ± 9.0	142.4 ± 5.7
SFR	1.59 ± 0.10	1.70 ± 0.09	1.56 ± 0.14	1.75 ± 0.08	1.71 ± 0.09
SGR	0.60 ± 0.05	0.61 ± 0.09	0.61 ± 0.02	0.59 ± 0.03	0.61 ± 0.02
FCR	2.72 ± 0.35	2.86 ± 0.28	2.63 ± 0.30	3.02 ± 0.10	2.88 ± 0.11

Wi: Peso Inicial; Wf: Peso Final; WG: Peso Ganado; SFR: Tasa de Alimentación Relativa; SGR: Tasa de Crecimiento Específica; FCR: Índice de Conversión;

Tabla 3

Parámetros sanguíneos medidos en plasma de dorada alimentada con pienso con distintas dosis de extracto de romero.

	Semana	Control	R600	R1200	R1800	R2400
Glucosa	4	110.41 ± 16.60 ^c	91.60 ± 18.03 ^{Ab}	78.02 ± 9.83 ^{Ab}	66.14 ± 4.02 ^{Aa}	77.78 ± 13.44 ^{Aab}
	8	123.66 ± 27.80	133.70 ± 16.51 ^B	116.96 ± 16.24 ^B	127.17 ± 20.14 ^B	153.85 ± 40.36 ^B
	12	108.78 ± 10.04 ^b	88.42 ± 15.68 ^{Aa}	72.84 ± 6.99 ^{Aa}	77.30 ± 12.72 ^{Aa}	83.54 ± 17.12 ^{Aa}
	Tiempo	p<0.001				
Dosis	p=0.001					
Tiempo*Dosis	p=0.020					
Proteína total	4	4.80 ± 0.42 ^B	4.46 ± 0.53	4.66 ± 0.28	4.82 ± 0.44 ^B	4.43 ± 0.54
	8	4.74 ± 0.51 ^{ABab}	4.84 ± 0.73 ^b	4.47 ± 0.48 ^{ab}	4.18 ± 0.35 ^{Aa}	4.18 ± 0.24 ^a
	12	4.08 ± 0.40 ^A	4.33 ± 0.25	4.10 ± 0.32	4.08 ± 0.34 ^A	4.37 ± 0.24
	Tiempo	p=0.001				
Dosis	p=0.433					
Tiempo*Dosis	p=0.071					
Triglicéridos	4	286.00 ± 20.68 ^b	241.28 ± 26.20 ^a	230.75 ± 28.72 ^a	252.26 ± 31.11 ^{ab}	223.45 ± 50.31 ^a
	8	241.77 ± 49.97 ^{ab}	279.68 ± 59.46 ^b	208.45 ± 48.13 ^a	213.50 ± 27.22 ^a	260.07 ± 26.84 ^{ab}
	12	295.75 ± 75.87	264.36 ± 45.57	232.68 ± 32.37	231.83 ± 34.80	247.20 ± 31.76
	Tiempo	p=0.538				
Dosis	p=0.012					
Tiempo*Dosis	p=0.257					
Colesterol total	4	293.54 ± 44.76	273.78 ± 41.75	277.89 ± 40.54	273.31 ± 25.81	273.22 ± 49.40
	8	304.26 ± 30.15	283.27 ± 49.51	279.64 ± 26.35	254.64 ± 37.35	261.74 ± 36.37
	12	286.51 ± 25.73	274.90 ± 27.61	282.68 ± 22.44	278.91 ± 7.54	288.87 ± 32.46
	Tiempo	p=0.841				
Dosis	p=0.344					
Tiempo*Dosis	p=0.900					
LDL-C	4	156.48 ± 22.50 ^{AB}	158.36 ± 26.20 ^B	152.41 ± 22.24 ^B	143.28 ± 33.19 ^B	170.98 ± 27.81 ^B
	8	187.83 ± 37.63 ^{Bb}	157.95 ± 36.64 ^{Bab}	131.57 ± 35.81 ^{ABa}	137.53 ± 47.89 ^{Ba}	130.55 ± 27.72 ^{ABa}
	12	104.82 ± 24.03 ^A	95.76 ± 26.00 ^A	89.19 ± 13.58 ^A	72.14 ± 18.31 ^A	107.80 ± 35.11 ^A
	Tiempo	p<0.001				
Dosis	p=0.086					
Tiempo*Dosis	p=0.346					
HDL-C	4	72.76 ± 17.32	69.11 ± 7.98	65.51 ± 14.96	73.67 ± 9.78	72.31 ± 16.16
	8	66.60 ± 18.34	73.15 ± 11.66	75.78 ± 18.88	54.37 ± 9.91	74.47 ± 14.74
	12	65.31 ± 12.22	78.83 ± 20.25	66.89 ± 30.67	84.03 ± 22.94	96.43 ± 22.46
	Tiempo	p=0.177				
Dosis	p=0.300					
Tiempo*Dosis	p=0.286					
HDL-C/LDL-C	4	0.49 ± 0.08	0.45 ± 0.09 ^A	0.42 ± 0.06	0.54 ± 0.10 ^A	0.47 ± 0.11 ^A
	8	0.36 ± 0.12 ^a	0.45 ± 0.04 ^{Aab}	0.61 ± 0.16 ^b	0.46 ± 0.19 ^{Aab}	0.57 ± 0.14 ^{Ab}
	12	0.50 ± 0.08 ^a	0.87 ± 0.24 ^{Bab}	0.82 ± 0.31 ^{ab}	1.30 ± 0.18 ^{Bb}	0.97 ± 0.34 ^{Bab}
	Tiempo	p<0.001				
Dosis	p=0.012					
Tiempo*Dosis	p=0.036					

Valores medios de seis peces ± desviación estándar.

Letras mayúsculas diferentes (A-C) en la misma columna (semanas diferentes) indican diferencias significativas (p<0,05).

Letras minúsculas diferentes (a-c) en la misma fila (dietas diferentes) indican diferencias significativas (p<0,05).

Tabla 4

Ensayos enzimáticos en plasma sanguíneo de dorada alimentada con pienso con distintas dosis de extracto de romero.

	Semana	Control	R600	R1200	R1800	R2400
ALP	4	141.66 ± 25.83	134.19 ± 23.27	139.57 ± 23.02	127.38 ± 32.62	124.00 ± 26.61
	8	152.55 ± 25.75	139.97 ± 19.37	145.25 ± 11.23	119.81 ± 10.91	149.21 ± 34.77
	12	130.66 ± 6.90	122.98 ± 28.76	118.47 ± 2.85	133.76 ± 42.39	147.76 ± 21.60
	Tiempo	p=0.326				
	Dosis	p=0.535				
	Tiempo*Dosis	p=0.507				
ALT	4	25.92 ± 7.82	14.29 ± 3.49	19.85 ± 9.12	11.89 ± 2.67 ^A	10.09 ± 3.90
	8	33.52 ± 14.23 ^{ab}	18.65 ± 7.38 ^a	15.32 ± 1.45 ^a	58.00 ± 12.89 ^{Bb}	18.76 ± 12.99 ^a
	12	56.28 ± 18.76 ^b	25.07 ± 2.04 ^a	31.53 ± 7.69 ^a	15.84 ± 9.72 ^{Aa}	24.00 ± 6.45 ^a
	Tiempo	p=0.006				
	Dosis	p=0.038				
	Tiempo*Dosis	p=0.001				
AST	4	26.13 ± 20.56	15.40 ± 3.86	32.12 ± 26.78	21.33 ± 6.46	16.04 ± 8.74
	8	30.33 ± 17.12	21.46 ± 7.61	11.63 ± 1.55	30.20 ± 6.79	21.68 ± 9.62
	12	33.02 ± 32.22	29.46 ± 21.39	28.05 ± 15.45	33.09 ± 20.80	22.12 ± 12.54
	Tiempo	p=0.403				
	Dosis	p=0.826				
	Tiempo*Dosis	p=0.938				

Valores medios de seis peces±desviación estándar.

Letras mayúsculas diferentes (A-C) en la misma columna (semanas diferentes) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes (a-c) en la misma fila (dietas diferentes) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

ALP: Fosfatasa alcalina, ALT: Alanina aminotransferasa, AST: Aspartato aminotransferasa.

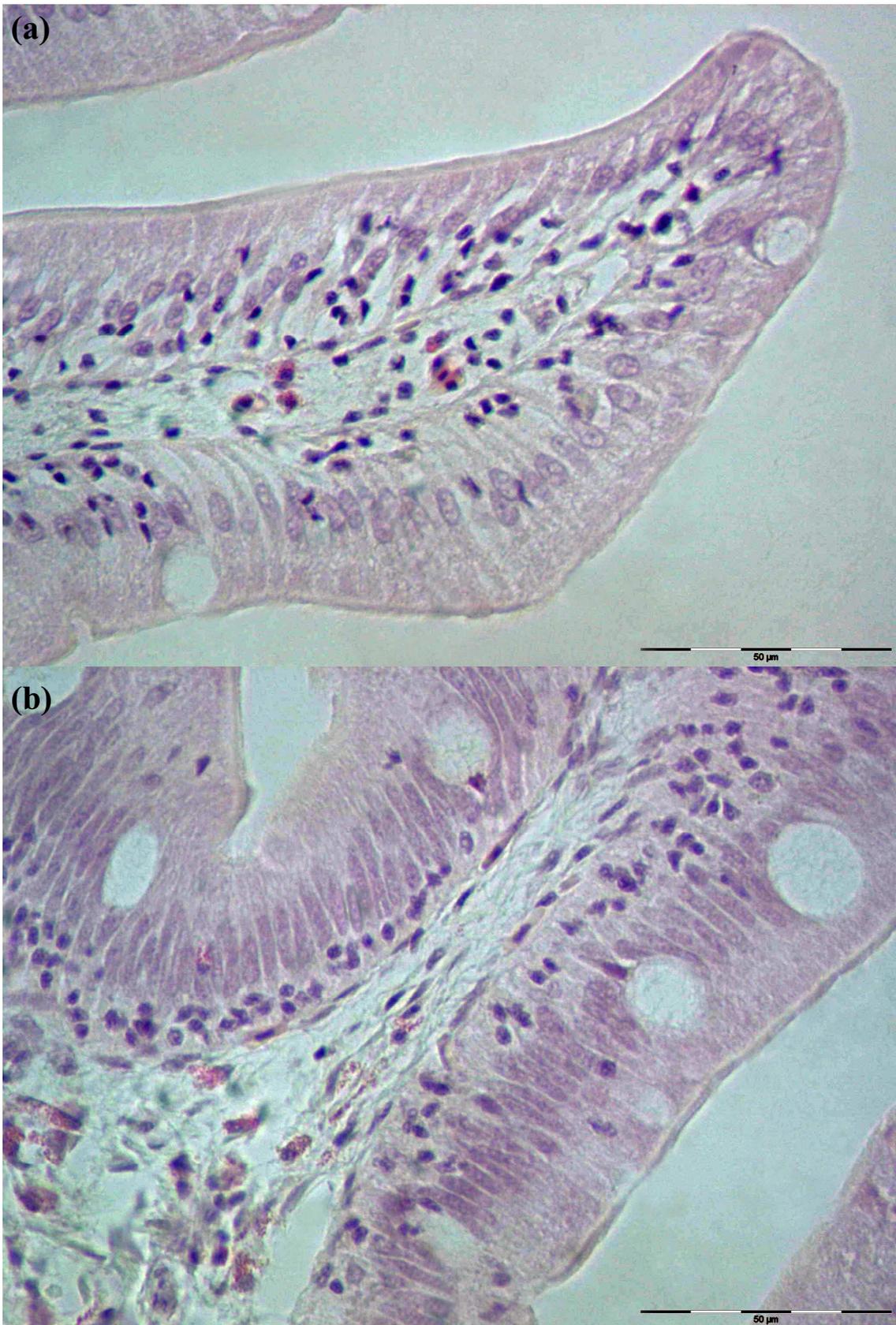


Figura 1. Epitelio y lámina propia de intestino de dorada mostrando morfología asintomática, independientemente de la dieta. (a) Dieta Control (H&E, X400), (b) dieta R600 (H&E, X400).

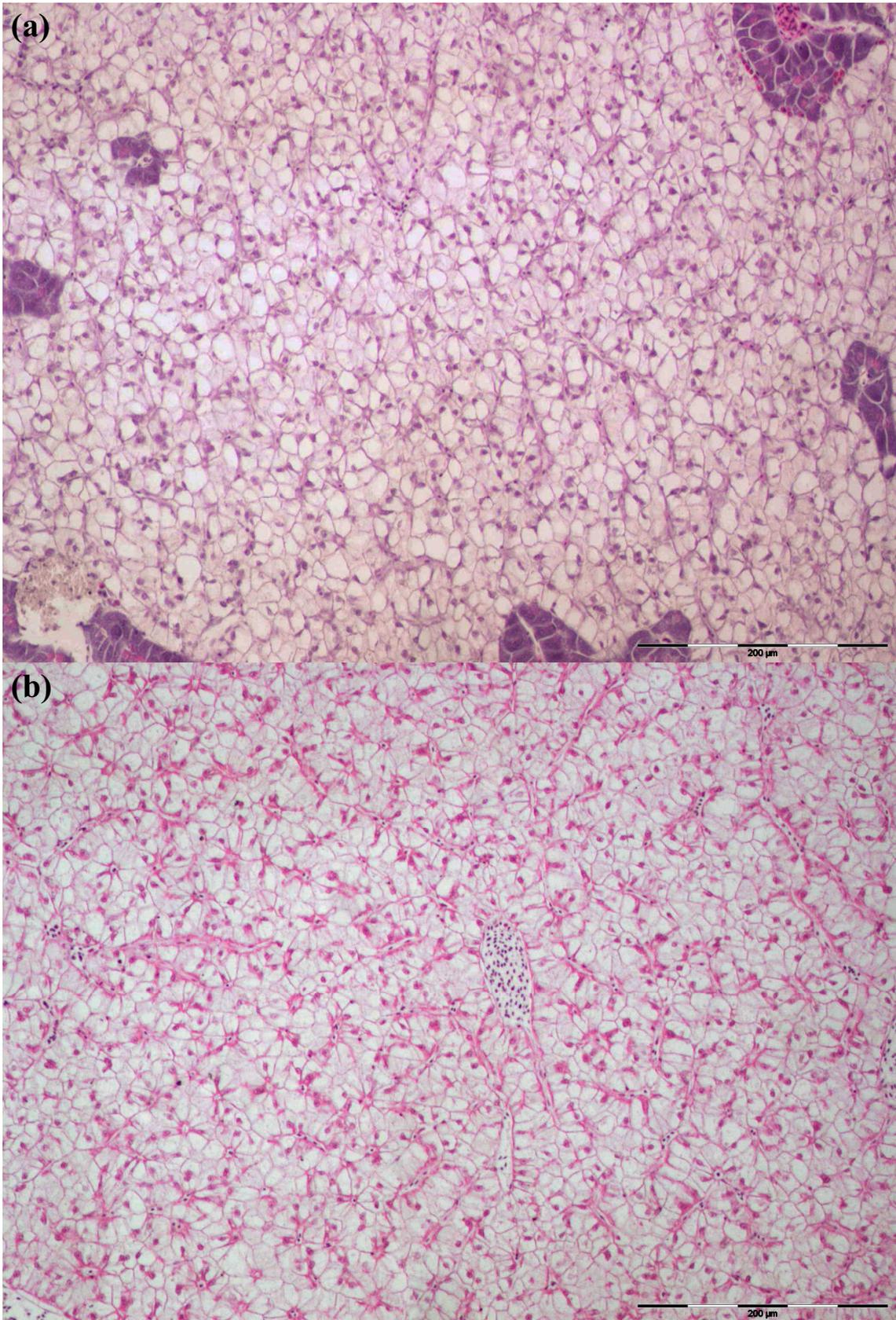


Figura 2. Hígado de dorada tras 12 semanas de engorde. (a) Dieta Control, abundante vacuolización y desplazamiento del núcleo a la periferia (H&E, X100). (b) Dieta R600, reducción de la vacuolización que permite observar mayor cantidad de núcleos centrados y hepatocitos con morfología regular localizados alrededor de los espacios sinusoidales (H&E, X100).

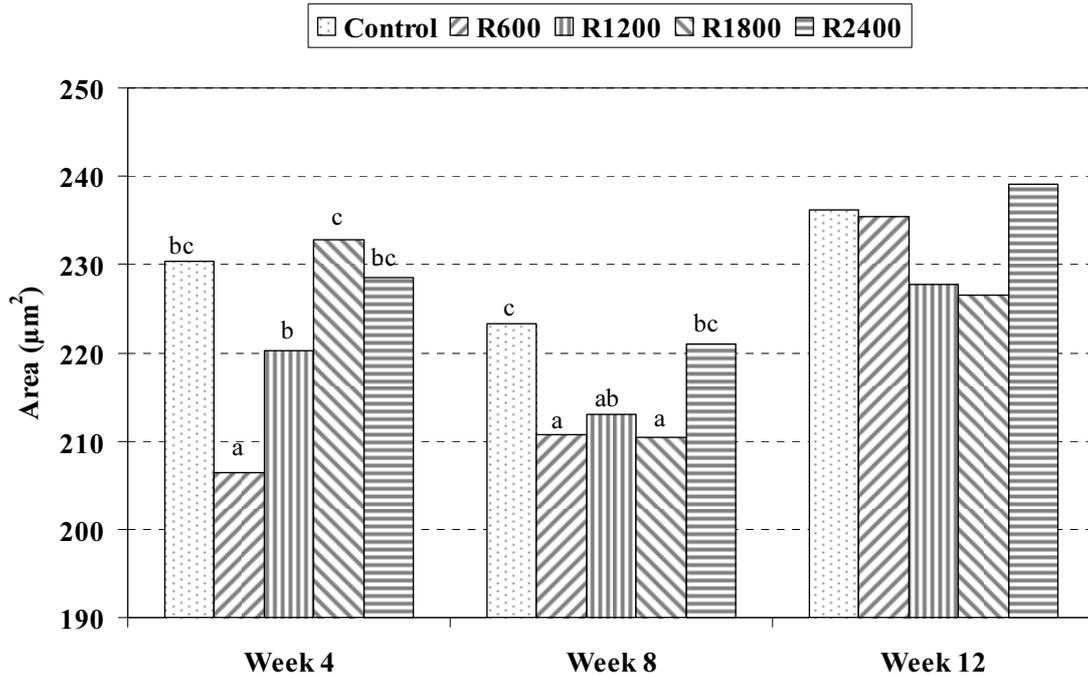


Figura 3. Área de hepatocitos medidos al azar en hígado de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales a durante 4, 8 y 12 semanas.

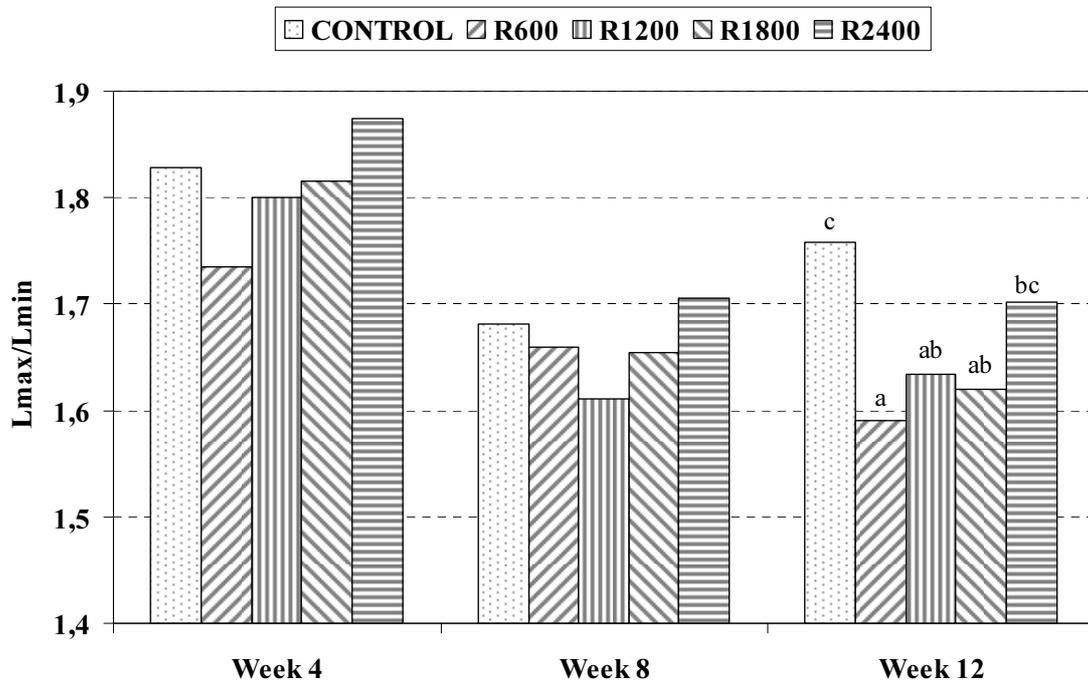


Figura 4. Desplazamiento del núcleo (índice Lmax/Lmin) en hepatocitos medidos al azar en hígado de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales durante 4, 8 y 12 semanas.

ANEXO II

Influencia del aceite esencial de tomillo como aditivo en pienso sobre el rendimiento y la funcionalidad del intestino de la dorada (*Sparus aurata*).

Influencia del aceite esencial de tomillo como aditivo en pienso sobre la funcionalidad del intestino de la dorada (*Sparus aurata*).

A. Hernández¹, B. García García¹, M.J. Caballero², M.D. Hernández¹

(a) IMIDA - Acuicultura. Carretera del puerto s/n, 30740, P.O. Box 65, San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain.

(b) IUSA. University of Las Palmas de Gran Canaria. Transmontaña s/n. 35413 Arucas, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

Resumen

Se alimentaron doradas con dietas conteniendo dosis crecientes de aceite esencial de tomillo (*Thymus zygis* subespecie *gracilis* -quimiotipo timol-): una dieta control (dieta basal) y cuatro dietas (T1000, T2000, T3000 y T4000) con 1000, 2000, 3000 y 4000 mg kg⁻¹, respectivamente, de aceite esencial de tomillo. Se recogieron heces para la determinación de la digestibilidad aparente y, una vez finalizado el periodo experimental (12 semanas), se sacrificaron los peces para realizar análisis biométricos, de composición corporal e histología del intestino. No se observaron diferencias en parámetros del rendimiento o composición corporal, si en los índices biométricos. El índice digestosomático se redujo con T2000, el índice de grasa mesentérica y el índice hepatosomático tendieron a descender con la adición de aceite esencial de tomillo. La digestibilidad descendió con las dietas T2000 y T3000. En el intestino se observó una fuerte migración de linfocitos hacia la mucosa subepitelial con la dosis T1000, acompañada de un engrosamiento de la misma, mientras que con dosis altas se produjo el efecto contrario.

Key words: *Sparus aurata*, Phytochemicals, Thyme essential oil, GALT, Digestibility.

1.- Introducción

Las plantas aromático-medicinales y sus aceites esenciales se han usado históricamente para el cuidado y manejo de animales de granja, principalmente por sus propiedades beneficiosas en la salud de los animales (ICS-UNIDO, 2007). En la primera mitad del siglo pasado se generalizó el uso de antibióticos en animales de granja, tanto para el tratamiento de enfermedades como para promover el crecimiento. Sin embargo, debido a su contribución al aumento de resistencias en patógenos humanos, su uso en animales de granja fue prohibido en Europa en 2006, siendo los fitoquímicos unos sustitutos prometedores. Entre ellos, los aceites esenciales y los compuestos aromáticos han sido muy estudiados, ya que actúan a lo largo del sistema digestivo de los animales modulando la flora intestinal y produciendo gran cantidad de beneficios (Kamel, 2001). Los aceites esenciales han demostrado ser capaces de mejorar el crecimiento en cerdo y en aves de corral en un porcentaje similar al producido por antibióticos (Franz et al., 2010). También se han probado compuestos aromáticos aislados como es el caso del timol y el carvacrol, aunque frecuentemente los resultados fueron mejores con aceites esenciales completos o mezclas de varios compuestos (Bampidis et al., 2005, Halle et al., 2004; Mathlouthi et al., 2012).

El principal modo de acción de los aceites esenciales parece ser la regulación de la microflora intestinal. El timol y el carvacrol tienen una potente actividad antimicrobiana, de las mayores encontradas en componentes de aceites esenciales (Dorman & Deans, 2000). Se han propuesto como modos de actuación la desestabilización de la membrana al intercalarse entre los fosfolípidos (Shapiro & Guggenheim, 1995), la inhibición de la producción de ATP o la modificación de los ácidos grasos de la membrana (Ultee et al., 1999; Lambert et al., 2001; Veldhuizen et

al., 2006). El carvacrol es capaz de inhibir la síntesis de flagelina, lo que hace a las bacterias inmóviles y menos capaces de unirse al epitelio intestinal. También se han encontrado otros efectos en animales terrestres que pueden proporcionar una mejor funcionalidad al intestino. Entre ellos está la reducción de la producción de toxinas bacterianas (Kroismayr et al., 2008), la estimulación de las secreciones digestivas, la mejora de la actividad de enzimas como la tripsina o la amilasa (Lee et al., 2003, Jang et al., 2004, Platel & Srinivasan, 2004) y el retraso del vaciado gástrico (Manzanilla et al., 2004).

Muchos de los resultados mostrados en artículos de investigación son difíciles de comparar porque se suele omitir información acerca de la composición exacta del aceite esencial. Es importante conocer la dosis exacta aplicada de cada compuesto aromático, pues los fitoquímicos suelen tener una respuesta bifásica que puede cambiar en gran medida dependiendo de las dosis estudiadas (Holst & Williamson, 2008). Esto, teniendo en cuenta la gran variabilidad intraespecífica de estos aceites en plantas aromáticas y la coincidencia de nombres comunes entre especies diferentes, es un gran problema (Franz et al., 2010).

Los fitoquímicos ya han demostrado importantes efectos en el crecimiento y el aprovechamiento del alimento, en el estado oxidativo, en la resistencia al estrés y en el sistema inmune de peces (Citarasu et al., 2010). Sin embargo, los efectos en la funcionalidad del sistema digestivo y del sistema linfático asociado al intestino (GALT) han sido poco estudiados en peces. Se han realizado pocos estudios utilizando tomillo como aditivo alimentario, y aún menos con timol como compuesto mayoritario. Mientras que en pez gato (*Ictalurus punctatus*) la administración de extracto rico en timol no tuvo ningún efecto en ganancia de peso, conversión del alimento y proteína en

el filete (Zheng et al., 2009), en trucha redujo el FCR y los anaerobios totales en el intestino, mejorando además el estado antioxidante y parámetros inmunológicos (Giannenas et al., 2012), aunque la composición exacta del fitoquímico comercial utilizado en este estudio es desconocida. También se han realizado otros estudios con aceite esencial de tomillo (quimiotipo timol) en dorada, enfocados principalmente en la calidad del pescado. En el estudio de Hernández et al. (2014), muchos de los parámetros estudiados, de gran importancia en la medida de la calidad del pescado, mostraron una relación lineal con la dosis de aceite esencial administrado.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en peces y la gran cantidad de efectos encontrados en otros animales, nuestro objetivo fue estudiar el efecto de dosis crecientes del aceite esencial de *Thymus zygis* subsp. *gracilis* en el aprovechamiento del alimento y la funcionalidad del intestino de la dorada.

2.- Material y métodos

2.1.- Animales y estabulación

Se distribuyeron 225 doradas con un peso inicial de $55,1 \pm 8,7$ g en 15 tanques (15 peces por tanque). Los tanques cilindro-cónicos de 260 l formaban parte de un circuito cerrado con agua de mar (salinidad: 37 g/l; NO^{-2} : <0.1 mg/l; NO^{-3} : <0.1 mg/l; NH_3 : <0.5 mg/l; pH: 7,7), equipado con un filtro biológico, una lámpara ultravioleta y una bomba de calor que controla la temperatura del circuito. La temperatura y el nivel de oxígeno fueron controlados diariamente con el objetivo de mantener la temperatura óptima para la dorada y el nivel de saturación de oxígeno por encima del 70%. Los peces fueron alimentados a saciedad aparente dos veces al día y la ingesta fue controlada diariamente. El experimento se llevó a cabo a lo largo de 12 semanas y las condiciones ambientales fueron las del fotoperiodo natural (37°50'N, 0°46'O) y una temperatura constante (24.2

± 0.6°C). Cada cuatro semanas los peces fueron muestreados para obtener datos de peso y talla. A partir de estos datos se calculó la tasa de crecimiento específico (SGR), la tasa de alimentación específica (SFR), el índice de conversión, la ingesta de proteína digestible, la tasa de eficiencia proteínica, la retención de proteína, la ingesta de energía digestible y la retención de energía, de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{SGR} = 100 (\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial})$$

$$\text{SFR} = 100 (\text{alimento ingerido} / \text{n}^\circ \text{ días}) / \text{peso medio}$$

$$\text{FCR} = \text{alimento ingerido} / \text{peso ganado}$$

$$\text{DPI} = \text{ingesta de proteína digestible} / [\text{días} \times \text{biomasa media (g)}] \times 100$$

$$\text{PER} = \text{Ganancia de peso (g)} / \text{proteína ofrecida (g)}$$

$$\text{PR} = \frac{\text{contenido final de proteína del pez} - \text{contenido inicial de proteína del pez}}{\text{contenido de proteína del pienso}}$$

$$\text{DEI} = \text{energía digestible} / [\text{days} \times \text{average biomass (g)}] \times 100$$

$$\text{ER} = \frac{\text{contenido final en energía del pez} - \text{contenido inicial en energía del pez}}{\text{contenido en energía del pienso}}$$

2.2.-Aceite esencial de tomillo

En este experimento se utilizó un aceite esencial de tomillo (*Thymus zygis* subsp. *gracilis* -quimiotipo timol-) proporcionado por Blas Lorente González, S.L. (Murcia, España). La composición cuantitativa del aceite esencial se determinó mediante cromatografía de gases – espectrometría de masas y se detalla en la Tabla 1.

2.3.- Dietas experimentales

Los peces fueron alimentados con cinco dietas experimentales (por triplicado): una dieta control (dieta basal) y cuatro dietas (T1000, T2000, T3000 y T4000) con 1, 2, 3 y 4 g

kg⁻¹, respectivamente, de aceite esencial de tomillo. Estas dietas isoproteicas e isoenergéticas fueron formuladas con un contenido lipídico de aproximadamente el 20 % (Tabla 1). Los ingredientes se mezclaron con una mezcladora horizontal RM-20 (MAINCA, Barcelona, Spain), primero los ingredientes sólidos, después el aceite de pescado y por último el agua. Debido a su naturaleza liposoluble, el aceite esencial de tomillo fue disuelto en el aceite de pescado antes de mezclar éste con el resto de ingredientes. Las dietas fueron elaboradas por cocción-extrusión, usando una extrusora semi-industrial (E 19/25 D, Brabender® GmbH & Co.K.G., Duisburg, Germany). Las condiciones de extrusión fueron: velocidad del tornillo de 50 rpm, diámetro de pellet de 4mm y temperaturas de 50/60/68 °C. Estas temperaturas fueron escogidas con el objetivo de no superar los 70°C a la salida de la extrusora y mantener la estabilidad de los compuestos aromáticos.

2.4.- Cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS)

Se analizaron muestras de 0,1 µL mediante cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS). Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 Series II Plus, equipado con una columna HP-5 de 30 m x 0.25 mm con 0.25 µm de espesor de fase estacionaria. La columna fue suministrada por Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). El gas portador fue Helio (a presión constante ajustada al tiempo de elución de la β-ionona en 25,5 minutos) y la división de flujo en la inyección se estableció en 100:1. El cromatógrafo de gases estaba acoplado a un detector de espectrometría de masas (Agilent Model 5972, Palo Alto, CA). El programa del horno que se aplicó se corresponde con una temperatura inicial de 60°C, aumentando en 2,5 °C/min hasta 155 °C y finalmente elevada hasta 250 °C a 10 °C/min. El puerto de inyección y la línea de transferencia al detector selectivo de masas se mantuvieron a 250 y 280°C,

respectivamente. El espectrómetro de masas fue utilizado en modo “ionización por impacto” con una energía de ionización de 70 eV, escaneando desde m/z 50 a 500, a 3.21 scan/seg. La temperatura del cuadrupolo fue de 150°C y el voltaje del multiplicador de electrones se mantuvo a 1300 V (*Jordán et al, 2009*).

Los componentes individuales fueron identificados en base a sus tiempos de retención y sus índices de Kovats (relativos a *n*-alcanos C₆-C₁₇), comparados a su vez con los de compuestos de referencia y por comparación de espectro de masas utilizando la librería NBS75K (United States, National Bureau of Standards, 2002) y los espectros obtenidos de los estándares de referencia. La composición porcentual de las muestras fue calculada de acuerdo al área de los picos cromatográficos, utilizando el contenido iónico total.

2.5.- Relaciones biométricas y composición proximal de los peces

Al final del periodo de engorde se sacrificaron 9 peces de cada tanque, de los cuales 3 fueron triturados para la determinación de macronutrientes y los 6 restantes fueron diseccionados. De ellos se extrajo el hígado, el intestino y la grasa mesentérica, que fueron pesados por separado. A partir de los datos de peso obtenidos para los órganos y los datos de talla y peso se calcularon los siguientes índices somáticos:

$$\text{Factor de condición (CF)} = 100 \times (\text{peso corporal} / \text{longitud}^3)$$

$$\text{Índice hepatosomático (HSI)} = 100 \times (\text{peso del hígado} / \text{peso corporal})$$

$$\text{Índice digestosomático (DSI)} = 100 \times (\text{peso del digestivo} / \text{peso corporal})$$

$$\text{Índice de grasa mesentérica (MFI)} = 100 \times (\text{peso de grasa mesentérica} / \text{peso corporal})$$

El contenido en nutrientes de las dietas, las heces y los peces enteros se determinaron mediante los procedimientos de la AOAC (1997), para materia seca (934.01), proteína

como 6.25 x contenido en nitrógeno (928.08), grasa (960.39), cenizas (942.05) y fibra cruda (978.10).

2.6.- Análisis histológico del intestino

Se diseccionaron los intestinos de cada pez y se introdujeron, para su fijación, en formol al 10%, tamponado a pH 7 y estabilizado con metanol (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España), en una relación inferior a 1/10 (muestra/fijador). Las muestras se mantuvieron en el líquido fijador hasta su posterior procesado y análisis histológico. Para cada individuo, se obtuvieron 3 segmentos del intestino anterior y 4 segmentos del intestino posterior, para luego ser incluidos en parafina. Para la preparación de las láminas histológicas se hicieron cortes a 4 μ m y se tiñeron con hematoxilina-eosina. En las láminas de intestino se evaluaron la cantidad de agregados linfocitarios, de granulocitos y el engrosamiento de la lámina propia. Esta evaluación se llevó a cabo por dos científicos, de forma individual e ignorando la identidad de cada muestra y los tratamientos experimentales. Previamente se estableció un sistema de puntuación histológica de la forma siguiente: 0, no observado; 1, escaso; 2, moderado; 3, alto (Figura 1). Se tomaron microfotografías de intestino usando un microscopio Nikon Microphot-FXA y una cámara Olympus DP50.

2.7.- Determinación de la digestibilidad aparente

La recogida de heces se llevó a cabo durante el último mes del experimento. Los peces fueron alimentados con las mismas dietas experimentales, pero conteniendo 1g kg⁻¹ de óxido de itrio como marcador. Después de un periodo de adaptación a las dietas de una semana, las heces fueron recolectadas durante 4 semanas, 4 días a la semana. Éstas fueron centrifugadas (4 °C, 4000 rpm, 15 minutos) y liofilizadas para analizar

posteriormente macronutrientes y contenido en óxido de itrio. El coeficiente de digestibilidad aparente se calculó (ADC) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{ADC (\%)} = 100 - [100(\% I \text{ diet} / \% I \text{ faeces}) \times (\% N \text{ faeces} / \% N \text{ diet})]$$

Donde *I* es el marcador (óxido de itrio), y *N* es el nutriente. El contenido en Itrio se midió mediante espectrometría atómica (ICP-OES; Vista-MPX, Varian) tras la digestión ácida de la muestra en un sistema microondas (Ethos 1, Milestone). La digestión ácida se llevó a cabo pesando 1g de pienso o 0,3g de heces liofilizadas en un recipiente para microondas, añadiendo 15 ml de ácido nítrico libre de metales traza y utilizando el siguiente programa en el digestor microondas: 3' 700W 100 °C; 10' 700 W 165 °C; 3' 700W 185 °C; 15' 700W 185 °C. Se calcularon los ADC para materia seca (ADC_{DM}), proteína (ADC_P), grasa (ADC_F) y MELN (ADC_{NFE}).

2.8.- Análisis estadístico

En el análisis estadístico de los datos se utilizó ANOVA de una vía para determinar las diferencias estadísticas entre las distintas dosis. En el caso del estudio histológico del intestino se utilizó el test de Kruskal-Wallis, debido a la naturaleza semicuantitativa de los datos (tres categorías del sistema de puntuación) y el no cumplimiento del requisito de normalidad de los datos (Uran et al., 2009). Las diferencias entre cada uno de los grupos experimentales se determinaron por pares mediante el test de la U de Mann-Whitney.

3.- Resultados

Todas las dietas fueron bien aceptadas por los peces, sin diferencias significativas en la ingesta entre las distintas dosis. La supervivencia no descendió del 98% en ninguno de los grupos. Los valores de SGR fueron los normales para estas condiciones y el FCR

estuvo por encima de lo normal con todas las dietas, incluida la dieta control (Tabla 3). En otros índices se observaron ciertas tendencias: el incremento de peso (WG), la retención de proteína (PR) y la retención de energía (ER) mostraron valores medios ligeramente inferiores con las dietas con aceite esencial de tomillo, aunque sin diferencias significativas.

La digestibilidad aparente (ADC) de los nutrientes de la dieta varió con la dosis de aceite esencial de tomillo (Tabla 4). El ADC de materia seca, proteína, grasa y energía descendió con las dosis T2000 y T3000. Los ADC se recuperaron con la dosis T4000, siendo superiores a T2000 y en el caso de la grasa igual al control. Para la proteína la digestibilidad fluctuó entre 92.9 % y 89.5 % mientras que para grasa estuvo entre 95.8 % y 97.9 %. El ADC de materia extraíble libre de nitrógeno fue menor, con valores entre el 80.7% con la dosis T3000 y un máximo de 85.9% con la dieta control, no existiendo diferencias significativas entre dosis. Las diferencias observadas en digestibilidad no se tradujeron en diferentes valores de DPI, DEI, PR o ER (Tabla 3).

La composición corporal de los peces después del ensayo de engorde no fue diferente entre dosis (Tabla 5). En cuanto a los índices biométricos, se observaron diferencias en el índice digesto-somático (DSI), siendo el valor de T2000 significativamente inferior al grupo control. El factor de condición (CF) no mostró diferencias significativas entre grupos experimentales, al igual que el índice hepato-somático (HSI) y el índice de grasa mesentérica (MFI). En estos dos últimos índices, es de destacar los valores medios ligeramente inferiores de las dietas con aceite esencial de tomillo.

El estudio histológico del intestino mostró diferencias entre dosis en el intestino anterior (Figura 2), revelando un efecto importante del aceite esencial de tomillo en el movimiento de linfocitos y otras células del sistema inmune asociado al intestino

(GALT). Los peces alimentados con la dosis T1000 se caracterizaron por un infiltrado de linfocitos en la mucosa subepitelial, acompañado por una tendencia a aumentar la abundancia de granulocitos. Con dosis altas (T3000 y T4000) la infiltración de linfocitos fue menor a T1000 y en el caso de la dosis más alta fue significativamente menor al control. En dosis altas también se observó una tendencia a descender la abundancia de granulocitos y el engrosamiento de la mucosa subepitelial.

En la morfología del intestino posterior no hubo diferencias significativas entre dietas, sí se observaron tendencias en todos los parámetros de forma similar a lo ocurrido en el intestino anterior. El efecto del aceite esencial de tomillo fue en general más prominente en el intestino anterior que en el posterior.

4.- Discusión

Se han probado compuestos ricos en timol y carvacrol en peces, con buenos resultados en rendimiento a unas dosis similares a las nuestras (Ahmadifar et al., 2011). También se han probado aditivos comerciales incluidos en el pienso al 1 g/kg y conteniendo 0,6% en timol (Giannenas et al., 2012), con una mejora de la conversión del alimento. Sin embargo, la inclusión aislada de carvacrol en la dieta a 250 o 500 mg/kg no produjo cambios en el crecimiento o en el aprovechamiento del alimento (Volpatti et al, 2013). Aparte de la escasa bibliografía acerca del efecto del aceite esencial de tomillo sobre el rendimiento de peces, los trabajos sobre su inclusión en dietas para aves de corral son en algunos casos contradictorios. Por lo general se observa un efecto beneficioso del aceite esencial de tomillo sobre el crecimiento de los animales (Abdel-Wareth et al., 2012; Bolukbasi et al., 2006; Cross et al., 2007; Toghyani et al., 2010). En otros estudios se observa que a ciertas dosis (500 mg/kg, 1000 mg/kg) mejora el índice de conversión pero empeora con dosis superiores (3000 mg/kg) (Bolukbasi & Erhan, 2007). En

nuestro caso no hay diferencias suficientes en cuanto al rendimiento de los peces, pero se puede apreciar una tendencia a producir una menor ganancia de peso y peor conversión del alimento con dietas que contienen aceite esencial de tomillo. Teniendo en cuenta que el aceite esencial de tomillo tiene mejores efectos en el crecimiento que otros componentes de la planta (Cross et al., 2007), es posible que la ausencia de un efecto beneficioso en nuestros peces se deba a la dosis aplicada.

El efecto del aceite esencial de tomillo en los índices somáticos también es importante ya que éstos proporcionan información acerca del estado fisiológico de los peces. La tendencia a descender el HSI y el MFI de los peces con la adición de aceite esencial de tomillo podría indicar un efecto sobre el metabolismo lipídico, como ya se ha demostrado en aves. Esta modulación del metabolismo lipídico en aves se tradujo en ocasiones en la reducción de los índices HSI y MFI (Abdulkarimi et al, 2011), del contenido lipídico del músculo (Bolukbasi et al., 2006; El-Ghousein et al., 2009) y de ciertos parámetros sanguíneos como el colesterol HDL (Toghyani et al., 2010). A pesar de que no existen diferencias en la composición corporal de nuestros peces, los que se alimentaron con dietas que contenían dosis altas de aceite esencial de tomillo tuvieron un contenido medio en grasa ligeramente inferior al control. Las diferencias observadas en el índice digestosomático muestran una respuesta interesante proporcional a los cambios en digestibilidad. El descenso del peso del intestino sobre todo con la dosis T2000 podría estar acompañado de un acortamiento del intestino, lo que pudimos intuir durante el procesado histológico. El descenso de peso del digestivo podría no deberse simplemente a un acortamiento, sino también a la reducción de grosor de la mucosa subepitelial, por lo que serían necesarios estudios biométricos más detallados para poder establecer una relación entre este índice, la histología y la digestibilidad. En cualquier caso, en dosis altas, el aceite esencial de tomillo tiene efectos perjudiciales sobre la

digestibilidad de los principales nutrientes (proteína y grasa) en peces. Esto no se traduce en un descenso de DPI, PR, DEI o ER, lo cual indica que los cambios en digestibilidad no son suficientes para afectar significativamente al rendimiento.

La absorción mayoritaria de grasas en el intestino anterior de peces (Vernier & Mellinger, 1990) y la naturaleza liposoluble del aceite esencial de tomillo puede haber propiciado que el efecto en el GALT y en la morfología sea mucho más patente en el intestino anterior. La administración de polifenoles por vía oral induce la expresión de genes involucrados en muchas funciones fisiológicas, principalmente la respuesta inflamatoria y el metabolismo de esteroides (Dolara et al., 2005). Incluso algunos autores proponen que las actividades no-antioxidantes de los polifenoles podrían ser más importantes y biológicamente relevantes que sus actividades antioxidantes (Surai et al., 2004).

Se ha propuesto por varios autores un efecto dosis-respuesta bifásico para los fitoquímicos –definido como “hormesis” en toxicología-, al igual que el encontrado en varios aspectos de nuestros peces (Mattson et al., 2008b, Host & Williamson, 2008). Este tipo de efecto dosis dependiente se basa en una cierta actividad beneficiosa o estimulante a dosis bajas y un efecto más perjudicial o inhibitorio a dosis altas conforme aumenta la dosis. Existe la evidencia de que, al menos algunos fitoquímicos, ejercen sus efectos beneficiosos activando rutas de respuesta adaptativa al estrés (Mattson et al., 2008a), actuando como “low dose stressors”. Se ha observado que la aplicación a dosis bajas de fitoquímicos presentes en el ajo y en brócoli activa la transcripción de un grupo de genes llamado “elemento de respuesta antioxidante” (ARE) que codifica varias enzimas antioxidantes citoprotectivas (Balogun et al., 2003; Chen et al., 2004). Giannenas et al. (2012) estudiaron la actividad de la glutatión-S-transferasa (una de las

enzimas codificadas por ARE) en trucha alimentada con dietas suplementadas con carvacrol y timol a dosis muy bajas, observando un aumento de su actividad, por lo que este tipo de vías de actuación podrían funcionar de igual manera en peces. Además, como ya es conocido en humanos, los resultados en animales muestran que el modo de actuación de los aceites esenciales y extractos se debe, al menos en parte, a la irritación del epitelio con el consiguiente incremento en secreción de mucus y enzimas (Franz et al., 2010).

Los cambios en el movimiento de células inmunitarias en el intestino sugieren una estimulación del sistema inmune con la dosis más baja (T1000), acompañado de cierta inflamación. Esto podría ser debido al reconocimiento y manejo de los compuestos presentes en el aceite esencial de tomillo como xenobióticos, produciendo una respuesta inmune que explicaría su absorción realmente baja, de entre un 1 y un 60% (Manach et al., 2005; Kahle et al., 2005)

El efecto observado a dosis altas, reduciéndose la presencia de linfocitos por debajo del grupo control, acompañado de la tendencia a reducirse el tamaño de la mucosa subepitelial, podría estar relacionado con la actividad anti-inflamatoria del timol y del carvacrol. Ocaña & Reglero (2012) estudiaron el efecto de varios aceites esenciales de tomillo sobre la producción y expresión de citoquinas, observando una reducción de la producción y expresión de mediadores pro-inflamatorios como TNF- α , IL-1 β e IL-6 y un aumento en la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Este efecto fue más intenso con el aceite esencial de *Thymus zygis*, con mayor contenido en timol que los otros y similar al de nuestro aceite esencial. Lima et al. (2013) observaron un efecto similar del carvacrol, comprobando en este caso que el papel principal de IL-10 en la reducción de mediadores pro-inflamatorios y pudiendo estar más relacionada con la diana de este

compuesto. Se ha demostrado el efecto inhibitorio del timol sobre la producción de enzimas relacionadas con procesos inflamatorios, como es el caso de la elastasa y la ciclooxigenasa (Marsik et al., 2005; Braga et al., 2006). Esta última es diana también de potentes fármacos anti-inflamatorios como el ibuprofeno y la aspirina. Sin embargo, además de las actividades demostradas “in vitro”, es necesario comprobar estos efectos en modelos animales. El timol y el carvacrol parecen tener un efecto anti-inflamatorio en el intestino de ratón mediante la administración oral (Nakhai et al., 2007) ya que la administración de aceite esencial de *Zataria multiflora*, en el que predominan estos dos compuestos reduce la inflamación del intestino de forma comparable a la prednisolona dependiendo fuertemente de la dosis. Aunque el efecto del aceite esencial en aspectos histológicos propios de inflamación en la dorada es evidente, sería necesario el estudio de parámetros bioquímicos (Nakhai et al., 2007) o de la expresión génica y producción de citoquinas “in situ” para confirmar el efecto anti-inflamatorio y dosis-dependiente en peces. Este posible efecto anti-inflamatorio a dosis altas no tiene una aplicación a priori en peces, a no ser que se busque reducir estados inflamatorios como la enteritis producida por proteínas de la soja, de gran interés en acuicultura (Uran et al, 2009a, 2009b).

Un efecto inmuno-estimulante como el que se observa con la dosis T1000 puede ser beneficioso para el pez en varios aspectos de su fisiología. El efecto beneficioso de inmuno-estimulantes como los oligosacáridos de manosa (MOS) en peces abarca muchos aspectos del pez, desde el propio sistema inmune hasta la fisiología general (Torrecillas et al., 2014). Según estos autores la estimulación del GALT mejora la integridad del intestino, la secreción de mucus y el funcionamiento del metabolismo lipídico y glucídico. El efecto de los polifenoles sobre el metabolismo lipídico y glucídico afectando directamente a la actividad enzimática y al funcionamiento de

determinados órganos (Bakirel et al., 2008; Cui et al., 2012) indica que podrían haber varias vías de actuación simultáneas de los polifenoles añadidos a la dieta.

El efecto perjudicial del aceite de tomillo sobre la digestibilidad a dosis altas es de tener en cuenta, aunque la recuperación parcial con la dosis más alta podría sugerir la necesidad de un estudio más amplio en cuanto a dosis ya que detrás de estos resultados puede existir un efecto dosis-respuesta más complejo (Figura 3) y no apreciable en el rango de dosis estudiado (Murado & Vázquez, 2007).

5.- Conclusión

El aceite esencial de tomillo añadido al pienso de dorada produce importantes efectos en la digestibilidad y la movilidad de células inmunes del GALT. Ambos aspectos muestran una respuesta bifásica a la inclusión de aceite esencial de tomillo, del tipo observado en gran número de fitoquímicos. La digestibilidad de proteínas y grasas se reduce con las dosis de 2000 y 3000 mg/kg. A pesar de la ausencia de cambios en el rendimiento del engorde, los índices biométricos sugieren un cambio en el metabolismo y el peso del intestino se reduce proporcionalmente a la digestibilidad. Los análisis histológicos sugieren un efecto anti-inflamatorio del timol a dosis altas en el intestino de dorada, ya observado “in vitro” y en el intestino de otros animales. La dosis T1000 produce cierta estimulación del GALT, lo que, junto con la ausencia de cambios en digestibilidad la hace la más aceptable para dorada. En general, los resultados obtenidos sugieren que habría que utilizar dosis más bajas con el objetivo de mejorar la fisiología general de la dorada.

Referencias

- Abdel-Wareth, A. A. A., Kehraus, S., Hippenstiel, F., & Südekum, K. H. (2012). Effects of thyme and oregano on growth performance of broilers from 4 to 42 days of age and on microbial counts in crop, small intestine and caecum of 42-day-old broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 178(3), 198-202.
- Abdulkarimi, R., Daneshyar, M., & Aghazadeh, A. (2011). Thyme (*Thymus vulgaris*) extract consumption darkens liver, lowers blood cholesterol, proportional liver and abdominal fat weights in broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science*, 10(2), e20.
- Ahmadifar, E., Falahatkar, B., & Akrami, R. (2011). Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(4), 1057-1060.
- Bakirel, T., Bakirel, U., Keleş, O. Ü., Ülgen, S. G., & Yardibi, H. (2008). In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 64-73.
- Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C., Foresti, R., Alam, J., & Motterlini, R. (2003). Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochemical Journal*, 371, 887-895.
- Bampidis, V. A., Christodoulou, V., Florou-Paneri, P., Christaki, E., Chatzopoulou, P. S., Tsiligianni, T., & Spais, A. B. (2005). Effect of dietary dried oregano leaves

on growth performance, carcase characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. *British Poultry Science*, 46(5), 595-601.

Bölükbaşı, Ş. C., & Erhan, M. K. (2007). Effect of dietary thyme (*Thymus vulgaris*) on laying hens performance and *Escherichia coli* (E. coli) concentration in faeces. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 1(2), 55-58.

Bolukbasi, S. C., Erhan, M. K., & Ozkan, A. (2006). Effect of dietary thyme oil and vitamin E on growth, lipid oxidation, meat fatty acid composition and serum lipoproteins of broilers. *South African Journal of Animal Science*, 36(3), p-189.

Braga, P. C., Dal Sasso, M., Culici, M., Bianchi, T., Bordoni, L., & Marabini, L. (2006). Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. *Pharmacology*, 77(3), 130-136.

Chen, C., Pung, D., Leong, V., Hebbar, V., Shen, G., Nair, S., Li, W., Kong, A.N., 2004. Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2: effect of chemical structure and stress signals. *Free Radical Biology & Medicine*. 37, 1578–1590

Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3), 403-414.

Cross, D.E., McDevitt, R.M., Hillman, K., & Acamovic, T. (2007). The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in young chickens from 7-28 days of age. *British Poultry Science*, 48(4), 496-506.

- Cui, L., Kim, M. O., Seo, J. H., Kim, I. S., Kim, N. Y., Lee, S. H., ... & Lee, H. S. (2012). Abietane diterpenoids of *Rosmarinus officinalis* and their diacylglycerol acyltransferase-inhibitory activity. *Food Chemistry*, 132(4), 1775-1780.
- Dolara, P., Luceri, C., Filippo, C. D., Femia, A. P., Giovannelli, L., Caderni, G., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., & Cresci, A. (2005). Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1), 237-246.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- El-Ghousein, S. S., & Al-Beitawi, N. A. (2009). The effect of feeding of crushed thyme (*Thymus vulgaris* L) on growth, blood constituents, gastrointestinal tract and carcass characteristics of broiler chickens. *Journal of Poultry Science*, 46(2), 100-104.
- Franz, C., Baser, K. H. C., & Windisch, W. (2010). Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 327-340.
- Giannenas, I., Triantafyllou, E., Stavrakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T., & Karagouni, E. (2012). Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and

antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350, 26-32.

Halle, I., Thomann, R., Bauermann, U., Henning, M., Köhler, P. (2004). Effects of a graded supplementation of herbs and essential oils in broiler feed on growth and carcass traits. *Landbauforsch. Völkenrode* 54, 219–229.

Hernández, A., García García, B., Jordán, M.J., & Hernández, M.D. (2014). Improved conservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in ice storage. The influence of doses of rosemary extract added to feed. *Aquaculture*, 426, 31-40.

Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 73-82.

Jang, I. S., Ko, Y. H., Yang, H. Y., Ha, J. S., Kim, J. Y., Kim, J. Y., Kang, S. Y., Yoo, D. H., Nam, D. S., Kim, D. H., & Lee, C. Y. (2004). Influence of essential oil components on growth performance and the functional activity of the pancreas and small intestine in broiler chickens. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 17(3), 394-400.

Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., & Richling, E. (2005). Colonic availability of apple polyphenols—a study in ileostomy subjects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(12), 1143-1150.

Kamel, C. (2001). In *Recent Advances in Animal Nutrition*, P. C. Garnsworthy, J. Wiseman (eds). Nottingham University Press: Nottingham, UK, p 135.

- Kroismayr, A., Sehm, J., Pfaffl, M., Plitzner, C., Foissy, H., Etle, T., Schreiner, M. & Windisch, W. (2008). Effects of essential oils or Avilamycin on gut microbiology and blood parameters of weaned piglets. *Czech Journal of Animal Science*, 53, 377-87.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
- Lee, K. W., Everts, H., Kappert, H. J., Frehner, M., Losa, R., & Beynen, A. C. (2003). Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *British Poultry Science*, 44(3), 450-457.
- Lima, M. D. S., Quintans-Júnior, L. J., de Santana, W. A., Martins Kaneto, C., Pereira Soares, M. B., & Villarreal, C. F. (2013). Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *European Journal of Pharmacology*, 699(1), 112-117.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230S-242S.
- Manzanilla, E. G., Perez, J. F., Martin, M., Kamel, C., Baucells, F., & Gasa, J. (2004). Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 82(11), 3210-3218.

- Marsik, P., Kokoska, L., Landa, P., Nepovim, A., Soudek, P., Vanek, T., 2005. In vitro inhibitory effects of thymol and quinones of *Nigella sativa* seeds on cyclooxygenase-1- and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosynthesis. *Planta Medica*, 71, 739–742.
- Mathlouthi, N., Bouzaienne, T., Oueslati, I., Recoquillay, F., Hamdi, M., Urdaci, M., & Bergaoui, R. (2012). Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: In vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *Journal of Animal Science*, 90(3), 813-823.
- Mattson, M. P. (2008a). Dietary factors, hormesis and health. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 43-48.
- Mattson, M. P. (2008b). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 1-7.
- Murado, M. A., & Vázquez, J. A. (2007). The notion of hormesis and the dose–response theory: a unified approach. *Journal of Theoretical Biology*, 244(3), 489-499.
- Nakhai, L.A., Mohammadirad, A., Yasa, N., Minaie, B., Nikfar, S., Ghazanfari, G., Zamani, M.J., Dehghan, G., Jamshidi, H., Boushehri, V.S., Khorasani, R. & Abdollahi, M. B (2007). Benefits of *Zataria multiflora* Boiss in experimental model of mouse inflammatory bowel disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4(1), 43-50.
- Ocaña, A., & Reglero, G. (2012). Effects of Thyme Extract Oils (from *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus hyemalis*) on Cytokine Production and Gene Expression of oxLDL-Stimulated THP-1-Macrophages. *Journal of Obesity*, 2012.

- Platel, K., & Srinivasan, K. (2004). Digestive stimulant action of spices: a myth or reality?. *The Indian Journal of Medical Research*, 119(5), 167-179.
- Shapiro, S., & Guggenheim, B. (1995). The action of thymol on oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 10(4), 241-246.
- Surai, K. P., Surai, P. F., Speake, B. K., & Sparks, N. H. (2004). Antioxidant-prooxidant balance in the intestine: food for thought 2. antioxidants. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 2(1), 27-46.
- Toghyani, M., Tohidi, M., Gheisari, A. A., & Tabeidian, S. A. (2010). Performance, immunity, serum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter. *African Journal of Biotechnology*, 9(40), 6819-6825.
- Torrecillas, S., Montero, D., & Izquierdo, M. (2014). Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: potential mode of action. *Fish & shellfish immunology* 36(2), 525-544.
- Ultee, A., Kets, E. P. W., & Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4606-4610.
- Urán, P. A., Schrama, J. W., Jaafari, S., Baardsen, G., Rombout, J. H. W. M., Koppe, W., & Verreth, J. A. J. (2009a). Variation in commercial sources of soybean meal influences the severity of enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*, 15(5), 492-499.

- Urán, P. A., Schrama, J. W., Rombout, J. H. W. M., Taverne-Thiele, J. J., Obach, A., Koppe, W., & Verreth, J. A. J. (2009b). Time-related changes of the intestinal morphology of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at two different soybean meal inclusion levels. *Journal of fish diseases*, 32(9), 733-744.
- Veldhuizen E.J.A., Tjeersma-Van Bokhoven J.L.M., Zweijtzer C., Burt S.A. and Haagsman H.P. (2006). Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54,1874-1879.
- Vernier, J. M., & Mellinger, J. (1990). Intestine ultrastructure in relation to lipid and protein absorption in teleost fish. *Comparative Physiology*, 5, 166-175.
- Volpatti, D., Chiara, B., Francesca, T., & Marco, G. (2013). Growth parameters, innate immune response and resistance to *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum* of *Dicentrarchus labrax* fed carvacrol supplemented diets. *Aquaculture Research*, 45(1), 31-44.
- Zheng, Z. L., Tan, J. Y., Liu, H. Y., Zhou, X. H., Xiang, X., & Wang, K. Y. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292(3), 214-218.

Tabla 1Composición química del aceite esencial de *Thymus zygis* subsp. *gracilis*.

	R.I.*	(%) Concentración relativa
Hidrocarburos terpénicos		
α -Thujene	923	0,41
α -Pinene	928	0,68
Camphene	939	0,23
β -Pinene	961	0,11
β -Myrcene	974	0,85
α -Phellandrene	985	0,17
Δ_3 -Carene	991	0,07
α -Terpinene	997	1,33
<i>p</i> -Cymene	1005	14,91
Limonene	1009	0,49
(<i>E</i>)- β -Ocimene	1029	0,02
γ -Terpinene	1041	3,60
Terpinolene	1072	0,13
(<i>E</i>)-Caryophyllene	1417	1,64
Aromadendrene	1434	0,15
α -Humulene	1448	0,45
(<i>Z</i>)- β -Bisabolene	1508	n.d.
(<i>Z</i>)- α -Bisabolene	1545	n.d.
Viridiflorene	1490	0,13
δ -Cadinene	1521	0,06
Alcoholes		
1-Octen-3-ol	964	0,03
3-Octanol	978	0,02
(<i>Z</i>)-Sabinene hydrate	1049	0,22
Linalool	1088	2,34
Borneol	1159	0,57
Terpinen-4-ol	1172	0,55
Cetonas		
3-Octanone	970	0,03
Carvone	1256	n.d.
Fenoles		
Thymol methyl ether	1248	0,37
Thymol	1314	64,91
Carvacrol	1318	4,39
Eugenol	1363	n.d.
Epoxides		
(<i>Z</i>)- Linalool oxide	1055	0,02
Caryophyllene oxide	1583	0,20
Ésteres		
1,8-Cineol	1011	0,03

Tabla 2

Ingredientes y composición proximal de las dietas experimentales.

	Control	T1000	T2000	T3000	T4000
<i>Ingredientes (g/kg)</i>					
Aceite de pescado	150				
Gluten de trigo	80				
Harina de pescado	560				
Harina de trigo	200				
Premix vitamínico-mineral ^(a)	10				
<i>Aceite esencial de tomillo (g/kg)</i>	-	1	2	3	4
<i>Composición proximal (% materia seca)</i>					
Materia seca	91,3	87,6	86,9	84,2	85,7
Proteína	44,6	45,5	45,8	46,6	46,1
Grasa	21,3	20,7	20,4	19,9	20,7
Cenizas	10,9	11,0	11,0	11,0	11,0
MELN ^(b)	22,9	22,5	22,4	22,1	21,8
Fibra	0,3	0,4	0,5	0,4	0,5
<i>Contenido en nutrientes digestibles (% materia seca)</i>					
Proteína digestible	34,0	32,9	29,7	31,6	32,7
Grasa digestible	19,8	18,9	17,6	17,6	18,7
Energía digestible (MJ kg ⁻¹)	15,2	14,5	13,2	13,2	14,1

^(a) Premix vitamínico-mineral, de acuerdo a las recomendaciones NRC (1993) para peces.^(b) Materia extraíble libre de nitrógeno.

Tabla 3

Efecto de la dieta en el crecimiento, la utilización de los nutrientes y la supervivencia.

	Control	T 1000	T 2000	T 3000	T 4000
IW (g)	55,5±1,4	55,1±1,5	54,1±1,5	56,0±0,3	55,1±1,9
FW (g)	188,5±4,6	185,9±12,3	178,4±17,1	183,9±15,1	180,0±6,2
WG (g)	133,0±3,2	130,8±11,0	124,3±15,7	127,9±14,9	125,0±10,2
SGR	1,42±0,00	1,41±0,05	1,38±0,08	1,38±0,09	1,38±0,03
SFR	2,72±0,02	2,81±0,17	2,84±0,14	2,74±0,06	2,84±0,05
FCR	2,14±0,02	2,23±0,19	2,29±0,17	2,22±0,16	2,29±0,01
DPI (g DP 100g pez-1 día-1)	1,15±0,01	1,18±0,08	1,16±0,05	1,13±0,01	1,18±0,01
PER	1,05±0,01	0,99±0,08	0,96±0,07	0,97±0,07	0,95±0,00
PR (%)	40,4±0,3	37,3±3,2	38,0±3,0	38,9±3,2	37,9±0,1
DEI(kj DE 100g pez-1 día-1)	0,51±0,01	0,51±0,03	0,51±0,02	0,49±0,01	0,51±0,01
ER (%)	59,2±0,5	59,4±4,7	56,8±4,0	57,7±4,0	54,0±0,2
Supervivencia (%)	100	98	98	100	100

IW: peso inicial; FW: peso final; WG: peso ganado; SGR: tasa de crecimiento específico; SFR: tasa de alimentación específica; FCR: factor de conversión de alimento; DPI: ingesta de proteína digestible; PER: coeficiente de eficiencia proteica; PR: retención de proteína; DEI: ingesta de energía digestible; ER: retención de energía.

Tabla 4

Coefficientes de digestibilidad aparente (ADC) de los principales nutrientes para peces alimentados con las distintas dietas experimentales (en % de materia seca).

	Control	Timol 1000	Timol 2000	Timol 3000	Timol 4000
ADC _{DM}	85,6±0,0 ^c	85,0±0,6 ^c	81,6±0,1 ^a	81,3±0,4 ^a	83,2±0,0 ^b
ADC _{CP}	92,9±0,7 ^c	91,7±0,7 ^{bc}	89,5±0,9 ^a	90,4±1,0 ^{ab}	91,3±0,9 ^b
ADC _{CF}	97,9±0,6 ^c	97,4±0,4 ^{bc}	95,8±0,9 ^a	96,5±0,7 ^{ab}	97,1±0,8 ^{abc}
ADC _{NFE}	85,9±2,6	85,2±3,3	83,4±1,5	80,7±1,0	83,6±1,9
ADC _E	93,5±0,8 ^c	92,6±0,6 ^{bc}	90,6±0,2 ^a	90,6±0,8 ^a	92,0±0,4 ^b

DM: Materia seca; CP: proteína; CF: grasa; NFE: Extracto libre de nitrógeno; E: Energía

Tabla 5

Composición corporal (%) e índices biométricos de los peces alimentados con las distintas dietas experimentales.

	Control	T 1000	Timol 2000	Timol 3000	Timol 4000
Humedad	61,00±0,50	60,91±0,56	62,12±0,97	62,13±0,15	61,68±1,07
Proteína bruta	16,50±0,05	16,26±0,27	16,27±0,03	16,47±0,20	16,59±0,21
Grasa bruta	17,66±1,36	18,41±0,04	17,25±1,59	16,79±0,63	16,65±1,76
Minerales	3,61±0,09	3,36±0,11	3,61±0,24	3,63±0,26	3,39±0,12
CF	1,81±0,09	1,80±0,11	1,79±0,11	1,82±0,12	1,79±0,10
HSI	1,78±0,32	1,67±0,29	1,67±0,31	1,69±0,41	1,57±0,31
DSI	1,65±0,25 ^b	1,53±0,19 ^{ab}	1,40±0,20 ^a	1,58±0,22 ^b	1,54±0,27 ^{ab}
MFI	1,49±0,76	1,44±0,54	1,36±0,77	1,54±0,54	1,47±0,59

CF: Factor de condición; HSI: Índice hepatosomático; DSI: Índice digestosomático; MFI: Índice de grasa mesentérica

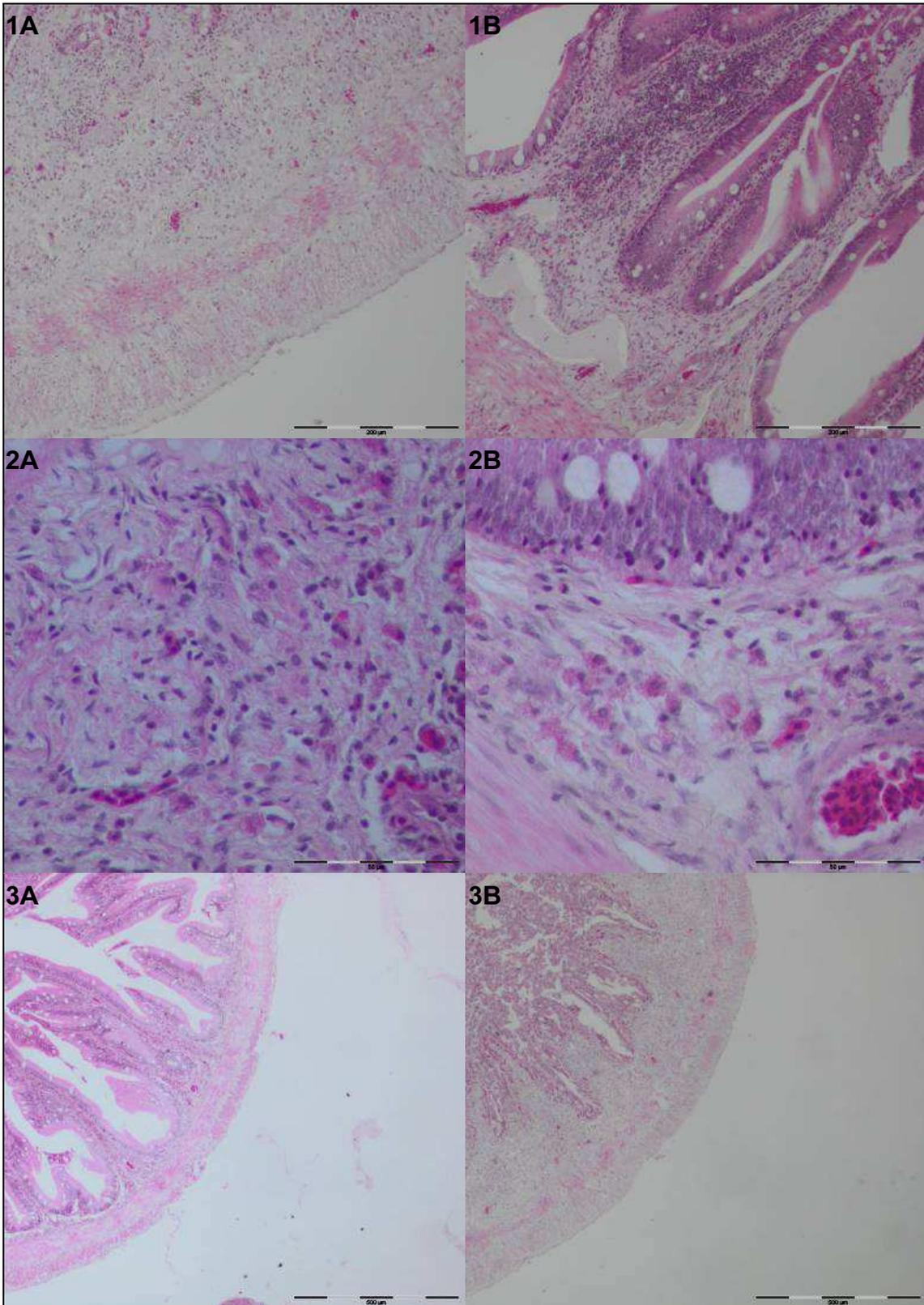


Figura 1. Ejemplos de preparaciones histológicas puntuadas con la máxima o la mínima puntuación: (1A) agregados linfocitarios, puntuación 1; (1B) agregados linfocitarios, puntuación 3; (2A) granulocitos, puntuación 1; (2B) granulocitos, puntuación 3; (3A) mucosa subepitelial, puntuación 1; (3B) mucosa subepitelial, puntuación 3.

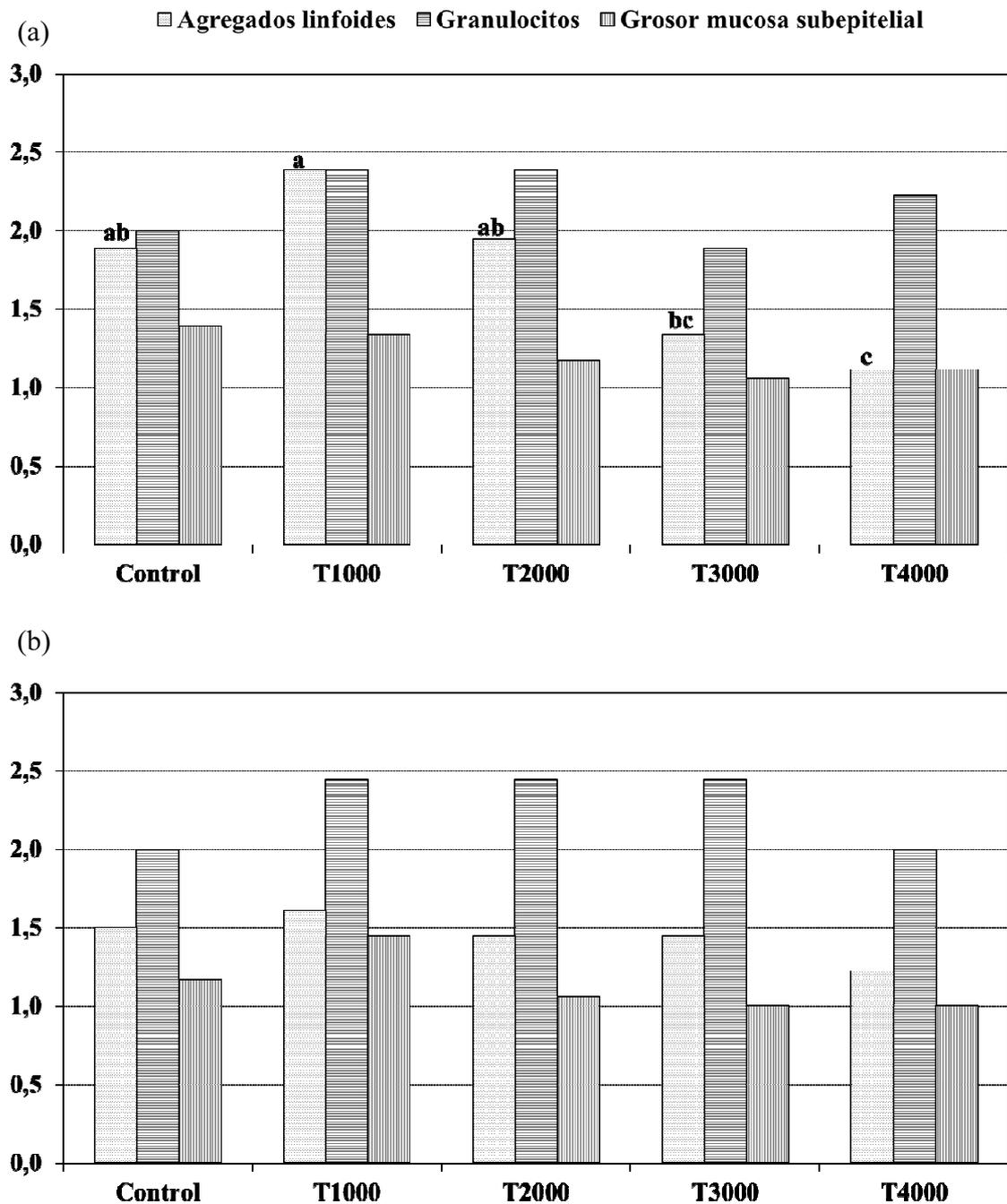


Figura 2. Parámetros histológicos en el intestino anterior (a) y en el intestino posterior (b) de dorada alimentada con las distintas dosis experimentales (uds. relativas).

ANEXO III

Comunicaciones a congresos

Influencia de la inclusión de aceites vegetales en la dieta sobre el rendimiento en el engorde de la dorada (*Sparus aurata*)

A. Hernández^{a*}, B. García-García^a, R. Fontanillas^b, M.D. Hernández^a

^aIMIDA-Acuicultura. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Apdo. 65. 30740. San Pedro del Pinatar. Murcia. Spain. *e-mail: angel.hernandez8@carm.es

^bSkretting Aquaculture Research Center, ARC, Stavanger, Norway.

Abstract

The aim of this work is to describe the effect of partial replacement of fish oil on growth and intake of gilthead seabream (*Sparus aurata*). For this purpose, 464 fishes were placed in 12 tanks in recirculated circuit. Two diets were used, one only with fish oil and another with 75% replacement of soybean oil and rapeseed oil, and each group were feed with a different program during 27 weeks. Multiple regression analysis was used to evaluate the effect of diet and other variables like body weight and temperature on growth and intake. Both models obtained were significant ($p < 0.01$) and also all the coefficients ($p < 0.01$). The main variation of dependent variables (SGR and DIR) were due to body weight, the effect of diet was lower but significant and there were interaction between body weight and diet. In view of these results, we can conclude that the effect of partial replacement of fish oil on growth and intake depends on the weight of the fish, and it is greater in animals weighing less than 200 g.

Justificación

En dietas comerciales para peces, se sustituye parte del aceite de pescado por aceites de origen vegetal. Si los requerimientos de ácidos grasos esenciales están cubiertos, se puede sustituir hasta un 60-75% del aceite de pescado por otras fuentes sin afectar significativamente al crecimiento, la ingesta o la eficacia alimentaria (Turchini, Torstensen y Ng, 2009). En estudios anteriores (Izquierdo et al, 2003; Wassef, Wahby y Sakr, 2007), se observaron pocas diferencias en crecimiento, sin embargo, el grupo control (dieta con aceite de pescado) alcanzó mayor peso, lo que sugiere que el diseño experimental o el tratamiento estadístico de los datos tienen una potencia limitada y se podrían producir errores tipo II (Turchini, Torstensen y Ng, 2009), asumiendo que no hay diferencias cuando en realidad existen. Además, el conocimiento existente de como afectan las dietas con sustitución parcial durante del ciclo de engorde y en distintos períodos, es escaso.

Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar como afecta la sustitución parcial de aceite de pescado por aceites vegetales al crecimiento y a la ingesta durante el ciclo de engorde de la dorada, y desarrollar ecuaciones que expliquen las posibles variaciones.

Material y Métodos

Se utilizaron 464 doradas con un peso medio de $63,4 \pm 11,5$ g, a las que se les implantó un microchip intramuscular. Se distribuyeron en 12 tanques circulares de 850l que operan dentro de un circuito cerrado de agua de mar. Se formularon dos dietas, isoproteicas e isocalóricas, una de ellas (D1) con aceite de pescado (20%) y la otra (D2) con sustitución de parte de este aceite por una mezcla de aceite de colza y soja (6% de cada tipo). Con estas dietas se establecieron 12 programas de alimentación distintos, consistentes en: un programa siempre con D1, otro programa siempre con D2, 5 programas que comenzaron con D1 y cambiaron paulatinamente cada 50g de aumento de peso a D2 y otros 5 programas que comenzaron con D2 y cambiaron de la misma manera a D1. En todos los casos la alimentación fue manual y a saciedad. El experimento tuvo una duración de 27 semanas (de Mayo a Noviembre) y, aproximadamente cada mes, fueron pesados individualmente todos los ejemplares.

Los datos fueron tratados con el análisis de regresión múltiple. Las variables dependientes fueron, la tasa de crecimiento específico (SGR) y la tasa de ingesta relativa (DIR). Las variables independientes fueron el peso corporal (P); la temperatura del agua (T); y la dieta que se les suministraba en cada periodo como variable cualitativa (D, se asigna el valor de 1 a la dieta D1 y 2 a la D2), y se evaluó también la posible interacción entre P y D. Los datos se ajustaron a la ecuación (1), donde Y es SGR o DIR y a, b, c, d y e son los coeficientes de la regresión.

$$\ln Y = \ln a + bD + cT + d \ln P + eD \ln P \quad (1)$$

Se utilizó el ANOVA para evaluar la significación del modelo y el test de Student para la significación de los coeficientes. También se calculó el coeficiente de correlación ajustado y el error de la estimación.

Resultados y Discusión

Las dos ecuaciones obtenidas fueron significativas ($p < 0,01$), así como todos los coeficientes de la regresión. El ajuste de los datos a las ecuaciones fue de 70,55% para el SGR y de 91,63% para la DIR. En las Figuras 1 y 2 se muestra la simulación de las dos ecuaciones para una temperatura de 24 °C.

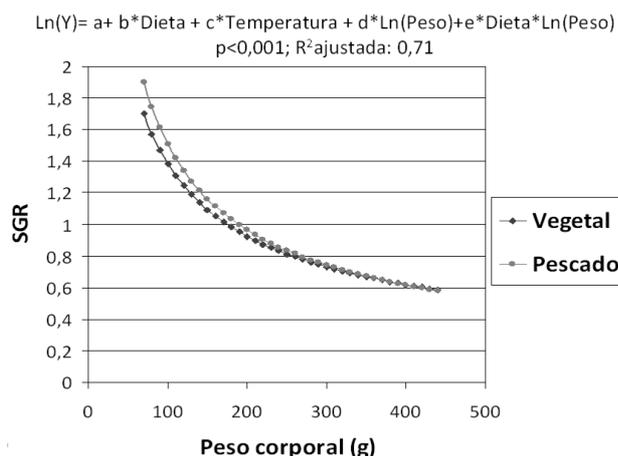


Figura 1. SGR para dietas Vegetal y Pescado

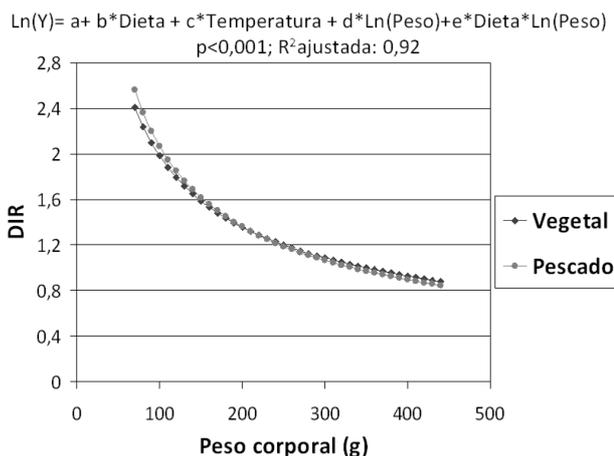


Figura 2. DIR para dietas Vegetal y Pescado

Como se puede observar, la principal variación de las variables dependientes es debida al peso corporal. El efecto de la dieta, aunque es pequeño, es significativo ($p < 0,05$) y también el de la interacción entre P y D, y ello supone que éste disminuye según aumenta el peso corporal. Este efecto es más patente para SGR que para DIR, donde es prácticamente despreciable. Así pues, el efecto de la sustitución parcial de aceite de pescado por aceites vegetales, en las condiciones del presente experimento, afecta principalmente al crecimiento en ejemplares de pesos corporales comprendidos entre 60 y 200g, obteniendo la mayor tasa de crecimiento para los ejemplares alimentados con aceite de pescado, aunque las diferencias son pequeñas. Estudios como éste son necesarios para determinar como afecta el nivel de sustitución en distintas etapas de crecimiento, pudiendo así diseñar una alimentación eficiente, sostenible y económica a lo largo de todo el engorde.

Bibliografía

- Turchini, G.M., Torstensen, B.E. y Ng, W.K. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*. 1: 10-57.
- Izquierdo, M.S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L., Roselund, G. 2003. Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquaculture Nutrition* 9: 397-407
- Wassef E.A., Wahby O.M., Sakr E.M. 2007. Effect of dietary vegetable oils on health and liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*) growers. *Aquaculture research* 38: 852-861

Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen a la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) la financiación de este estudio mediante el proyecto "Caracterización de la calidad del pescado de crianza" (2008-2011).

Antioxidantes provenientes de plantas aromáticas en pienso para peces marinos, efecto sobre la oxidación lipídica.

A. Hernández ^{a*}, B. García-García ^a, M.J. Jordán ^b, C. Martínez-Conesa ^b, M.D. Hernández ^a

^a IMIDA - Acuicultura. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Apdo. 65. 30740. San Pedro del Pinatar. Murcia. Spain. *e-mail: angel.hernandez8@carm.es

^b IMIDA - Recursos Naturales y Desarrollo Rural, C/Mayor s/n, 30150, La Alberca, Murcia, Spain.

Abstract

Five different fish feed were manufactured: control (basal diet); BHT (basal diet with 200mg/Kg of butylated hydroxitoluene); rosemary (basal diet with 600mg/Kg of rosemary extract – *Rosmarinus officinalis*); carvacrol (basal diet with 500mg/Kg of essential oil of *Thymbra capitata*, carvacrol chemotype); and thymol (basal diet with 500mg/Kg of essential oil of *Thymus zygis*, subspecies *gracilis*, thymol chemotype). The experiment was carried out by storing the feed in hermetic bags, protected of light, at temperatures of 4°C and 25°C. Samples were extracted after 4, 8, 12 and 24 weeks. Ferrous-induced TBARS was measured at each sample point and at four incubation times: 0, 50, 100 and 150 minutes. Factorial ANOVA were performed with treatment (antioxidant compound) and weeks of storage as factors. The highest values of TBARS were observed for control and the lowest values were observed for BHT, thimol and rosemary. Therefore, thimol and rosemary protect from oxidation at a similar level than BHT and can be good candidates for substitution of synthetic antioxidants.

Justificación

El alimento para peces, debido a su formulación con harina y aceite de pescado, tiene un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de cadena larga, hecho que lo hace especialmente susceptible a la oxidación. Con el objetivo de proteger las grasas, los piensos comerciales incluyen antioxidantes sintéticos, principalmente BHT (en aceite de pescado) y etoxiquina (en harina de pescado). Debido a que estos antioxidantes pasan al filete en gran medida, hasta niveles levemente inferiores a los permitidos (Bohne, Lundebye y Hamre, 2008), se hace recomendable la sustitución de estos compuestos por otros de origen natural, de mayor aceptación. En este sentido, se ha estudiado el efecto de algunos antioxidantes naturales como el extracto de romero, el ácido cítrico o diferentes tocoferoles, en la conservación del pienso para peces con resultados prometedores (Hamre, Kolas y Sandnes, 2010). Por todo ello, el objetivo de este trabajo es estudiar el efecto antioxidante de sustancias naturales provenientes de plantas aromáticas sobre la oxidación lipídica en el pienso para peces marinos.

Material y Métodos

Se prepararon cinco piensos diferentes: **control**, dieta basal sin antioxidantes añadidos; **BHT**, con 200mg/Kg de butil-hidroxitolueno; **romero**, con 600mg/Kg de extracto de romero – *Rosmarinus officinalis*; **carvacrol** con 500mg/Kg de aceite esencial de tomillo (*Thymbra capitata*, quimiotipo carvacrol); y **timol** con 500mg/Kg de aceite esencial de tomillo (*Thymus zygis*, subespecie *gracilis*, quimiotipo timol). Estas dietas, con un 20% de lípidos y un 45% de proteínas estaban compuestas de harina de pescado, gluten de trigo, harina de trigo, aceite de pescado y un complejo vitamínico-mineral. La fabricación del pienso se llevó a cabo con una extrusora semi-industrial (E 19/25 D BRABENDER). Los compuestos antioxidantes se mezclaron con el aceite de pescado y éste a su vez con el resto de ingredientes. El experimento de almacén se llevó a cabo en bolsas herméticas, protegidas de la luz, a las temperaturas de 4°C y 25°C. Se tomaron muestras a las 4, 8, 12 y 24 semanas y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Para la determinación del grado de oxidación de los lípidos se realizó el test de las Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) inducido, a partir de una modificación del método descrito por Konburst y Mavis (1980). La técnica consiste en la oxidación de la muestra con sulfato ferroso a 37°C, y la medida de las TBARS a 0, 50, 100 y 150 minutos del inicio de la incubación. Los valores se expresaron en ng de malondialdehído (MDA) por mg de pienso. Los datos se trataron con el Análisis de la Varianza (ANOVA) factorial estudiando como factores el tratamiento (sustancia antioxidante) y el tiempo de almacén, además de la interacción entre ellos.

Resultados y Discusión

Se observan diferencias significativas entre tratamientos y entre los tiempos de almacén, aunque no en todos los tiempos de incubación (Tabla 1).

Tabla 1. Significación de los factores incluidos en el ANOVA factorial para los TBARS inducidos a 4°C y 25°C medidos en los distintos tiempos de incubación.

Tiempo de incubación	Temperatura	Tratamiento	Semanas de almacén	Tratamiento*semanas de almacén
0 minutos	4°C	0,017*	0,006**	0,470
	25°C	0,274	<0,001***	0,117
50 minutos	4°C	<0,001***	<0,001***	<0,001***
	25°C	<0,001***	<0,001***	0,145
100 minutos	4°C	<0,001***	0,001***	0,011*
	25°C	0,002**	<0,001**	0,088
150 minutos	4°C	0,671	0,003**	0,915
	25°C	0,437	0,030*	0,937

***: p<0,001; **: p<0,01; *: p<0,05

Para el pienso control, se observan los mayores valores de TBARS a 4°C, mientras que para BHT se observan los valores más bajos para ambas temperaturas. Sin embargo, los valores para BHT no son significativamente diferentes de timol, romero y carvacrol a 4°C, o de romero y control a 25°C. La mayor actividad del romero frente a otros antioxidantes naturales concuerda con los resultados de Hamre, Kolas y Sandnes (2010). Wang et al. (2011) observaron en el ácido carnósico, el componente fenólico mayoritario del romero, un comportamiento similar respecto a antioxidantes sintéticos a distintas temperaturas (4°C y 30°C). Nuestros resultados son similares para el romero pero no para otros compuestos como el timol, que sí varía su actividad con la temperatura. A partir de estos resultados, podemos concluir que el extracto de romero y el aceite esencial de tomillo (quimiotipo timol) pueden ser buenos candidatos para sustituir al BHT en pienso para peces.

Bibliografía

- Bohne, V. J. B., Lundebye, A.-K., & Hamre, K. 2008. Accumulation and depuration of the synthetic antioxidant ethoxyquin in the muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food and Chemical Toxicology*. 46: 1834-1843.
- Hamre, K., Kolas K., & Sandnes K. 2010. Protection of fish feed, made directly from marine raw materials, with natural antioxidants. *Food Chemistry*. 119: 270-278.
- Konburst, D.J. y Mavis R.D. 1980. Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testes to lipid peroxidation: correction with vitamin E content. *Lipids* 15: 315-322
- Wang, H., Liu, F., Yang, L., Zu, Y., Wanga, H., Qub, S., Zhang, Y. 2011. Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. *Food Chemistry* 128: 93-99

Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) la financiación de este estudio mediante el proyecto “Mejora en la calidad y vida útil de la dorada (*Sparus aurata*) mediante la inclusión en la dieta de conservantes procedentes de plantas aromático-medicinales” (RTA2009-00145-00-00).

Efecto de la sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales en la dieta de la dorada (*Sparus aurata*) sobre marcadores del estrés oxidativo.

V. Cánovas-Hernández¹, A. Lucas-Sánchez¹, PF. Almada-Pagán¹, R. Fontanillas², A. Hernández³, MD. Hernández³, J. de Costa^{1*}, P. Mendiola¹

¹Departamento de Fisiología Animal, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, Spain

*e-mail: jocoru@um.es

²Skretting Aquaculture Research Center, ARC, Stavanger, Norway

³IMIDA - Acuicultura. Carretera del puerto s/n, Apdo. 65, 30740, San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of partial fish oil replacement by vegetable oil in the diet on indicators of oxidative stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Juvenile fish (63g) were fed for six months with a diet containing fish oil (FO) or 70% replacement with soybean and rapeseed oils (VO). Fish were sampled at 3, 4, 5 and 6 months obtaining liver white and red muscles in which lipidic peroxidation (MDA), protein oxidation and superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase activities were determined. High values of lipid peroxidation were observed in red muscle from the FO group, and there were no significant differences in other tissues for any of the measured parameters. Data from the present study suggest that the presence of VO oils in diets can protect fish tissues, especially red muscle, against oxidative damage.

Justificación

Los aceites de pescado (FO) han sido tradicionalmente utilizados como fuente mayoritaria de lípidos en los piensos para peces de cultivo, como la dorada, debido fundamentalmente a su alta digestibilidad y elevado contenido en ácidos grasos esenciales, particularmente los ácidos grasos n-3 de cadena larga y altamente insaturados (LC-PUFAs). La creciente demanda de FO por parte de las empresas acuícolas junto con el descenso progresivo en la pesca extractiva, han llevado a la inclusión de aceites vegetales (VO) en las dietas de peces, dada su elevada disponibilidad y su bajo coste. Estos aceites son ricos en ácido linoleico (LA; 18:2 n-6), ácido α -linolénico (LNA; 18:3 n-3) y ácido oleico (OA; 18:1 n-9) pero carecen de LC-PUFAs, como el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3), los cuales constituyen elementos esenciales para las especies marinas, dada su baja capacidad de elongación y desaturación de los ácidos grasos de 18C para sintetizar LC-PUFAs.

Por otro lado, todos los animales generan especies reactivas de oxígeno (ROS) como resultado normal del metabolismo aerobio. Estos ROS tienen la potencialidad de originar daño en las biomoléculas y de actuar como señales intracelulares que activan los mecanismos de defensa antioxidante y de reparación del daño oxidativo. El desequilibrio entre la producción de ROS y la actividad de los sistemas de defensa y reparación, lleva al estrés oxidativo.

La sustitución de fuentes de nutrientes en las dietas de piscifactoría debe, además de contribuir a la sostenibilidad de la acuicultura, asegurar la producción de un pescado saludable para el consumo humano, originado en un proceso que atienda al bienestar de los animales.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la sustitución parcial del aceite de pescado por aceites vegetales en la dieta, sobre marcadores del estrés oxidativo en diferentes tejidos de la dorada.

Material y Métodos

Se utilizaron 56 ejemplares de doradas (*Sparus aurata*) de 62,8±11,8 g de peso inicial mantenidos en las instalaciones del IMIDA de San Pedro del Pinatar (Murcia). Los peces fueron distribuidos en dos grupos y alimentados dos veces al día *ad libitum*, cada uno con una de las dos dietas experimentales. Ambas dietas fueron diseñadas por Skretting ARC para que fueran isoenergéticas e isoproteicas. La dieta FO contenía aceite de pescado como única fuente de lípido mientras que en la dieta VO se sustituyó un 70% del aceite de pescado por una mezcla 1:1 de aceite de soja y colza.

Se realizaron muestreos a los 3, 4, 5 y 6 meses de alimentación con dichas dietas. Los peces fueron sacrificados mediante inmersión en agua helada. Se tomaron muestras de tres tejidos: hígado, músculo blanco y músculo rojo que se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C. Como índices de daño oxidativo en los tejidos analizados se utilizaron la valoración de malondialdehído (MDA), como indicador de peroxidación lipídica, y de los grupos carbonilo, para la evaluación del daño oxidativo a proteínas. Como índices de los sistemas de defensa antioxidante y reparación, se determinaron las actividades enzimáticas: catalasa (CAT), glutathione reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD). El

análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney ($p < 0,05$) utilizando el programa SPSS (versión 15.0 para Windows).

Resultados y Discusión

Los animales tuvieron un crecimiento y conversión del alimento normal. No se observaron diferencias significativas en los valores de MDA y grupos carbonilo de hígado entre los dos grupos experimentales. Lo mismo se puede decir de músculo blanco en el que las diferencias encontradas en un principio no se mantuvieron durante el resto del experimento. El músculo rojo, en cambio, caracterizado por un mayor depósito de lípidos, mostró valores superiores de peroxidación lipídica en las doradas alimentadas con la dieta FO en los dos últimos puntos de muestreo. El nivel de oxidación de proteínas tampoco se vio afectado en este tejido por el tipo de alimentación ni por el tiempo de muestreo.

Tabla 1. Peroxidación lipídica (MDA) y daño a proteínas (grupos carbonilo) en tejidos de doradas alimentadas con dieta con aceite de pescado (FO) o aceites vegetales (VO) durante 3, 4, 5 o 6 meses.

Periodo de alimentación	Dieta	MDA (nmoles/g tejido)			Grupos carbonilo (nmoles/mg prot)		
		Hígado	Músculo Blanco	Músculo rojo	Hígado	Músculo Blanco	Músculo rojo
3 meses	FO	17,8±3,4	22,2±3,9	42,9±8,8	9,0±1,2	11,1±5,5	13,6±2,0
3 meses	VO	15,9±0,7	33,9±3,7*	49,8±9,8	8,9±0,8	12,5±6,3	16,3±4,3
4 meses	FO	19,4±2,0	25,6±4,8	59,8±17,6	14,3±2,3	13,3±6,6	-
4 meses	VO	19,0±2,4	16,8±2,6	64,2±10,6	8,7±1,5	11,3±5,6	-
5 meses	FO	15,8±1,1	30,6±2,6	153,0±22,0*	9,7±1,0	9,2±4,6	-
5 meses	VO	13,1±1,0	13,9±1,4	61,3±9,7	10,7±1,7	9,5±4,7	-
6 meses	FO	23,3±4,0	21,7±1,0	137,2±13,1*	7,2±1,5	9,5±4,8	13,1±2,4
6 meses	VO	16,1±3,6	18,8±2,8	57,9±11,9	8,8±1,0	10,7±6,2	16,0±3,7

Valores expresados como media \pm EEM ($n=5$). Los asteriscos refieren la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$)

No se observaron cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes analizadas. Algunas plantas contienen componentes fenólicos con potentes actividades antioxidantes. Estos componentes podrían estar en las dietas suministradas a las doradas durante el presente experimento, a través fundamentalmente del concentrado de soja utilizado, y podrían contribuir a que no se haya inducido un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes.

Tabla 2. Actividad específica de las enzimas: Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa y Glutathion Reductasa (GR) de hígado, músculo rojo y músculo blanco de doradas alimentadas durante 6 meses con la dieta de aceite de pescado (FO) o de aceites vegetales (VO).

Tejido	Dieta	SOD (U.mg proteína ⁻¹)	Catalasa (U.mg proteína ⁻¹)	GR (mU. mg proteína ⁻¹)
Hígado	FO	5,95 \pm 0,31	0,80 \pm 0,25	11,57 \pm 0,85
	VO	5,96 \pm 0,96	1,89 \pm 0,59	14,38 \pm 1,1
Músculo rojo	FO	11,99 \pm 3,48	1,05 \pm 0,25	3,44 \pm 0,27
	VO	7,12 \pm 0,80	0,88 \pm 0,30	3,74 \pm 0,23
Músculo blanco	FO	5,19 \pm 0,25	0,14 \pm 0,02	2,36 \pm 0,38
	VO	5,75 \pm 0,55	0,10 \pm 0,03	2,72 \pm 0,44

Valores expresados como media \pm EEM ($n=5$).

Se puede concluir que la inclusión de aceites vegetales en la dieta muestra un efecto protector frente a la peroxidación lipídica.

Bibliografía

Saera-Vila, A., Benedito-Palos, L., Sitjà-Bobadilla, A., Nacher-Mestre, J., Serrano, R., Kaushik, S.J. y Pérez-Sánchez, J. 2009. Assessment of the health and antioxidant trade-off in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed alternative diets with low levels of contaminants. *Aquaculture*. **296(1-2)**:87-95.

Turchini, G.M., Torstensen, B.E. y Ng, W.K. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquacult.* **1(1)**:10-57.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los Proyectos: "Caracterización de la calidad del pescado de crianza" (2008-2011) de la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) y 12005PI/09 de la Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

Aceite esencial de tomillo como inmuno-estimulante en dorada (*Sparus aurata*): Histología intestinal.

A. Hernández¹, B. García García¹, M.J. Caballero², S. Torrecillas², M.D. Hernández¹

¹ IMIDA - Acuicultura. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Av. de las salinas s/n, 30740. San Pedro del Pinatar. Murcia. e-mail: angel.hernandez8@carm.es

² Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Transmontaña s/n. 35413. Arucas. Gran Canaria.

Summary

Gilthead seabream weighing 55.1 ± 8.7 g were distributed in 15 tanks and fed five experimental diets: a control diet (basal diet) and four diets (T1000, T2000, T3000 and T4000) with 1000, 2000, 3000 and 4000 mg kg⁻¹, respectively, of thyme essential oil (*Thymus zygis* subsp. *gracilis*). After 12 weeks of feeding, intestines of 18 fish from each experimental group were dissected. Three segments were obtained from the proximal intestine and 4 segments from the distal intestine for preparing histological sections. Lymphocyte aggregates, granulocytes, and thickening of the lamina propria were evaluated according to an established scoring system. In order to analyze statistical differences we used the chi-square test. The administered essential oil doses had an effect on the various parameters analyzed and intestine regions. The most prominent differences were in the amount of the lymphocyte aggregates, which increased with T1000 and descended at higher doses. Granulocytes amount was superior to the control at medium doses and thickening of the lamina propria showed minor differences. According to the results, we may suggest an immunostimulatory effect at low doses (1000 mg kg⁻¹) and inhibition at high doses (3000 to 4000 mg kg⁻¹).

Resumen

Se distribuyeron doradas de peso inicial $55,1 \pm 8,7$ g en 15 tanques y se alimentaron con 5 dietas experimentales: una dieta control (dieta basal) y cuatro dietas (T1000, T2000, T3000 y T4000) con 1000, 2000, 3000 y 4000 mg kg⁻¹, respectivamente, de aceite esencial de tomillo (*Thymus zygis* subsp. *gracilis*). Tras 12 semanas de alimentación se diseccionaron intestinos de 18 peces en cada grupo experimental. Se obtuvieron 3 segmentos del intestino anterior y 4 segmentos del intestino posterior para preparar cortes histológicos. La cantidad de agregados linfocitarios y granulocitos, y el engrosamiento de la lámina propia fueron evaluados de acuerdo a un sistema de puntuación establecido. Para analizar las diferencias estadísticas se usó el test de la chi-cuadrado. Las dosis de aceite esencial utilizadas tuvieron un efecto sobre los distintos parámetros analizados y las distintas zonas del intestino. La cantidad de agregados linfocitarios, aumentó con T1000 y descendió con dosis altas. La cantidad de granulocitos fue superior al control con dosis medias y el engrosamiento de la lámina propia mostró diferencias poco importantes. Según los resultados obtenidos, se puede sugerir un efecto inmunoestimulante a dosis bajas (1000 mg kg⁻¹) e inhibición a dosis altas (3000 y 4000 mg kg⁻¹).

Justificación

Entre los productos vegetales con utilidad antimicrobiana, el aceite esencial de tomillo muestra una de las mayores efectividades. Los principales compuestos activos de este aceite son los monoterpenos timol y carvacrol, que presentan una acción sinérgica. Estos dos compuestos fenólicos son lipofílicos y afectan a la membrana bacteriana de gram-negativas, aumentando su permeabilidad y destruyendo la célula. Su probada actividad bactericida contra bacterias patógenas comunes hace que se considere beneficioso para el tracto digestivo tanto de humanos y como de animales. Se ha comprobado en animales de granja que su adición al pienso aumenta la ganancia de peso sin afectar a la calidad de la carne. La modificación de la microbiota intestinal por la inclusión de aceite esencial de tomillo se ha estudiado en peces (Navarrete et al., 2010) aunque el efecto en el intestino y su tejido linfoide asociado no se ha tratado. El objetivo de nuestro trabajo es estudiar, a través de la histología del digestivo, el efecto de la incorporación de aceite esencial de tomillo en el estado inmunitario la dorada a nivel del intestino y su tejido linfoide asociado.

Material y Métodos

225 peces con un peso inicial de $55,1 \pm 8,7$ g fueron distribuidos en 15 tanques, con recirculación de agua de mar. Los peces fueron alimentados con cinco dietas experimentales (por triplicado): una dieta control (dieta basal) y cuatro dietas (T1000, T2000, T3000 y T4000) con 1000, 2000, 3000 y 4000 mg kg⁻¹, respectivamente, de aceite esencial de tomillo (*Thymus zygis* subsp. *gracilis*). El experimento se llevó a

cabo a lo largo de 12 semanas, hasta que los peces triplicaron su peso. Se diseccionaron los intestinos de 18 peces de cada grupo experimental. Tras su fijación en formol, se obtuvieron 3 segmentos del intestino anterior y 4 segmentos del posterior. Se prepararon cortes histológicos a 4µm teñidos con hematoxilina-eosina. La cantidad de agregados linfocitarios, granulocitos y el engrosamiento de la lámina propia fueron examinados por dos evaluadores, de forma individual e ignorando la identidad de la muestra. Se estableció previamente un sistema histológico de puntuación (Torrecillas et al., 2011): 0, no se observa; 1, bajo; 2, moderado; 3, alto. La relación estadística entre los distintas dosis con aceite esencial de tomillo y la dieta control, se analizó mediante tabulación cruzada y el test de chi cuadrado.

Resultados y Discusión

Los resultados mostraron diferencias significativas entre dosis y según la zona del intestino. La cantidad de agregados linfocitarios en el intestino anterior mostró un aumento significativo con la dosis T1000 para descender con el resto, siendo T3000 y T4000 menores al control. En el intestino posterior se observó un efecto similar pero menos acusado. Este efecto podría estar relacionado con la naturaleza lipofílica de los compuestos activos del aceite esencial de tomillo, que haría que fueran absorbidos en su mayoría en el intestino anterior, junto con las grasas. En cuanto a la cantidad de granulocitos, hubo diferencias significativas en el intestino posterior, siendo la cantidad de las dosis medias (T1000, T2000 y T3000) superiores al resto. El engrosamiento de la lámina propia no mostró diferencias importantes. Según los datos obtenidos, se puede sugerir un efecto inmunoestimulante a dosis bajas (1000 mg kg⁻¹) e inhibición a dosis altas (3000 y 4000 mg kg⁻¹) de aceite esencial de tomillo.

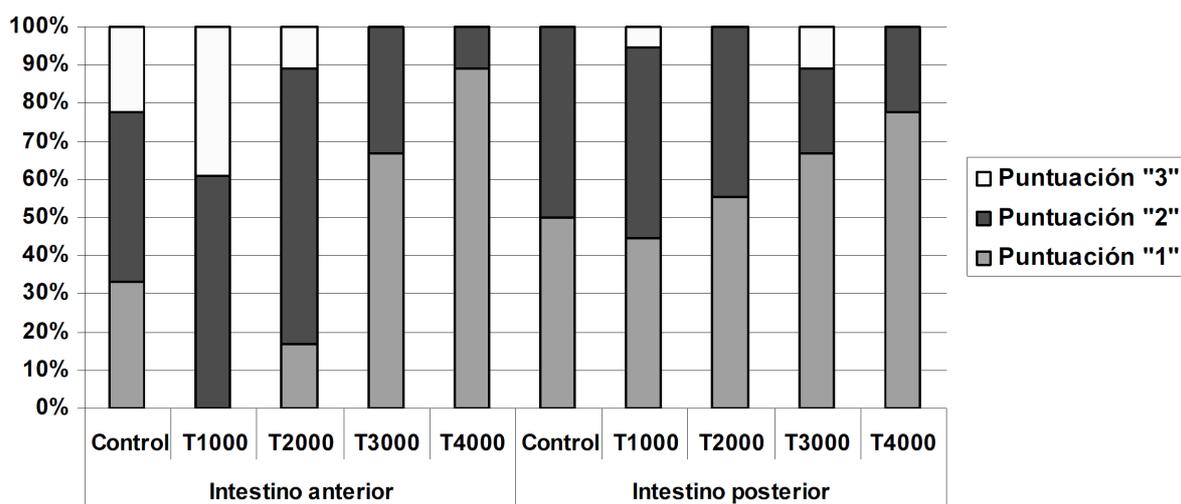


Figura 1. Porcentaje de individuos con cada puntuación histológica para "agregados linfocitarios".

Bibliografía

Navarrete P., I. Toledo, P. Mardones, R. Opazo, R. Espejo y J. Romero. 2010. Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. *Aquaculture Research*. 41: 667-678.

Torrecillas S., A. Makol, T. Benítez-Santana, M.J. Caballero, D. Montero, J. Sweetman, y M.S. Izquierdo. 2011. Reduced gut bacterial translocation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Fish & Shellfish Immunology*. 30: 674-681.

Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) la financiación de este estudio mediante el proyecto "Mejora en la calidad y vida útil de la dorada (*Sparus aurata*) mediante la inclusión en la dieta de conservantes procedentes de plantas aromático-medicinales" (RTA2009-00145) y la beca FPI-INIA asociada al mismo.

Mejora de la conservación de la dorada (*Sparus aurata*) almacenada en hielo. Influencia de la dosis de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) incorporada al pienso

A. Hernández¹, B. García García¹, M.J. Jordán², M.D. Hernández¹

¹ IMIDA - Acuicultura. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Av. de las salinas s/n, 30740. San Pedro del Pinatar. Murcia. e-mail: angel.hernandez8@carm.es

² IMIDA - Recursos Naturales y Desarrollo Rural. C/Mayor s/n, 30150, La Alberca, Murcia.

Summary

240 gilthead seabream (*Sparus aurata*) were distributed in 15 tanks and were fed five experimental diets: a control diet (basal diet) and four diets (R600, R1200, R1800 and R2400) with 600, 1200, 1800 and 2400 mg kg⁻¹, respectively, of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*). The experiment was conducted over 84 days, until the fish reached marketable size (356 ± 37.3 g). At the end of the experiment 16 fish from each experimental group were slaughtered, covered with flake ice and stored in refrigeration at 4±1 °C for 0, 7, 14 and 21 days. At each sampling point physicochemical, microbiological and sensorial analysis were performed. Almost all physicochemical parameters showed the best value (fresher fish) with R600 and some with R2400 diet. Some important bacterial types showed a tendency to decrease with R600 diet and then increased again at high doses. Quality Index had worse values for the control diet than for the rest. Only on day 0 the effect was dose-dependent and, moreover, diets with rosemary extract lengthened self-life in one day, regardless of dose. Results of analyses and self-life calculations suggest that, starting from 600 mg kg⁻¹, the beneficial effect rosemary extract incorporation on the quality of ice stored gilthead sea bream partially disappear.

Resumen

240 doradas (*Sparus aurata*) se distribuyeron en 15 tanques y fueron alimentadas con 5 dietas experimentales: Una dieta control (dieta basal) y cuatro dietas (R600, R1200, R1800 y R2400) a las que se añadió 600, 1200, 1800 y 2400 mg kg⁻¹, respectivamente, de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*). El experimento se llevó a cabo en 84 días, hasta que los peces alcanzaron la talla comercial (356±37,3 g). Se sacrificaron 16 peces de cada grupo experimental, se cubrieron con hielo en escamas y se almacenaron en refrigeración a 4±1 °C durante 0, 7, 14 y 21 días. En cada punto de muestreo se llevaron a cabo análisis fisicoquímicos, microbiológicos y de calidad sensorial. Casi todos los parámetros fisicoquímicos mostraron el mejor valor (mayor frescura) con la dieta R600 y algunos con la dieta R2400. Algunos tipos bacterianos importantes tendieron a descender con la dieta R600 para después volver a aumentar con dosis altas. El Índice de Calidad tuvo valores peores para la dieta control que para el resto. Solamente en el día 0 el efecto fue dosis-dependiente, además, las cuatro dietas con extracto de romero alargaron la vida útil en 1 día, independientemente de la dosis. Los resultados de los análisis y del cálculo de la vida útil sugieren que, por encima de 600 mg kg⁻¹, se pierde parte del efecto beneficioso de la incorporación de extracto de romero en la calidad de la dorada almacenada en hielo.

Justificación

Actualmente los antioxidantes naturales están en el punto de mira de la comunidad científica, ya que pueden ser buenos sustitutos de los antioxidantes sintéticos con el objetivo mejorar la seguridad alimentaria. De las labiadas, el romero ha sido la planta más estudiada y la primera en ser comercializada en extracto. Los efectos del romero en la conservación del pescado se han estudiado mediante su aplicación exógena, pero hay pocos trabajos sobre la administración dietética en peces y su efecto sobre la conservación (Sant'ana y Mancini-Filho, 2000; Álvarez *et al.*, 2012). El objetivo de nuestro estudio fue determinar el efecto de la dosis de extracto de romero en la dieta, sobre la calidad de la dorada durante su almacén en hielo.

Material y Métodos

240 peces con un peso medio inicial de 214±20 g fueron distribuidos en 15 tanques, con recirculación de agua de mar. Los peces fueron alimentados con cinco dietas experimentales (por triplicado): una dieta control (dieta basal) y cuatro dietas (R600, R1200, R1800 y R2400) con 600, 1200, 1800 y 2400 mg kg⁻¹, respectivamente, de extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*; 30% de pureza en contenido de diterpenos, Nutrafur-Furfural S.A.). El experimento se llevó a cabo a lo largo de 84 días, hasta que los peces alcanzaron talla comercial (356±37 g). Al final del experimento se sacrificaron 16 peces de cada

grupo experimental, se acomodaron en cajas de poliestireno, cubiertos con hielo en escamas (1:1; hielo:peces) y se almacenaron en refrigeración a 4 ± 1 °C durante 0, 7, 14 y 21 días. En cada punto de muestreo se llevaron a cabo análisis fisicoquímicos: color (Sistema CIELab), Capacidad de Retención de Agua (WHC), Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), Bases Volátiles Nitrogenadas Totales (TVBN) y Nitrógeno de Trimetilamina (TMA). También se hicieron recuentos microbiológicos y un análisis sensorial de frescura por el Método del Índice de Calidad (QIM).

Resultados y Discusión

Los datos de color muestran diferencias significativas entre dietas el día 21, siendo la dieta R1200 la que tiene mayor luminosidad y menor saturación del color. El componente amarillo aumenta durante el almacén con las dietas Control y R2400, pudiendo deberse a mayor protección lipídica con las dosis medias. WHC disminuyó significativamente con el tiempo en todos los grupos experimentales excepto el alimentado con la dieta R600. Los valores de TBARS fueron menores en los peces alimentados con dietas con extracto de romero durante los primeros días de almacén. Los días 14 y 21 aparece cierta tendencia a aumentar el valor con la dosis, lo que podría estar relacionado con un efecto prooxidante del extracto de romero a dosis altas. El día 21 de almacén se observaron diferencias significativas entre dietas en los valores de TVBN, siendo los menores con R600 y R2400. La cantidad de TMA en el filete aumentó con el tiempo de almacén para todas las dosis, aunque no se observaron diferencias entre estas. La dieta R1200 presentó el mayor valor al final del experimento y la dieta R600 el menor. Aerobios psicrófilos y *Pseudomonas* mostraron cierta tendencia a descender con la dieta R600 para después volver a aumentar con dosis altas. Esto concuerda con WHC, TVBN y TMA. El Índice de Calidad varió con el tiempo de almacén para todos los grupos y también existieron diferencias entre dosis durante todo el periodo. En todos los puntos de muestreo la dieta control presentó valores mayores al resto, aunque sólo en el día 0 el efecto fue dosis-dependiente. Las regresiones lineales para calcular la vida útil se compararon por el Test de Chow, siendo todas diferentes del control (Tabla 1). Las dietas con extracto de romero aumentaron la vida útil en un día independientemente de la dosis. Todo esto sugiere que a partir de 600 mg kg⁻¹ se pierde parte del efecto beneficioso del extracto de romero en la conservación.

Tabla 1. Análisis de regresión utilizados para determinar la vida útil de las doradas con cada dosis.

Dosis	Coficiente <i>a</i>	Coficiente <i>b</i>	R ²	<i>p</i>	Test de Chow
Control	16,4592***	1,4838***	0,8920	<0.001	
R600	14,8546***	1,4698***	0,9326	<0.001	*
R1200	15,2464***	1,4509***	0,9190	<0.001	*
R1800	15,0272***	1,4622***	0,9243	<0.001	*
R2400	14,8208***	1,4493***	0,9280	<0.001	**

$Y=a+bX$. *Y*; Índice de Calidad, *X*; Tiempo de almacén.

***: $p<0.001$; **: $p<0.01$; *: $p<0.05$.

Bibliografía

Álvarez, A., B. García García, M.J. Jordán, C. Martínez-Conesa y M.D. Hernández. 2012. The effect of diets supplemented with thyme essential oils and rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during storage on ice. *Food Chemistry*. 132(3): 1395–1405.

Sant'Ana L.S. y J. Mancini-Filho. 2000. Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillets. *Food Chemistry*. 68: 175-178.

Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) la financiación de este estudio mediante el proyecto “Mejora en la calidad y vida útil de la dorada (*Sparus aurata*) mediante la inclusión en la dieta de conservantes procedentes de plantas aromático-medicinales” (RTA2009-00145) y la beca FPI-INIA asociada al mismo.

ANEXO IV

Autorización de coautores, índices de impacto y cartas de aceptación de las publicaciones presentadas



Instituto Murciano de
Investigación y Desarrollo
Agrario y Alimentario
Equipo de Acuicultura Marina



Región de Murcia
Consejería de Agricultura
y Agua

Los coautores del artículo “.Natural antioxidants in extruded fish feed: Protection at different storage temperatures. Animal Feed Science and Technology. (2014). DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2014.06.003” declaran:

1. Su conformidad con la presentación del presente artículo por parte del doctorando Ángel Hernández Contreras con el propósito de presentar su tesis doctoral como compendio de publicaciones.
2. Su compromiso de no presentar el presente artículo como parte de otra tesis doctoral.
3. Reconocen la relevancia de la contribución del doctorando en la investigación cuyos resultados han sido plasmados en el presente artículo.

Dra. Mª Dolores Hernández Llorente

Dr. Benjamín García García

Dra. Mª José Jordán Bueso



2012 JCR Science Edition

Journal Summary List

subject categories AGRICULTURE, DAIRY & ANIMAL SCIENCE

VIEW CATEGORY SUMMARY LIST

Journal Title Change

Sorted by: Impact Factor

Sort Again

Journals 1 - 20 (of 54)

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Ranking is based on your journal and sort selections.

Page 1 of 3

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data					Eigenfactor [®] Metrics		
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	1	GENET SEL EVOL	0995-193X	1657	3.494	2.964	0.300	40	8.5	0.00335	0.869
<input type="checkbox"/>	2	ANIM GENET	0268-9146	3284	2.584	2.667	0.359	128	6.4	0.00611	0.637
<input type="checkbox"/>	3	J DAIRY SCI	0022-0302	29407	2.566	3.009	0.401	735	9.5	0.03185	0.602
<input type="checkbox"/>	4	DOMEST ANIM ENDOCRIN	0739-7240	1927	2.377	2.322	0.207	58	7.8	0.00310	0.583
<input type="checkbox"/>	5	J ANIM SCI	0021-8812	23776	2.093	2.641	0.402	485	>10.0	0.02205	0.589
<input type="checkbox"/>	6	ANIM REPROD SCI	0378-4320	5803	1.897	1.943	0.156	180	7.3	0.00904	0.422
<input type="checkbox"/>	7	J REPROD DEVELOP	0916-8818	1622	1.755	1.727	0.219	105	5.4	0.00401	0.407
<input type="checkbox"/>	8	J ANIM BREED GENET	0931-2668	1150	1.654	2.011	0.180	50	6.2	0.00260	0.546
<input type="checkbox"/>	9	ANIMAL	1751-7311	1894	1.648	1.761	0.392	227	3.3	0.00885	0.498
<input type="checkbox"/>	10	ANIM FEED SCI TECH	0371-8401	5355	1.608	2.156	0.278	194	8.0	0.04934	0.515
<input type="checkbox"/>	11	POULTRY SCI	0032-5791	13639	1.516	2.066	0.257	409	>10.0	0.01334	0.440
<input type="checkbox"/>	12	APPL ANIM BEHAV SCI	0168-1591	5989	1.497	2.059	0.219	160	9.5	0.00751	0.478
<input type="checkbox"/>	13	REPROD DOMEST ANIM	0936-6768	2880	1.392	1.823	0.198	348	4.4	0.00717	0.400
<input type="checkbox"/>	14	J DAIRY RES	0022-0299	2641	1.373	1.628	0.143	63	>10.0	0.00303	0.493
<input type="checkbox"/>	15	J ANIM PHYSIOL AN N	0931-2439	1202	1.254	1.298	0.133	128	5.7	0.00287	0.344
<input type="checkbox"/>	16	LIVEST SCI	1871-1413	2542	1.249	1.489	0.117	308	3.8	0.00984	0.384
<input type="checkbox"/>	17	WORLD POULTRY SCI J	0043-9339	1320	1.247	1.679	0.093	54	9.3	0.00149	0.401
<input type="checkbox"/>	18	BRIT POULTRY SCI	0007-1668	3285	1.147	1.366	0.034	89	>10.0	0.00309	0.371
<input type="checkbox"/>	19	SMALL RUMINANT RES	0921-4488	4134	1.124	1.547	0.179	246	7.3	0.00603	0.327
<input type="checkbox"/>	20	ARCH ANIM NUTR	1745-039X	629	1.095	1.052	0.222	36	8.1	0.00094	0.278

Journals 1 - 20 (of 54)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Page 1 of 3

Date: 10 Jun 2014
To: "María Dolores Hernández" mdolores.hernandez6@carm.es
From: "ANIFEE" anifee@elsevier.com
Subject: ANIFEE-14-5487R2 accepted for publication
Ms. No. ANIFEE-14-5487R2
Natural antioxidants in extruded fish feed: Protection at different storage temperatures.

Dear Dr. Hernández,

I am pleased to be able to inform you that your manuscript has been accepted as Research Paper for publication in Animal Feed Science and Technology.

The manuscript will be transferred to our Production Department. Proofs will be sent to you in due course.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

With kind regards,

Editorial Office
Animal Feed Science and Technology



Instituto Murciano de
Investigación y Desarrollo
Agrario y Alimentario
Equipo de Acuicultura Marina



Región de Murcia
Consejería de Agricultura
y Agua

Los coautores del artículo “Improved conservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in ice storage. The influence of doses of rosemary extract added to feed. Aquaculture, 426, 31-40 (2014)” declaran:

1. Su conformidad con la presentación del presente artículo por parte del doctorando Ángel Hernández Contreras con el propósito de presentar su tesis doctoral como compendio de publicaciones.
2. Su compromiso de no presentar el presente artículo como parte de otra tesis doctoral.
3. Reconocen la relevancia de la contribución del doctorando en la investigación cuyos resultados han sido plasmados en el presente artículo.

Dra. Mª Dolores Hernández Llorente

Dr. Benjamín García García

Dra. Mª José Jordán Bueso



Instituto Murciano de
Investigación y Desarrollo
Agrario y Alimentario
Equipo de Acuicultura Marina



Región de Murcia
Consejería de Agricultura
y Agua

Los coautores del artículo “.Study of the dose of thyme essential oil in feed to prolong the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture Nutrition (2014). DOI: 10.1111/anu.12196” declaran:

1. Su conformidad con la presentación del presente artículo por parte del doctorando Ángel Hernández Contreras con el propósito de presentar su tesis doctoral como compendio de publicaciones.
2. Su compromiso de no presentar el presente artículo como parte de otra tesis doctoral.
3. Reconocen la relevancia de la contribución del doctorando en la investigación cuyos resultados han sido plasmados en el presente artículo.

Dra. Mª Dolores Hernández Llorente

Dr. Benjamín García García

Dra. Mª José Jordán Bueso

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to Journal Information)	ISSN	JCR Data J					Eigenfactor® Metrics J		
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-Life	Eigenfactor® Score	Article Influence® Score
<input type="checkbox"/>	1	FISH FISH	1467-2960	1846	5.855	7.326	1.538	26	5.5	0.0636	2.824
<input type="checkbox"/>	2	FISH SHELLFISH IMMUN	1050-4648	6783	2.964	3.381	0.444	306	4.9	0.01239	0.590
<input type="checkbox"/>	3	FISHERIES	0363-2415	1397	2.878	3.109	0.485	33	>10.0	0.00248	1.107
<input type="checkbox"/>	4	REV FISH SCI	1064-1262	846	2.417	2.545	0.286	14	7.8	0.00216	0.864
<input type="checkbox"/>	5	CAN J FISH AQUAT SCI	0706-652X	16082	2.323	2.655	0.371	167	>10.0	0.01480	0.949
<input type="checkbox"/>	6	REV AQUACULT	1753-5123	179	2.320	4.605	0.176	17	3.2	0.00092	1.392
<input type="checkbox"/>	7	ICES J MAR SCI	1054-3139	6932	2.277	2.472	0.402	189	7.4	0.01580	0.834
<input type="checkbox"/>	8	REV FISH BIOL FISHER	0960-3166	2101	2.270	3.079	0.423	52	>10.0	0.00294	0.952
<input type="checkbox"/>	9	AQUACULT ENV INTERAC	1869-215X	74	2.219	2.219	0.158	19		0.00030	0.535
<input type="checkbox"/>	10	FISH OCEANOGR	1054-6006	1769	2.195	2.518	0.258	31	9.2	0.00322	0.966
<input type="checkbox"/>	11	AQUACULTURE	0044-8486	24130	2.009	2.624	0.299	519	9.1	0.02613	0.592
<input type="checkbox"/>	12	MAR FRESHWATER RES	1323-1650	3486	1.982	1.987	0.512	123	8.2	0.00658	0.604
<input type="checkbox"/>	13	ECOL FRESHW FISH	0906-6691	1458	1.935	2.095	0.345	58	6.3	0.00361	0.655
<input type="checkbox"/>	14	J FISH BIOL	0022-1112	12323	1.834	1.836	0.468	301	>10.0	0.01734	0.576
<input type="checkbox"/>	15	MAR COAST FISH	1942-5120	166	1.794	1.624	0.312	48	2.3	0.00104	0.640
<input type="checkbox"/>	16	DIS AQUAT ORGAN	0177-5103	5223	1.734	2.103	0.305	131	8.8	0.00630	0.529
<input type="checkbox"/>	17	FISH RES	0169-7836	5056	1.695	1.816	0.684	196	7.5	0.00953	0.550
<input type="checkbox"/>	18	AQUACULT NUTR	1353-5773	1758	1.588	2.045	0.792	65	5.2	0.00389	0.531
<input type="checkbox"/>	19	J FISH DIS	0140-7775	3471	1.591	1.979	0.358	106	9.6	0.00437	0.484
<input type="checkbox"/>	20	AQUAT ANIM HEALTH	0899-7659	1063	1.550	1.554	0.056	36	>10.0	0.00125	0.457

From: ghe@nifes.no

To: angel.hernandez8@carm.es

CC:

Subject: Aquaculture Nutrition - Decision on Manuscript ID ANU-13-306.R1

Body: 18-Mar-2014

Dear Mr. Hernández:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Study of the dose of thyme essential oil in feed to prolong the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*)" in its current form for publication in Aquaculture Nutrition.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Aquaculture Nutrition, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Gro-Ingunn Hemre
Editor, Aquaculture Nutrition
ghe@nifes.no, gro-ingunn.hemre@nifes.no

Date Sent: 18-Mar-2014