



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Efecto de la suplementación de aceites vegetales y sus mezclas sobre la fermentación ruminal y el perfil de ácidos grasos en leche**

**Jair Esteban Parales Girón**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Departamento de Producción Animal

Bogotá D.C., Colombia

2015



# **Efecto de la suplementación de aceites vegetales y sus mezclas sobre la fermentación ruminal y el perfil de ácidos grasos en leche**

**Jair Esteban Parales Girón**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Producción Animal**

**Línea de Profundización Nutrición de Rumiantes**

Directora:

Ph.D. Martha Lucía Pabón Restrepo

Codirector:

Ph.D. Juan Evangelista Carulla Fornaguera

Línea de Investigación:

Nutrición Animal

Grupo de Investigación:

Nutrición Animal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Departamento de Producción Animal

Bogotá D.C., Colombia

2015



*A mis padres, hermanos, profesores, compañeros de laboratorio, a la “crème de la crème” y a todos aquellos que pusieron parte de su ingenio, fuerza y buena voluntad para la feliz conclusión de este ciclo: ¡Gracias mil!*

*Porque donde esté vuestro tesoro, allí estará también vuestro corazón*

*Mateo 6:21*



## Agradecimientos

A los Doctores Martha Pabón y Juan Carulla, directores de este trabajo por sus valiosos aportes, confianza y paciencia.

A la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá por el apoyo económico para la elaboración de este trabajo.

Al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia UNAL, Sede Bogotá por el apoyo en los análisis químicos y ensayos *in vitro* de esta tesis, especialmente a Carol Cortés y Luisa Segura.

Al Grupo de Investigación en Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia UNAL, Sede Bogotá, en especial a Euclides de la Vega, como una especie de tutor primordial, a César Mendoza, Javier León, Juan Vargas, María Mercedes Knowles por su aporte académico y a Renzo Rocha por el apoyo logístico en la fase experimental.

Al Laboratorio de Biotecnología Ruminal UNAL, Sede Medellín, por el apoyo en los ensayos *in vitro* de esta tesis.

Al Centro de Investigación Agropecuario Marengo UNAL, Sede Bogotá por facilitar los elementos necesarios para la fase *in vivo* de esta tesis.

## Resumen

Se determinó el efecto de incluir aceites vegetales con diferentes perfiles de ácidos grasos (**AG**) y sus mezclas sobre la fermentación ruminal, producción de metano (**CH<sub>4</sub>**), producción y composición de la leche. Se realizaron tres experimentos, dos *in vitro* y uno *in vivo*. En los ensayos *in vitro*, se utilizaron aceites de maíz (**M**, rico en ácido linoléico), linaza (**L**, rico en ácido linolénico) y palmiste (**P**, rico en ácido laúrico) y sus mezclas **M-L**, **M-P** o **L-P** en proporciones 75:25, 50:50 y 25:75. En el primero se determinaron variables de fermentación (digestibilidad, **AGV**, producción de **CH<sub>4</sub>**) y en el segundo los cambios en el perfil de **AG**. Dependiendo el ensayo, en botellas de vidrio o tubos de PVC se adicionaron 350 mg de *Cenchrus clandestinus*, 150 mg de concentrado, con o sin adición de 15 µl de los aceites o sus mezclas que fueron incubadas con 50 ml de fluido ruminal y medio de cultivo (proporción 1:4). La adición de **P** comparada con **M** y **L** disminuyó la degradación de la **MS** (%) (**P**: 67.8, **M** y **L** 63.0;  $p < 0.001$ ), de la **FDN** (%) (**P**: 44.5, **M** y **L** 35.9;  $p < 0.001$ ), las producciones de gas (ml) (**P**: 116.8, **M** y **L**: 93.1;  $p < 0.001$ ), **CH<sub>4</sub>** (ml) (**P**: 32.2, **M** y **L** 24.1;  $p < 0.001$ ) y la concentración de **AGV** (mmol/l) (**P**: 81.65, **M** y **L**: 77.7;  $p < 0.01$ ). La adición de aceites modificó el perfil de la mayoría de **AG** y disminuyó la proporción de **AG** impares, *trans* con excepción del **19:0** y de 18 carbonos ( $p < 0.001$ ). La adición de **M** y **L** generó un aumento en las proporciones (g/100 g de **AG**) de **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>** y **18:2<sub>t10 c12</sub>** y aumentos para los **AG** de cadena media saturados para **P** ( $p < 0.001$ ). La adición de **M** produjo mayores proporciones de **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>** ( $p < 0.001$ ) y disminuyó la de **18:2<sub>t10 c12</sub>** comparado con **L**. La mezcla de **P** con **M** o **L** aumento las proporciones de **18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**.

En el ensayo *in vivo* se evaluó el efecto de la suplementación de 720 g de **M** o su mezcla con **P** (**MP** 75:25) a vacas en pastoreo de kikuyo sobre la producción de **CH<sub>4</sub>**, **AGV**, producción de leche y perfil de **AG**. El uso de aceites aumentó la producción de leche (kg/d) (**C**: 21.4, **M**: 23.6 y **MP**: 23.9;  $p < 0.01$ ) y la concentración de grasa láctea (%) (**C**: 3.15, **M**: 3.40 y **MP**: 3.40;  $p < 0.05$ ). Las proporciones de **18:2<sub>c9</sub> 111** fueron mayores para los tratamientos con aceite (**C**: 0.68 vs **M**: 1.56 y **MP**: 1.01), siendo superior para **M** ( $p < 0.01$ ). Los **AG** sintetizados *de novo* (g/100 g de **AG**) en leche fueron superiores para **C** (**C**: 68.5%, **M**: 52.2% y **MP**: 58.6%;  $p < 0.01$ ). La inclusión de aceites disminuyó la producción estimada de **CH<sub>4</sub>** (ml/mol producida) ( $p < 0.05$ ). Sustituir un 25% de **M** por **P** aumentó los índices de aterogenicidad, trombocenicidad y redujo las proporciones de **18:1<sub>111</sub>** y **18:2<sub>c9</sub> 111** en leche. Adicionar aceites a dietas de vacas en pastoreo es una opción para aumentar el volumen de leche, modificar su composición de **AG** y reducir la producción de **CH<sub>4</sub>**.

**Palabras clave:** ácido linoleico conjugado (**ALC**), biohidrogenación (**BH**), degradación, metano (**CH<sub>4</sub>**), vaca lechera

## Abstract

The effects of the inclusion of vegetable oils with different profiles of fatty acids (**FA**) and their mixtures on ruminal fermentation, methane (**CH<sub>4</sub>**) production, the production and the composition of the milk were evaluated. We conducted three experiments, two *in vitro* and one *in vivo*. Corn oil (**CO**, rich in linoleic acid), linseed (**LO**, rich in linolenic acid) and palm kernel oil (**PKO**, rich in lauric acid) and their mixtures **CO-LO**, **MO-PKO** o **LO-PKO** in proportions 75:25, 50:50 and 25:75 were used in the *in vitro* tests. In the first, variables associated with fermentation (digestibility, **VFA** profile, **CH<sub>4</sub>** production) were determined while in the second those associated with changes in the profile of the fermentation. Depending of the essay, in glass bottles or PVC tubes, 350 mg of *Cenchrus clandestinus* and 150 mg of concentrate, with or without the addition of 15 µl of oils or their mixtures were incubated with 50 ml of ruminal fluid and culture media (ratio 1:4). The addition of **PKO** compared with **CO** and **LO** decreased **DM** degradation (%). (**PKO**: 67.8, **CO** and **LO** 63.0;  $p < 0.001$ ), **NDF** (%) (**PKO**: 44.5, **CO** and **LO**: 35.9;  $p < 0.001$ ), gas production (ml) (**PKO**: 116.8, **CO** and **LO**: 93.1;  $p < 0.001$ ), **CH<sub>4</sub>** production (ml) (**PKO**: 32.2, **CO** and **LO** 24.1;  $p < 0.001$ ) and the molar concentration of **VFA** (mmol/l) (**P**: 81.65, **M** and **L**: 77.7;  $p < 0.01$ ). The addition of oils changed the profile of the majority of **FA** and decreased the proportion of odd and *trans* **FA** except **19:0** and 18 carbons ( $p < 0.001$ ). The addition of **CO** and **LO** generated an increase in the proportions (g/100g **FA**) of **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>**, and **18:2<sub>t10 c12</sub>** and less increase for medium chain saturated **FA** compared to **PKO** ( $p < 0.001$ ). The addition of **C** produced higher proportions of **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>** ( $p < 0.001$ ) and decreased **18:2<sub>t10 c12</sub>** compared to **LO**. The inclusion of **PKO** to a mixture with **CO** or **LO** produced higher proportions of **18:2<sub>c9 c12</sub>** and **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**.

The in vivo essay evaluated the effect of supplementation with 720 g of **CO** or its mixture with **PKO** (75:25 **CO-PKO**) in cows grazing kikuyu on the production of **CH<sub>4</sub>**, concentration of **VFA**, milk production and its **FA** profile. The use of oils increased milk production (kg/d) (**C**: 21.4, **CO**: 23.6 and **CO-PKO**: 23.9;  $p < 0.01$ ) and milk fat concentration (%) (**C**: 3.15, **CO**: 3.40 and **CO-PKO**: 3.40;  $p < 0.05$ ). Concentrations of **18:2<sub>c9 t11</sub>** were higher for treatments with oil (**C**: 0.68 vs. **CO**: 1.56 and **CO-PKO**: 1.01), being superior for **CO** ( $p < 0.01$ ). The *novo* synthesized **FA** in milk were higher for **C** (**C**: 68.5, **CO**: 52.2 and **CO-PKO**: 58.6;  $p < 0.01$ ). Oils addition reduced estimated **CH<sub>4</sub>** production (ml/produced mol) ( $p < 0.05$ ). The replacement of 25% of **CO** with **PKO** increased the atherogenicity, thrombogenicity index and reduced the proportions of **18:1<sub>t11</sub>** and **18:2<sub>c9 t11</sub>** in milk. The addition of oils to diets of grazing cows is an option to increase milk volume, changing its **FA** composition and reduce the production of **CH<sub>4</sub>**.

**Keywords:** biohydrogenation (**BH**), conjugated linoleic acid (**CLA**), dairy cow, degradación, methane (**CH<sub>4</sub>**)

# Contenido

	<b><u>Pág</u></b>
<i>Resumen</i> .....	IX
<i>Abstract</i> .....	XI
<i>Lista de tablas</i> .....	XIX
<i>Lista de figuras</i> .....	XXIII
<i>Lista de anexos</i> .....	XXV
<i>Lista de abreviaturas</i> .....	XXVII
<i>Introducción</i> .....	29
1. <i>Capítulo 1: Efecto de la suplementación de aceites vegetales y sus mezclas sobre la fermentación ruminal y perfil de ácidos grasos en leche - Revisión</i> .....	33
<i>Resumen</i> .....	33
<i>Abstract</i> .....	34
<i>Abreviaturas</i> .....	34
1.1 <i>Introducción</i> .....	35
1.2 <i>Lípidos en la alimentación animal</i> .....	36
1.3 <i>Producción entérica de CH<sub>4</sub></i> .....	37

<b>1.4 Lípidos y producción de <math>CH_4</math></b> .....	37
<b>1.4.1 Suplementación con aceites</b> .....	38
<b>1.5 Lípidos y salud humana</b> .....	41
<b>1.6 Biosíntesis de <math>18:2_{c9t11}</math> ALC</b> .....	42
<b>1.7 Aceites vegetales y producción de <math>18:2_{c9t11}</math> ALC</b> .....	44
<b>1.7.1 Suplementación con aceites</b> .....	45
<b>1.8 Conclusiones</b> .....	47
<b>1.9 Referencias bibliográficas</b> .....	48
<b>2. Inclusión de aceites de maíz, linaza o palmiste y sus mezclas en un sistema in vitro: efectos sobre la fermentación ruminal</b> .....	53
<b>Resumen</b> .....	57
<b>Abstract</b> .....	59
<b>Abreviaturas</b> .....	60
<b>2.1 Introducción</b> .....	60
<b>2.2 Metodología</b> .....	61
<b>2.2.1 Localización</b> .....	61
<b>2.2.2 Tratamientos</b> .....	62
<b>2.2.3 Incubación</b> .....	64
<b>2.2.4 Análisis químicos</b> .....	64
<b>2.2.5 Extracción de AG</b> .....	64
<b>2.2.6 Cuantificación de AG, AGV y <math>CH_4</math></b> .....	66
<b>2.2.7 Diseño experimental</b> .....	67
<b>2.3 Resultados</b> .....	68
<b>2.3.1 Contraste 1 (C vs M, L, P y mezclas)</b> .....	68
<b>2.3.2 Contraste 2 (M, L y P vs mezclas)</b> .....	68
<b>2.3.3 Contraste 3 (M y L vs P)</b> .....	68

2.3.4	Contraste 4 ( <i>M</i> vs <i>L</i> ) .....	68
2.3.5	Contraste 5 (Mezclas <i>M-L</i> vs mezclas <i>M-P L-P</i> ) .....	68
2.3.6	Contraste 6 (Mezclas <i>M-P</i> vs mezclas <i>L-P</i> ) .....	68
2.3.7	Contraste 7 ( $M_{75}L_{25}$ vs $M_{50}L_{50}$ y $M_{25}L_{75}$ ) .....	68
2.3.8	Contraste 8 ( $M_{50}L_{50}$ vs $M_{25}L_{75}$ ) .....	68
2.3.9	Contraste 9 ( $M_{75}P_{25}$ vs $M_{50}P_{50}$ y $M_{25}P_{75}$ ) .....	69
2.3.10	Contraste 10 ( $M_{50}P_{50}$ vs $M_{25}P_{75}$ ) .....	69
2.3.11	Contraste 11 ( $L_{75}P_{25}$ vs $L_{50}P_{50}$ y $L_{25}P_{75}$ ) .....	69
2.3.11	Contraste 12 ( $L_{50}P_{50}$ vs $L_{25}P_{75}$ ) .....	69
<b>2.4</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>69</b>
2.4.1	Control vs adición de aceites .....	72
2.4.2	Aceites puros vs mezclas .....	74
2.4.3	Aceites ricos en AG poliinsaturados ( <i>M</i> y <i>P</i> ) vs aceite rico en 12:0 ( <i>P</i> ) .....	75
2.4.4	Aceite rico en 18:2 <sub>c9 c12</sub> ( <i>M</i> ) vs aceite rico en 18:3 <sub>c9 c12 c15</sub> ( <i>L</i> ) .....	77
2.4.5	Mezclas de aceite ricos en AG poliinsaturados ( <i>M-L</i> ) vs mezclas que contienen AG poliinsaturados y 12:0 ( <i>M-P</i> y <i>L-P</i> ) .....	79
2.4.6	Mezclas de aceite rico en 18:2 <sub>c9 c12</sub> y aceite rico en 12:0 vs mezclas de aceite rico en ácido 18:3 <sub>c9 c12 c15</sub> y aceite rico en 12:0 Mezclas <i>M-P</i> vs mezclas <i>L-P</i> , Mezclas ricas en 18:2 <sub>c9 c12</sub> y 18:3 <sub>c9 c12 c15</sub> ( $M_{75}L_{25}$ vs $M_{50}L_{50}$ y $M_{25}L_{75}$ ; $M_{50}L_{50}$ vs $M_{25}L_{75}$ ) .....	80
2.4.7	Mezclas ricas en 18:2 <sub>c9 c12</sub> y 12:0 en diferentes proporciones ( $M_{75}P_{25}$ vs $M_{50}P_{50}$ y $M_{25}P_{75}$ ; $M_{50}P_{50}$ vs $M_{25}P_{75}$ ) .....	80
2.4.8	Mezclas ricas en 18:2 <sub>c9 c12 c15</sub> y 12:0 en diferentes Proporciones ( $L_{75}P_{25}$ vs $L_{50}P_{50}$ y $L_{25}P_{75}$ ; $L_{50}P_{50}$ vs $L_{25}P_{75}$ ) .....	82
<b>2.5</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>83</b>
<b>2.6</b>	<b>Agradecimientos</b> .....	<b>84</b>
<b>2.7</b>	<b>Referencias bibliográficas</b> .....	<b>84</b>

<b>3. Inclusión de aceites de maíz, linaza o palmiste y sus mezclas en un sistema in vitro: efectos sobre el perfil de ácidos grasos .....</b>	<b>89</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>89</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>90</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>91</b>
<b>3.1 Introducción .....</b>	<b>92</b>
<b>3.2 Metodología .....</b>	<b>93</b>
3.2.1 Localización .....	93
3.2.2 Tratamientos .....	93
3.2.3 Incubación .....	95
3.2.4 Análisis químicos .....	96
3.2.5 Extracción de AG .....	96
3.2.6 Análisis de AG.....	96
3.2.7 Estimación del índice de efecto asociativo .....	98
3.2.8 Diseño experimental .....	98
<b>3.3 Resultados .....</b>	<b>99</b>
3.3.1 Contraste 1 (C vs M, L, P y mezclas) .....	99
3.3.2 Contraste 2 (M, L y P vs mezclas) .....	99
3.3.3 Contraste 3 (M y L vs P) .....	100
3.3.4 Contraste 4 (M vs L) .....	100
3.3.5 Contraste 5 (Mezclas M-L vs mezclas M-P L-P) .....	100
3.3.6 Contraste 6 (Mezclas M-P vs mezclas L-P) .....	100
3.3.7 Contraste 7 ( $M_{75}L_{25}$ vs $M_{50}L_{50}$ y $M_{25}L_{75}$ ) .....	100
3.3.8 Contraste 8 ( $M_{50}L_{50}$ vs $M_{25}L_{75}$ ) .....	104
3.3.9 Contraste 9 ( $M_{75}P_{25}$ vs $M_{50}P_{50}$ y $M_{25}P_{75}$ ) .....	104
3.3.10 Contraste 10 ( $M_{50}P_{50}$ vs $M_{25}P_{75}$ ) .....	104

3.3.11	<i>Contraste 11 (<math>L_{75}P_{25}</math> vs <math>L_{50}P_{50}</math> y <math>L_{25}P_{75}</math>)</i> .....	104
3.3.11	<i>Contraste 12 (C vs M, L y P)</i> .....	104
<b>3.4</b>	<b>Discusión</b> .....	105
3.4.1	<i>Efecto de la adición de aceites</i> .....	105
3.4.2	<i>Comparaciones de aceites ricos en AG polinsaturados (M y L) con aceite rico en 12:0 (P) y de aceites ricos en 18:2<sub>c9 c12</sub> (M) o 18:3<sub>c9 c12 c15</sub> (L)</i> .....	110
3.4.3	<i>Efectos asociativos de mezclar aceites (Aceites puros vs mezclas)</i> .....	112
3.4.4	<i>Mezclas M-L vs mezclas M-P L-P; mezclas M-P vs L-P</i> ....	115
3.4.5	<i>Mezclas M-L</i> .....	116
3.4.6	<i>Mezclas M-P</i> .....	118
3.4.7	<i>Mezclas L-P</i> .....	119
<b>3.5</b>	<b>Conclusiones</b> .....	121
<b>3.6</b>	<b>Agradecimientos</b> .....	121
<b>3.7</b>	<b>Referencias bibliográficas</b> .....	121
<b>4.</b>	<b><i>Suplementación con aceites de maíz y su mezcla con aceite de palmiste a vacas en pastoreo: fermentación ruminal, producción de leche y perfil de ácidos grasos</i></b> .....	127
	<b>Resumen</b> .....	127
	<b>Abstract</b> .....	128
	<b>Abreviaturas</b> .....	129
<b>4.1</b>	<b>Introducción</b> .....	130
<b>4.2</b>	<b>Metodología</b> .....	131
4.2.1	<i>Localización</i> .....	132
4.2.2	<i>Periodo experimental y tratamientos</i> .....	132
4.2.3	<i>Animales y manejo</i> .....	133
4.2.4	<i>Mediciones, toma de muestras y análisis de laboratorio</i> .....	134

4.2.4.1	<i>Recolección de muestras</i> .....	134
4.2.4.2	<i>Extracción y metilación de las grasas</i> .....	135
4.2.4.3	<i>Cuantificación de AG</i> .....	136
4.2.4.4	<i>Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV)</i> .....	136
4.2.4.5	<i>Análisis químicos</i> .....	136
4.2.5	<i>Cálculos</i> .....	137
4.2.6	<i>Diseño experimental</i> .....	138
<b>4.3</b>	<b>Resultados</b> .....	139
4.3.1	<i>Parámetros de fermentación ruminal</i> .....	139
4.3.2	<i>Consumo de MS</i> .....	140
4.3.3	<i>Producción, composición de la leche</i> .....	141
4.3.4	<i>Perfil de AG de la leche</i> .....	141
<b>4.4</b>	<b>Discusión</b> .....	143
4.4.1	<i>Fermentación ruminal</i> .....	143
4.4.2	<i>Consumo de materia seca MS</i> .....	146
4.4.3	<i>Producción, calidad de la leche</i> .....	148
4.4.4	<i>Perfil de AG de la leche</i> .....	150
<b>4.5</b>	<b>Conclusiones</b> .....	157
<b>4.6</b>	<b>Agradecimientos</b> .....	158
<b>4.7</b>	<b>Referencias bibliográficas</b> .....	158
<b>5.</b>	<b>Discusión, conclusiones y recomendaciones</b> .....	171
5.1	<b>Discusión</b> .....	171
5.2	<b>Conclusiones</b> .....	173
5.3	<b>Recomendaciones</b> .....	175
<b>6.</b>	<b>Anexos</b> .....	177

## Lista de tablas

	<b><u>Pág</u></b>
<b>Tabla 1.1</b> Productos de la fermentación ruminal	37
<b>Tabla 1.2</b> Estimación de la producción de $CH_4$	37
<b>Tabla 1.3</b> Efecto antimetanogénico de los lípidos	39
<b>Tabla 1.4</b> Efecto de distintos AG sobre salud humana	42
<b>Tabla 2.1</b> Tratamientos	62
<b>Tabla 2.2</b> Composición del concentrado	63
<b>Tabla 2.3</b> Composición química del forraje y del concentrado	63
<b>Tabla 2.4</b> Composición de <b>AG</b> de los sustratos	63
<b>Tabla 2.5</b> Perfil de <b>AG</b> de los aceites y sus mezclas	65
<b>Tabla 2.6</b> Contrastes ortogonales	67
<b>Tabla 2.7</b> Efecto de la adición de aceites de maíz, linaza, palmiste o sus mezclas sobre la fermentación ruminal (promedios)	70
<b>Tabla 2.8</b> Efecto de la adición de aceites de maíz, linaza, palmiste o sus mezclas sobre la fermentación ruminal (probabilidades)	70
<b>Tabla 3.1</b> Tratamientos	94
<b>Tabla 3.2</b> Composición del concentrado	94
<b>Tabla 3.3</b> Composición química del forrajes y del concentrado	94
<b>Tabla 3.4</b> Composición de <b>AG</b> de los sustratos	95

<b>Tabla 3.5</b>	Perfil de <b>AG</b> de los aceites y sus mezclas	97
<b>Tabla 3.6</b>	Contrastes ortogonales	99
<b>Tabla 3.7</b>	Perfil de <b>AG</b> del fluido ruminal incubado con aceites de maíz, linaza, palmiste o sus mezclas (promedios)	101
<b>Tabla 3.8</b>	Efecto de la adición de aceites de maíz, linaza, palmiste o sus mezclas sobre el perfil de <b>AG</b> del fluido ruminal (probabilidades)	106
<b>Tabla 3.9</b>	Efecto de la adición de aceites maíz ( <b>M</b> ), linaza ( <b>L</b> ), palmiste ( <b>P</b> ) o sus mezclas sobre el perfil de <b>AG</b> del fluido ruminal	109
<b>Tabla 3.10</b>	Efecto de la adición de aceites sobre el perfil de <b>AG</b> del fluido ruminal	111
<b>Tabla 3.11</b>	Efecto de la adición de aceites puros o sus mezclas sobre el perfil de <b>AG</b> del fluido ruminal	113
<b>Tabla 3.12</b>	Efecto asociativo de las mezclas de aceites sobre el perfil de <b>AG</b> del fluido ruminal	114
<b>Tabla 3.13</b>	Efecto de la adición de las mezclas <b>M-L</b> , <b>M-P</b> y <b>L-P</b> sobre el perfil de <b>AG</b> del fluido ruminal	116
<b>Tabla 3.14</b>	Efecto de la adición de las mezclas <b>M<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b> , <b>M<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b> y <b>M<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b> sobre el perfil de <b>AG</b> del fluido ruminal	117
<b>Tabla 3.15</b>	Efecto de la adición de las mezclas <b>M<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b> , <b>M<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b> y <b>M<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b> sobre el perfil de <b>AG</b> del fluido ruminal	118
<b>Tabla 3.16</b>	Efecto de la adición de las mezclas <b>L<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b> , <b>L<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b> y <b>L<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b> sobre el perfil de <b>AG</b>	120
<b>Tabla 4.1</b>	Composición química de los forrajes y el concentrado	132
<b>Tabla 4.2</b>	Composición de los ingredientes del concentrado	133
<b>Tabla 4.3</b>	Perfil de <b>AG</b> de los forrajes, concentrado, aceite de maíz ( <b>M</b> ) y aceite de maíz y palmiste ( <b>MP</b> )	133
<b>Tabla 4.4</b>	Efecto de la suplementación de aceite de maíz ( <b>M</b> ) y su mezcla con aceite de palmiste ( <b>MP</b> ) sobre la fermentación ruminal	140
<b>Tabla 4.5</b>	Consumo de kikuyo, concentrado, ensilaje y aceites de vacas lecheras en pastoreo	140
<b>Tabla 4.6</b>	Producción y composición de la leche de vacas sin suplementar	141

	( <b>C</b> ) y con suplementación de aceite de maíz ( <b>M</b> ) o su mezcla con aceite de palmiste ( <b>MP</b> )	
<b>Tabla 4.7</b>	Composición de <b>AG</b> de la leche de vacas en pastoreo suplementadas con aceite de maíz ( <b>M</b> ) o una mezcla de aceite de maíz y palmiste ( <b>MP</b> )	142
<b>Tabla 4.8</b>	Efecto de la suplementación de aceite de maíz ( <b>M</b> ) o una mezcla de aceite de maíz y palmiste ( <b>MP</b> ) sobre la composición de <b>AG</b> de la leche	143



## Lista de figuras

	<u>Pág</u>
<b>Figura 1.1</b> <i>BH</i> ruminal de los <b>AG</b> y síntesis del <b>18:2<sub>c9 t11</sub> ALC</b>	44
<b>Figura 2.1</b> Promedio de: a) Degradación de la <b>MS (DMS)</b> , y del <b>FDN (DFDN)</b> ; b) Producción total de gas y <b>CH<sub>4</sub></b> ; c) Proporción de <b>CH<sub>4</sub></b> ; d) Producción de gas por <b>FDN</b> degradada y Producción <b>CH<sub>4</sub></b> por unidad de <b>MS</b> degradada para el tratamiento control (sin adición de aceites) y los tratamientos con adición de aceites puros (maíz <b>-M-</b> , linaza <b>-L-</b> y palmiste <b>-P-</b> ) y sus mezclas	74
<b>Figura 2.2</b> Promedio de la degradación de la <b>FDN (DFDN)</b> para los tratamientos con aceites puros (maíz <b>-M-</b> , linaza <b>-L-</b> y palmiste <b>-P-</b> ) y las mezclas de aceites	75
<b>Figura 2.3</b> Promedio de: a) Degradación de la <b>MS (DMS)</b> y de la <b>FDN (DFDN)</b> ; b) Producción total de gas y <b>CH<sub>4</sub></b> ; c) Producción de gas por <b>MS</b> degradada y Producción <b>CH<sub>4</sub></b> por unidad de <b>MS</b> degradada; d) Concentración molar de <b>AGV's</b> para el promedio de los tratamientos de aceite de maíz ( <b>M</b> ) y aceite de linaza ( <b>L</b> ) y el promedio del tratamiento con aceite de palmiste ( <b>P</b> )	77
<b>Figura 2.4</b> Promedio de la degradación de la <b>FDN (DFDN)</b> para el tratamiento con aceite de maíz ( <b>M</b> ) y el tratamiento con aceite de linaza ( <b>L</b> )	78
<b>Figura 2.5</b> Promedio de: a) Degradación de la <b>MS (DMS)</b> y de la <b>FDN (DFDN)</b> ; b) Producción total de gas y <b>CH<sub>4</sub></b> ; c) Producción de gas y <b>CH<sub>4</sub></b> por unidad de <b>MS</b> degradada para los tratamientos de mezclas de aceite de maíz y aceite de linaza ( <b>M-L</b> ) y los tratamientos con mezclas de maíz y palmiste ( <b>M-P</b> ) y linaza y palmiste ( <b>L-P</b> )	79
<b>Figura 2.6</b> Promedio de: a) Degradación de la <b>MS (DMS)</b> y de la <b>FDN</b>	80

(*DFDM*); b) Producción total de gas y  $CH_4$ ; c) Producción de gas y  $CH_4$  por unidad de *MS* degradada para los tratamientos con maíz:palmiste ( $M_{75}P_{25}$ ) y para los tratamientos con maíz:palmiste ( $M_{50}P_{50}$ ) y maíz:palmiste ( $M_{25}P_{75}$ )

<b>Figura 2.7</b>	Promedio de: a) Degradación de la <i>FDN</i> ( <i>DFDM</i> ); b) Producción total de gas y c) Producción de gas por unidad de <i>MS</i> degradada para los tratamientos los tratamientos con maíz:palmiste ( $M_{50}P_{50}$ ) y maíz:palmiste ( $M_{25}P_{75}$ )	81
<b>Figura 2.8</b>	Promedio de: a) Degradación de la <i>MS</i> ( <i>DMS</i> ) y de la <i>FDN</i> ( <i>DFDM</i> ); b) Producción total de gas y $CH_4$ ; c) Producción de gas y $CH_4$ por unidad de <i>MS</i> degradada d) proporción de ácido valérico para los tratamientos con linaza:palmiste ( $L_{75}P_{25}$ ) y para los tratamientos con linaza:palmiste ( $L_{50}P_{50}$ ) y linaza:palmiste ( $L_{25}P_{75}$ )	82
<b>Figura 2.9</b>	Promedio de: a) Degradación de la <i>MS</i> ( <i>DMS</i> ) y de la <i>FDN</i> ( <i>DFDM</i> ); b) Producción total de gas y $CH_4$ ; c) Producción de gas por unidad de <i>MS</i> degradada para los tratamientos con linaza:palmiste ( $M_{50}P_{50}$ ) y linaza:palmiste ( $M_{25}P_{75}$ )	83
<b>Figura 4.1</b>	Efecto de la secuencia de los tratamientos sobre la proporción de $14:1_{t9}$ en leche	153
<b>Figura 4.2</b>	Efecto de la secuencia de los tratamientos sobre la proporción de $16:1_{t9}$ en leche	153
<b>Figura 4.3</b>	Efecto de la secuencia de los tratamientos sobre la proporción de $18:1_{t11}$ en leche	154
<b>Figura 4.4</b>	Efecto de la secuencia de los tratamientos sobre la proporción de $18:2_{c9 t11}$ en leche	154

## Lista de anexos

		<b><u>Pág</u></b>
<b>Anexo 1</b>	Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 2: fermentación <i>in vitro</i>	169
<b>Anexo 2</b>	Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 3: perfil de <b>AG</b> del fluido ruminal	170
<b>Anexo 3</b>	Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 3: sumatorias de <b>AG</b> del fluido ruminal	171
<b>Anexo 4</b>	Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 4: fermentación ruminal	171
<b>Anexo 5</b>	Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 4: consumo de <b>MS</b>	172
<b>Anexo 6</b>	Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 4: Producción y calidad de leche	172
<b>Anexo 7</b>	Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 4: composición de <b>AG</b> de la leche	173
<b>Anexo 8</b>	Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 4: sumatorias y relaciones <b>AG</b> de la leche	174



## Lista de abreviaturas

<i>Abreviatura</i>	<i>Término</i>
<b>AG</b>	Ácido graso
<b>ALC</b>	Ácido linoleico conjugado
<b>AGV</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>BH</b>	Biohidrogenación
<b>C</b>	Control sin inclusión de aceite
<b>CNE</b>	Carbohidratos no estructurales
<b>EE</b>	Extracto etéreo
<b>EN<sub>L</sub></b>	Energía neta de lactancia
<b>FDN</b>	Fibra en detergente neutro
<b>FDNd</b>	Fibra en detergente neutro degradada
<b>FDA</b>	Fibra en detergente ácido
<b>FDAi</b>	Fibra en detergente ácido indigerible
<b>L</b>	Aceite de linaza
<b>L<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>	Mezcla de 25% de aceite linaza y 75% de aceite de palmiste
<b>L<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b>	Mezcla de 50% de aceite de linaza y 50% de aceite de palmiste
<b>L<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b>	Mezcla de 75% de aceite de linaza y 25% de aceite de palmiste
<b>L-P</b>	Mezcla de aceite de linaza y aceite de palmiste
<b>M</b>	Aceite de maíz
<b>M<sub>25</sub>L<sub>75</sub></b>	Mezcla de 25% de aceite de maíz y 75% de aceite de linaza
<b>M<sub>50</sub>L<sub>50</sub></b>	Mezcla de 50% de aceite de maíz y 50% de aceite de linaza
<b>M<sub>75</sub>L<sub>25</sub></b>	Mezcla de 75% de aceite de maíz y 25% de aceite de linaza
<b>M<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>	Mezcla de 25% de aceite de maíz y 75% de aceite de palmiste
<b>M<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b>	Mezcla de 50% de aceite de maíz y 50% de aceite de palmiste
<b>M<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b>	Mezcla de 75% de aceite de maíz y 25% de aceite de palmiste
<b>M-L</b>	Mezclas de aceite de maíz y aceite de linaza
<b>M-P</b>	Mezcla de aceite de maíz y palmiste
<b>MS</b>	Materia seca
<b>MSd</b>	Materia seca degradada

***P***

Aceite de palmiste

***PC***

Proteína cruda

***TMR***

Dietas totalmente mezcladas (sigla en inglés)

## Introducción

Colombia aporta el 0.37% del total de gases de efecto invernadero (**GEI**) a nivel mundial (IPCC, 2006). De los **GEI**, el metano (**CH<sub>4</sub>**) es de gran importancia, ya que es producto de la fermentación entérica del alimento por parte de los rumiantes. Del total de emisiones de **GEI** en Colombia, el **CH<sub>4</sub>** producido por los bovinos representa cerca del 47.5% (IDEAM 2007). Este gas constituye una pérdida energética en los sistemas de producción, ya que dependiendo de la composición de la dieta, la producción de **CH<sub>4</sub>** puede alcanzar hasta el 15% de la energía bruta consumida por el animal (Johnson y Johnson, 1995).

Sumado a la problemática ambiental asociada a los sistemas de producción bovina, existen ciertas reservas relacionadas al consumo de carne y leche proveniente de rumiantes debido a la composición de su grasa. Sin embargo durante las últimas décadas se han identificado ácidos grasos característicos de la leche y carne de rumiantes que pueden llegar a tener un efecto positivo sobre la salud humana. El ácido trans-vaccénico (**18:1<sub>t11</sub>**) y el ácido linoleico conjugado (**18:2<sub>c9 t11</sub> ALC**), isómero del ácido linoleico (**18:2<sub>c9 c12</sub>**) poseen efectos promisorios sobre la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles.

La inclusión de grasa en dietas de vacas lecheras y su composición de **AG** son un factor determinante en la composición de la leche y su perfil de **AG** (Khanal y Olson, 2004). La inclusión de aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados como el linoleico (**18:2<sub>c9 c12</sub>**) y linolénico (**18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**) aumentan las concentraciones lácteas de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** comparado a otros aceites. Cuando se comparan aceites ricos en **18:2<sub>c9 c12</sub>** (maíz, soya, girasol) y **18:2<sub>c9 c12 c15</sub>**, los alimentos ricos en **18:2<sub>c9 c12</sub>** generan mayores incrementos en la

concentración de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** (Collomb, *et al.*, 2004a; Collomb, *et al.*, 2004b; Zhang, *et al.*, 2006; Bu, *et al.*, 2007; Matsushita, *et al.*, 2007; Stoffel, *et al.*, 2015).

Las grasas y aceites también han sido utilizadas para disminuir la producción de **CH<sub>4</sub>** en los rumiantes y en sistema *in vitro* (Dong, *et al.*, 1997; Machmüller, *et al.*, 1998; Machmüller, *et al.*, 2000; Beauchemin, *et al.*, 2008, Martin, *et al.*, 2010; Patra y Yu, 2013) y algunos trabajos sugieren que la reducción depende del perfil de **AG** de los mismos (Beauchemin, *et al.*, 2007; Beauchemin, *et al.*, 2008; Patra, 2013; Patra, 2014). Las adiciones de aceites ricos en ácidos grasos de cadena media saturados o sus formas puras (laúrico -**12:0**- y mirístico -**14:0**- principalmente) han generado mayores reducciones en la producción de **CH<sub>4</sub>** comparado con otros aceites y **AG**. Sin embargo, el uso de estos aceites incrementa la concentración de **AG** de cadena media (**12:0** y **14:0**) en la leche (Storry, *et al.*, 1971; Hermansen, 1995; Hristov, *et al.*, 2009), los cuales si son consumidos en exceso pueden generar problemas circulatorios en humanos favoreciendo la aparición de marcadores asociados al riesgo cardiovascular (Ulbricht y Southgate, 1991) como el aumento del colesterol en sangre (Grundy, 1994; Mensink, *et al.*, 2003) con un aumento del riesgo de infarto (Khromhout, *et al.*, 1995) e incremento de desórdenes ateroscleróticos (Nicolosi, *et al.*, 1997).

Teniendo en cuenta que los mecanismos que causan aumentos en la proporción de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la leche y la disminución de **CH<sub>4</sub>** debido a la adición de aceites con diferentes perfiles de **AG** son distintos, se podría hipotetizar la existencia de sinergias (efectos asociativos positivos) con las mezclas de aceites respecto a sus formas puras.

Para probar esta hipótesis se realizaron dos experimento *in vitro* para determinar el efecto de los aceites puros y sus mezclas sobre la fermentación ruminal (experimento 1) y el efecto sobre el perfil de **AG** de fluido ruminal (experimento 2). De los resultados obtenidos en los experimentos 1 y 2 se seleccionaron los tratamientos que generaron las mejores respuestas para ser probados en un ensayo *in vivo* (experimento 3). En el experimento 3 se determinó el efecto de la suplementación con aceites de maíz y su mezcla con aceite de palmiste sobre la fermentación ruminal, producción de leche y perfil de ácidos grasos a vacas en pastoreo.

## Referencias bibliográficas

BU, D. P.; WANG, J. Q.; DHIMAN, T. R. y LIU, S. J. 2007. Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *J Dairy Sci.* 90(2):998-1007.

COLLOMB, M.; SIEBER, R. y BÜTIKOFER, U. 2004a. CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids.* 39(4):355–364.

COLLOMB, M.; SOLLBERGER, H.; BÜTIKOFER, U.; SIEBER, R.; STOLL, W. y SCHAEREN, W. 2004b. Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. *Int Dairy J.* 14(6):549–559.

DONG, Y.; BAE, H.D.; McALLISTER, T.A.; MATHISON, G.W. y CHENG, K.J. 1997. Lipid-induced depression of methane production and digestibility in the artificial rumen system (RUSITEC). *Can J Anim Sci.* 77(2):269-278.

GRUNDY, S.M. 1994. Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 60 (Suppl):986S-990S.

HERMANSEN, J.E. 1995. Prediction of milk fatty acid profile in dairy cows fed dietary fat differing in fatty acid composition. *J Dairy Sci.* 78(4):872-879.

HRISTOV, A.N.; VANDER POL, M.; AGLE, M.; ZAMAN, S.; SCHNEIDER, C.; NDEGWA, P.; VADDELLA, V.K.; JOHNSON, K.; SHINGFIELD, K.J. y Karnati, S.K.R. 2009. Effect of lauric acid and coconut oil on ruminal fermentation, digestion, ammonia losses from manure, and milk fatty acid composition in lactating cows. *J Dairy Sci.* 92(11):5561-5582.

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). 2007. Inventario Nacional de gases de efecto invernadero. Segunda comunicación Nacional ante la Convención marco de las Naciones Unidas sobre cambio climático. Cap 2. Inventario Nacional de gases de efecto invernadero. Colombia, Págs 119-152.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). 2006. Guidelines for National Greenhouse Inventories. Vol. 4. Agriculture, forestry and other land use. Capítulo 10. Emissions from livestock and manure management. IPCC (Eds) Págs 10.1–10.87.

JOHNSON, K.A. y JOHNSON D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci.* 73(8): 2483-2492.

KHANAL, R.C. y OLSON, K.C. 2004. Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat and egg- A review. *Pakistan J Nutr.* 3(2): 82-98.

KROMHOUT, D.; MENOTTI, A.; BLOEMBERG, B.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; DONTAS, A.S.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; KARVONEN, M.; KATAN, M.; NISSINEN, S.; NEDELJKOVIC, J.; PEKKANEN, M.; PEKKARINEN, S.; PUNSAR, S.; RASANEN, L.; SIMIC, B. y TOSHIMA, H. 1995. Dietary saturated and trans-

fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med.* 24(3): 308-315.

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A.; WANNER, M. y KREUZER, M. 1998. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation *in vitro* (Rusitec). *Anim Feed Sci Technol.* 71(1-2):117-130.

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A. y M. KREUZER, M. 2000. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. *Anim Feed Sci Technol.* 85(1-2):41-60.

MARTIN C.; MORGAVI D. P. y DOREAU, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* 4(3):351-365.

MATSUSHITA, M.; TAZINAFO, N.; PADRE, R.; OLIVEIRA, C.; SOUZA, N.; VISENTAINER, J.; MACEDO, F. y RIBAS, N. 2007. Fatty acid profile of milk from Saanen goats fed a diet enriched with three vegetable oils. *Small Ruminant Res.* 72(2-3):127-143.

MENSINK, R.P.; ZOCK, PETER.L.; KESTER, A.D.M and KATAN, M.B. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 77(5): 1146-1155.

NICOLOSI, R.J.; ROGERS, E.J.; KRITCHEVSKY, D.; SCIMECA, J.A. y HUTH, P.J. 1997. Dietary conjugate linoleic acid reduces plasma lipoprotein and early aortic atherosclerosis in hypercholesteremic hamster. *Artery* 22(5):266-277.

PATRA, A.K. y YU, Z. 2013. Effects of coconut and fish oils on methane production, fermentation, abundance and diversity of rumen microbial populations *in vitro*. *J Dairy Sci.* 96(3):1782-1792.

STOFFEL, C.M.; CRUMP, P.M. y ARMENTANO, L.E. 2015. Effect of dietary fatty acid supplements, varying in fatty acid composition, on milk fat secretion in dairy cattle fed diets supplemented to less than 3% total fatty acids. *J Dairy Sci.* 98(1):431-442.

STORRY, J.E.; ROOK, J.A.F. y HALL, A.J. 1967. The effect of the amount and type of dietary fat on milk fat secretion in the cow. *Br J Nutr* 21(2):425-438.

ULBRICHT, T. L. V. y SOUTHGATE, D. A. T. 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet.* 338(8773):985-992.

ZHANG, R.H.; MUSTAFA, A.F. y ZHAO, X. 2006. Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. *Anim Feed Sci Technol.* 127(3-4): 220-233.

# 1. Efecto de la suplementación de aceites vegetales y sus mezclas sobre la fermentación ruminal y perfil de ácidos grasos en leche

## Effect of the supplementation of vegetable oils and their mixtures on ruminal fermentation and milk fatty acid profile

J. Parales<sup>1,2</sup>, M. Pabón<sup>1</sup>, J. Carulla<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Nutrición Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. E-mail: [jecarullaf@unal.edu.co](mailto:jecarullaf@unal.edu.co)

<sup>2</sup>MSc(c) Salud y Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. E-mail [jeparalesg@unal.edu.co](mailto:jeparalesg@unal.edu.co)

<sup>3</sup>Profesor Titular. Departamento de Producción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. E-mail: [jecarullaf@unal.edu.co](mailto:jecarullaf@unal.edu.co)

### Resumen

El metano ( $CH_4$ ), un gas con potencial de calentamiento global es producido en el tracto digestivo de los rumiantes y representa el 47.5% de las emisiones de gases de efecto invernadero del sector agropecuario en Colombia. En la producción animal en las últimas décadas se han identificado compuestos en la leche y carne de rumiantes con actividad biológica como el ácido trans-vaccénico ( $18:1_{t11}$ ) y el ácido linoleico conjugado ( $18:2_{c9\ t11}$ )

**ALC**). Teniendo en cuenta que la dieta es el factor más importante en la modificación del metabolismo ruminal, la inclusión de aceites vegetales ricos en **AG** de cadena media saturados en dietas de vacas lactantes puede disminuir la producción de **CH<sub>4</sub>**, así como aumentar las proporciones de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la leche con el uso de aceites ricos en **AG** poliinsaturados en la ración. Los mecanismos por los cuales los aceites vegetales permiten alcanzar estas dos metas son diversos y dependen de su composición de **AG**.

**Palabras clave:** ácido linoleico conjugado (**ALC**), biohidrogenación (**BH**), emisión, inclusión, metano (**CH<sub>4</sub>**)

## Abstract

Methane (**CH<sub>4</sub>**), a global warming effect gas is a fermentation product of the diet in ruminants in the digestive tract and represents 47.5% of the emissions of green house gases in Colombian livestock sector. In recent decades, in animal production some compounds present in the fat of milk and meat of ruminants with biological activity such as trans-vaccenic acid (**18:1<sub>t11</sub>**) and conjugated linoleic acid (**18:2<sub>c9 t11</sub> CLA**) have been identified. It is well known that the diet is the main factor that affects ruminal fermentation, and the inclusion of oils rich in medium chain saturated **FA** in the diet of dairy cattle can reduce **CH<sub>4</sub>** production as well as increase the proportions of **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> CLA** in milk with the use of oils rich in polyunsaturated **FA** in the ration. The mechanisms by which vegetable oils make these two goals possible are different and depend on its **FA** profile.

**Key words:** conjugated linoleic acid (**CLA**), biohydrogenation (**BH**), emission, inclusion, methane (**CH<sub>4</sub>**)

## Abreviaturas

**AG:** ácido graso. **AGV's:** ácidos grasos volátiles. **ALC:** ácido linoleico conjugado. **BH:** biohidrogenación. **FDN:** fibra en detergente neutro. **MOD:** materia orgánica degradada. **MS:** materia seca. **MSD:** materia seca degradada. **TMR:** dietas totalmente mezcladas.

## 1.1 Introducción

El metano (**CH<sub>4</sub>**) producido por los rumiantes representa cerca del 47.5% de las emisiones de gases de efecto invernadero del sector agropecuario colombiano (IDEAM, 2007). Este gas representa una pérdida energética entre 2% y 15% de la energía bruta consumida por el animal (Johnson y Johnson, 1995) la depende de la composición de la dieta.

La inclusión de lípidos en la dieta de rumiantes modifica el perfil de ácidos grasos (**AG**) de la leche y de la carne y reduce la producción de **CH<sub>4</sub>**, dependiendo de la composición de **AG** de los lípidos suplementarios (Machmüller, *et al.*, 2006; Beauchemin, *et al.*, 2008; Patra, 2014; Stoffel, *et al.*, 2015). Aceites vegetales ricos en **AG** poliinsaturados de cadena larga como el linoleico (**18:2<sub>c9 c12</sub>**) y el linolénico (**18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**) pueden generar mayores niveles de ácido ruménico (**18:2<sub>c9 t11 ALC</sub>**) en la leche (Harvatine y Bauman, 2006; Stoffel, *et al.*, 2015) y disminuir la producción de **CH<sub>4</sub>** (Yabuuchi, *et al.*, 2006; Beauchemin, *et al.*, 2007; Jouany, *et al.*, 2008). Aceites ricos en **AG** de cadena media (coco y palmiste), aumentan las concentraciones de los ácidos láurico (**12:0**) y mirístico (**14:0**) en leche (Storry, *et al.*, 1971; Hermansen, 1995; Hristov, *et al.*, 2009) y disminuyen la producción de **CH<sub>4</sub>** (Beauchemin, *et al.*, 2008; Zeits, *et al.*, 2013). En esta revisión, se describe el efecto de la adición de lípidos a la dieta sobre la fermentación ruminal, los mecanismos por los cuales disminuyen la producción de **CH<sub>4</sub>** y modifican el perfil de **AG** de la leche.

## 1.2 Lípidos en la alimentación animal

La adición de lípidos a la dieta de rumiantes se ha empleado para aumentar la densidad energética (Palmquist y Jenkins, 1980; Palmquist, 1996; Cullens, *et al.*, 2004; Staples y Cullens, 2005), disminuir la producción de **CH<sub>4</sub>** (Martín, *et al.*, 2010; Hook, *et al.*, 2010; Patra, 2014), modificar el perfil de **AG** de los productos (Palmquist, 1996; Collomb, *et al.*, 2004a; Khanal, *et al.*, 2008; Stoffel, *et al.*, 2015) y aumentar la productividad animal (Palmquist, 1996; Schröder, *et al.*, 2004; Cullens, *et al.*, 2004; Staples y Cullens, 2005; Homerosky, 2007). El efecto de los lípidos sobre la fermentación ruminal y el perfil de **AG** de la leche depende del nivel de aporte y perfil de **AG** de las grasas o aceites y del tipo de suplementación utilizada (grasas protegidas, semillas de oleaginosas, aceites) (Palmquist 1996; Hristov, *et al.*, 2009; Stoffel, *et al.*, 2015).

El uso de lípidos o grasas crudas en la alimentación de vacas lecheras (pastoreo o dietas totalmente mezcladas -**TMR**- por su sigla en inglés) entre un 3-7% de inclusión puede disminuir la concentración de grasa láctea, la digestibilidad de la dieta, poblaciones ruminales totales y específicas, el consumo y el volumen de leche (Palmquist, 1996; Doreau, *et al.*, 1993; Jordan, *et al.*, 2006; Homerosky, 2007). A mayor grado de insaturación de las grasas, los efectos negativos pueden ser mayores (Palmquist, 1996; Rabiee, *et al.*, 2012). Se ha reportado un aumento de 1.1 kg/d de leche por unidad de grasa suplementada en **TMR** (Rabiee, *et al.*, 2012) y 1 kg/d de leche corregida por energía en sistemas en pastoreo (Schröder, *et al.*, 2004). Las inclusiones no deben superar el 5-6% del total de la dieta (Palmquist, 1996; NRC, 2001; Schröder, *et al.*, 2004).

Al adicionar lípidos insaturados a la ración de vacas lecheras se puede disminuir la concentración de la grasa láctea hasta un 30% en dietas de vacas lecheras (Garnsworthy, 1997; Bauman y Griinari, 2000; Bauman y Griinari, 2001; Chilliard, *et al.*, 2001). La inclusión de dichas fuentes afecta la degradación de la fibra, disminuyendo las proporciones molares de los **AG** volátiles (**AGV's**) acético y butírico, precursores de la síntesis *de novo* de **AG** en la glándula mamaria (Schröder, *et al.*, 2004). En dietas deficitarias en grasa, se reportan aumentos de 0.3 unidades porcentuales de grasa láctea con el uso de aceites de palma y coco respecto a un tratamiento control (3.99, 3.97 y 3.63% respectivamente) en vacas en dietas **TMR** (Storry, *et al.*, 1967). Estos autores concluyen que bajas proporciones de grasa en la dieta de vacas lecheras generan menores porcentajes y producciones de grasa en leche, y que la síntesis y producción de esta se incrementa cuando la grasa de la dieta aumenta.

### 1.3 Producción entérica de **CH<sub>4</sub>**

La producción entérica de **CH<sub>4</sub>** es el resultado de la fermentación anaeróbica de los componentes del alimento. Los microorganismos del rumen degradan las proteínas y carbohidratos de la dieta a aminoácidos y azúcares respectivamente. Estas moléculas simples son posteriormente convertidas a **AGV's** (acetato, propionato y butirato), **CH<sub>4</sub>**, **CO<sub>2</sub>** e **H<sup>+</sup>** (tabla 1.1). El **CH<sub>4</sub>** es producido principalmente en el rumen (87%) y una menor proporción (13%) en el intestino grueso (Torrent y Johnson, 1994; Van Soest, 1994)

El  $\text{CH}_4$  es sintetizado por las archaeas metanogénicas (Moss, *et al.*, 2000; Martin, *et al.*, 2010) que se encuentran asociadas a las partículas del alimento, a la superficie de los protozoarios ó en el interior de los mismos (Boadi, *et al.*, 2004). Por medio de una relación simbiótica entre las archaeas metanógenicas y los protozoarios se puede generar hasta un 37% de la producción total de  $\text{CH}_4$  en el rumen (Finlay, *et al.*, 1994).

**Tabla 1.1** Productos de la fermentación ruminal (Beauchemin, *et al.*, 2008)

Sustrato	Producto
Carbohidratos	Glucosa
Glucosa + $2\text{H}_2\text{O}$	Acetato ( $\text{C}_2$ ) + $2\text{CO}_2$ + $8\text{H}^+$
Glucosa + $4\text{H}^+$	Propionato ( $\text{C}_3$ ) + $2\text{H}_2\text{O}$
Glucosa	Butirato ( $\text{C}_4$ ) + $2\text{CO}_2$ + $4\text{H}^+$
$\text{CO}_2$ + $8\text{H}^+$	$\text{CH}_4$ + $2\text{H}_2\text{O}$

Los hidrógenos provenientes de la fermentación ruminal pueden ser utilizados para la síntesis de propionato o de  $\text{CH}_4$ , por esta razón la proporción de estos compuestos en el rumen es inversa.

La cantidad de  $\text{CH}_4$  se puede estimar a partir de las proporciones molares de **AGV's** (Moss, *et al.*, 2000; Ramin y Huhtanen, 2012). Los autores indican que las proporciones molares de **AGV's** afectan la cantidad de  $\text{CH}_4$  producido, que los procesos de producción de acetato y butirato favorecen la producción de  $\text{CH}_4$  ya que aportan iones  $\text{H}^+$  para su síntesis, y que la producción de propionato usa  $\text{H}^+$  compitiendo con la síntesis de  $\text{CH}_4$  (tabla 1.2).

**Tabla 1.2** Estimación de la producción de  $\text{CH}_4$

$\text{CH}_4_{(ml)} = 0.45 \text{C}_2 - 0.275 \text{C}_3 + 0.40 \text{C}_4$ (Moss, <i>et al.</i> , 2000)
$\text{CH}_4_{(ml)} = 22.4 \times (0.5 \times \text{C}_2 - 0.25 \times \text{C}_3 + 0.50 \times \text{C}_4 - 0.25 \times \text{C}_5)$ (Ramin y Huhtanen, 2012)

## 1.4 Lípidos y producción de $\text{CH}_4$

Las relaciones que se establecen entre los microorganismos ruminales, el tipo de fermentación en el rumen y la cantidad de sustrato fermentable son fundamentales para el desarrollo de estrategias que permitan mitigar la producción de  $\text{CH}_4$  (Hook, *et al.*, 2010).

Se han sugerido diferentes mecanismos asociados que explican la disminución del **CH<sub>4</sub>** con la inclusión de lípidos en la dieta como son: recubrimiento de los lípidos a las partículas de fibra que impiden el ataque enzimático por parte de los microorganismos (Palmquist, 1984; Dohme, *et al.*, 2000); efectos tóxicos sobre algunas poblaciones de microorganismos (Nagaraja, *et al.*, 1997; Machmüller, *et al.*, 2003; Machmüller, *et al.*, 2006; Maia, *et al.*, 2006; Margarida, *et al.*, 2007; Yang, *et al.*, 2009; Patra y Yu, 2013) y modificaciones de la fermentación ruminal debidas a cambios en las poblaciones microbianas (Yabuuchi, *et al.*, 2006; Martin, *et al.*, 2010).

El efecto de la inclusión de lípidos en la dieta de rumiantes sobre parámetros de fermentación ruminal ha sido documentado tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* (Beauchemin, *et al.*, 2008; Hook, *et al.*, 2010; Afshar y Naser, 2011; Patra, 2014). Se sugiere que el nivel de suplementación lipídica es inversamente proporcional a la producción de **CH<sub>4</sub>** (Martin, *et al.*, 2010). Se ha reportado que por cada unidad porcentual de lípido suplementada del total de materia seca (**MS**) el volumen de **CH<sub>4</sub>** disminuye en 2.2 unidades porcentuales (Giger-Reverdin, *et al.*, 2003; Eugene, *et al.*, 2008) En vacas y ovejas se han reportado reducciones del 5.6% y de 4.3% de **CH<sub>4</sub>** por unidad porcentual de lípido suplementada en la ración (Beauchemin, *et al.*, 2008; Patra, 2013; Patra, 2014).

### 1.4.1 Suplementación con aceites

#### **Ensayos *in vitro***

- Aceites de coco, palmiste ó canola (53 g/kg de **MS**) disminuyeron la producción de **CH<sub>4</sub>** (mmol g/ materia orgánica degradada **-MOD-**) en un 33, 24 y 4%. La menor producción de **CH<sub>4</sub>** se explicó por una disminución en las archaeas y los protozoarios y a una menor degradación de la **FDN** (52, 37 y 16% para palmiste, coco o canola respectivamente) (Dohme, *et al.*, 2000).
- Aceites de canola, hígado de bacalao o coco disminuyeron la producción **CH<sub>4</sub>** (mmol/ g materia seca degradada **-MSD**) en 27, 30 y 59% para un heno de trigo y pasto y 45, 57 y 85% para un concentrado. La degradación de la **MS** y la **FDN** disminuyeron 21 y 30 puntos porcentuales con el uso de aceite de coco en el sustrato fibroso (Dong, *et al.*, 1997).

**Tabla 1.3** Efecto antimetanogénico de los lípidos

<b>Mecanismo</b>	<b>Efecto</b>	<b>Aceite vegetal</b>	<b>AG mayor</b>
Sustitución de carbohidratos por lípidos	Disminución de la fermentación de la materia orgánica <sup>1,2</sup>	Todos	-
Efecto antimicrobiano	Reducción de archaeas metanogénicas y protozoarios <sup>3, 4, 5, 6, 7</sup>	Coco	<b>12:0 - 14:0</b>
		Linaza	<b>18:2<sub>c9 c12 c15</sub></b>
	Soya, maíz, girasol	<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	
	Disminución de microorganismos ruminales <sup>4, 5, 6, 7</sup>	Coco	<b>12:0 - 14:0</b>
Cambios en la fermentación ruminal	Disminución de bacterias degradadoras de fibra <sup>8, 9, 10</sup>	Linaza	<b>18:2<sub>c9 c12 c15</sub></b>
		Soya, maíz, girasol	<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>
	Aumento de la producción de propionato <sup>11, 12</sup>	Coco	<b>12:0 - 14:0</b>
		Linaza	<b>18:2<sub>c9 c12 c15</sub></b>
<b>BH de AG<sup>1,13</sup></b>		Soya, Maíz	<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>
		Linaza	<b>18:2<sub>c9 c12 c15</sub></b>
		Soya, maíz, girasol	<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>

<sup>1</sup>Hook, *et al.*, 2010; <sup>2</sup>Martin, *et al.*, 2010; <sup>3</sup>Beauchemin, *et al.*, 2008; <sup>4</sup>Soliva, *et al.*, 2003; <sup>5</sup>Machmüller, *et al.*, 2006; <sup>6</sup>Dong, *et al.*, 1997; <sup>7</sup>Palmquist y Jenkins, 1980; <sup>8</sup>McGinn, *et al.*, 2004; <sup>9</sup>Beauchemin, *et al.*, 2007; <sup>10</sup>Patra y Yu, 2013; <sup>11</sup>Boadi, *et al.*, 2004; <sup>12</sup>Yabuuchi, *et al.*, 2006; <sup>13</sup>Ellis, *et al.*, 2008

- Aceite de coco, semillas de colza, girasol o linaza disminuyeron la producción de **CH<sub>4</sub>** por unidad **MOD** en 46, 18, 25 y 22% respectivamente (Machmüller, *et al.*, 1998).
- Inclusiones crecientes de aceites de coco o de pescado disminuyeron linealmente la producción de **CH<sub>4</sub>**, degradación de **MS**, **FDN** y cuadráticamente las poblaciones ruminales (Patra y Yu, 2013).
- El aceite de coco disminuyó 7 puntos porcentuales los gases de fermentación con respecto a aceites de palma, soya o palmiste. El aceite de palmiste a pesar de tener un perfil de **AG** similar al de coco (altos niveles de **12:0** y **14:0**) no generó el mismo efecto, pero disminuyó la producción total de **CH<sub>4</sub>**, (10% con los dos

aceites). Aceites de palmiste y coco favorecen la fermentación propiónica, con una subsecuente disminución de la producción **CH<sub>4</sub>** (Yabuuchi, *et al.*, 2006).

- La adición de los **AG 12:0** y **14:0** y sus mezclas en distintas proporciones disminuyeron la producción de **CH<sub>4</sub>** y el conteo de archaeas. El **12:0** puro generó la mayor disminución de **CH<sub>4</sub>** (96%) y de conteo de microorganismos, el **14:0** puro no afectó los parámetros evaluados (Soliva, *et al.*, 2003).
- En su revisión, Martin, *et ál.*, (2010) reportaron que la adición en la dieta de aceites vegetales ricos en **AG** poliinsaturados tales como el **18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** disminuye la producción de **CH<sub>4</sub>**, en un 4.1% y un 4.8% respectivamente por unidad porcentual de aceite suplementada.
- En la comparación de aceites ricos en **AG** poliinsaturados, recursos ricos en **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** han mostrado mayor potencial antimetanogénico que aquellos ricos en ácido **18:2<sub>c9 c12</sub>** (Jouany, *et al.*, 2008).

### **Ensayos in vivo**

- El aceite de coco al 5.6% de la dieta de corderos disminuyó la producción de **CH<sub>4</sub>** un 26% comparado a un control sin adición de aceites y 19, 27 y 10% respecto a las semillas de colza, girasol y linaza (Machmüller, *et al.*, 2000)
- La inclusión de ácido mirístico (**14:0**) a 5% en la dieta de vacas lecheras en un sistemas de alimentación con raciones totalmente mezcladas (**TMR** por sus siglas en inglés) genera disminuciones de 36% de las emisiones totales de **CH<sub>4</sub>** (Odongo, *et al.*, 2007).
- Aceite de linaza al 8% en una dieta de vacas lecheras basada en forraje disminuyó el consumo de **MS** un 26% y de la digestibilidad de la **FDN** en 12%. La producción de **CH<sub>4</sub>** (g/kg de **FDN** degradada) se redujo en 57% (Martin, *et al.*, 2008).
- En novillos, el aceite de soya a un 6% de la dieta con 90% de concentrado redujo 37% la producción de **CH<sub>4</sub>**, sin efectos sobre el consumo de materia seca (Jordan, *et al.*, 2006).
- El sebo o aceite de girasol a un 3.4% de la dieta redujeron las emisiones de **CH<sub>4</sub>** (kg/kg de **MSD**) un 11% en novillas Angus (Beauchemin, *et al.*, 2007).
- Aceites de soya, linaza o una mezcla 50:50 de estos aceites a un 4% de la dieta de vacas lecheras disminuyeron el conteo de las bacterias degradadoras de la

fibra y los protozoarios respecto a la dieta control sin grasa ( $3.25 \times 10^8$  vs  $4.66 \times 10^8$  **UFC**/ml, y  $9.04 \times 10^4$  vs  $12.92 \times 10^4$  células/ml, respectivamente); el aceite de linaza tuvo el mayor efecto sobre las principales bacterias fibrolíticas en el licor ruminal (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens*) (Yang, *et al.*, 2009).

El efecto reductor en la producción de **CH<sub>4</sub>** de los lípidos depende de su composición, ya que los distintos **AG** disminuyen la producción de **CH<sub>4</sub>** por mecanismos particulares. Como se puede observar, la inclusión de lípidos en sistemas *in vitro* e *in vivo* genera una disminución sensible en la producción de **CH<sub>4</sub>**, siendo que las mayores reducciones se encuentran asociadas a un mayor nivel de inclusión en la ración y a una mayor proporción de **AG** saturados de cadena media en los lípidos suplementarios.

## 1.5 Lípidos y salud humana

El uso de aceites vegetales como el de coco y palmiste en la alimentación animal podría tener un efecto negativo sobre la calidad de la leche en lo que respecta a la composición de **AG** y por lo tanto a su valor saludable. El consumo elevado de estos recursos favorece la aparición de los ácidos **12:0** y **14:0** en leche (Storry, *et al.*, 1971; Hermansen, 1995; Hristov, *et al.*, 2009). Estos **AG** están relacionados con problemas de salud humana (Ulbricht y Southgate, 1991) como el aumento del colesterol sanguíneo (Grundy, 1994; Mensink, *et al.*, 2003), riesgo de infarto (Khromhout, *et al.*, 1995) e incremento de desordenes de tipo aterosclerótico (Nicolosi, *et al.*, 1997). El incremento de los **AG 12:0**, **14:0** y **16:0** en la leche de vaca se debe a la transferencia de estos compuestos desde el alimento, y su incremento en la grasa láctea está relacionado positivamente con el aumento de la inclusión y suplementación de lípidos que los contienen (Storry, *et al.*, 1967; Hermahansen, 1995; Hristov, *et al.*, 2009)

En contraste, la inclusión de fuentes lipídicas ricas en **AG** poliinsaturados pueden generar perfiles de composición de **AG** en la grasa láctea que resultan más benéficos para la salud humana. En efecto, el metabolismo ruminal y en glándula mamaria de dichos **AG** favorecen la producción de compuestos biológicos con promisorios efectos saludables como los ácidos transvaccénico (**18:1<sub>t11</sub>**) y el isómero **18:2<sub>c9 t11</sub>** del **ALC** en leche (Kelly, *et al.*, 1998; Dhiman, *et al.*, 2000; Harvatine y Bauman, 2006; Collomb, *et al.*, 2006). Estos

**AG** han sido catalogados como funcionales por tener efectos anticarcinogénicos, antidiabetogénicos, potenciadores del sistema cardiovascular, inmune y mejoradores del sistema óseo (Parodi, 1977; Banni y Martin, 1998; Belury, 1995; Houseknecht, *et al.*, 1998; Pariza y Hargreaves, 1985; Sebedio, *et al.*, 1999; Akahoshi, *et al.*, 2004; Lim, *et al.*, 2014).

**Tabla 1.4** Efecto de distintos **AG** sobre salud humana (Williams, 2000; Fontecha, *et al.*, 2009)

<b>AG</b>	<b>Efecto</b>	<b>Acción</b>
<b>4:0</b>		
<b>6:0</b>	Inerte	-
<b>8:0</b>		
<b>10:0</b>		
<b>12:0</b>	Negativo	Cambio en la relación colesterol sanguíneo/HDL
<b>14:0</b>	Negativo	
<b>16:0</b>	Negativo	
<b>18:0</b>	Inerte	-
<b>18:1<sub>c9</sub></b>	Positivo	Colesterol sanguíneo
<b>18:1<sub>t11</sub></b>	Positivo	Múltiples
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	Positivo	Efectos sobre salud cardiovascular, sistema inmune
<b>18:2<sub>c9 c12 c15</sub></b>	Positivo	
<b>18:2<sub>c9 t11</sub></b>	Positivo	Múltiples
<b>18:2<sub>t10 c12</sub></b>	Positivo	

## 1.6 Biosíntesis de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC**

Los isómeros de ácido linoleico conjugado (**ALC**) son isómeros geométricos y posicionales del **18:2<sub>c9 c12</sub>** que se encuentran en mayores concentraciones en alimentos provenientes de animales rumiantes (carne y leche). Del total de isómeros de **ALC**, existen dos de ellos que han sido ampliamente reconocidos como moléculas de importante actividad biológica: el **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC**, el cual se encuentra en alta proporción en productos lácteos y cárnicos provenientes de rumiantes y el **18:2<sub>t10 c12</sub>**, isómero predominante en los suplementos comerciales de **ALC** y que aumenta en los productos provenientes de sistemas donde la alimentación de los rumiantes es rica en granos (Bauman y Griinari, 2000; Bauman y Griinari, 2001).

El **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** presente en la leche y carne de rumiantes proviene principalmente de: la **BH** ruminal incompleta de los **AG 18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** (mayoritarios en los forrajes) y la conversión endógena del **18:1<sub>t11</sub>** por acción de la enzima  $\Delta^9$ -desaturasa en la glándula mamaria y tejido adiposo (Chin, *et al.*, 1992; Griinari, *et al.*, 2000) (Figura 1.1). Los microorganismos ruminales transforman los lípidos dietarios por medio de la lipólisis y la **BH** por acción de lipasas, fosfolipasas y galactosidasas producidas por bacterias y protozoarios (Jensen, 2002; Moate, *et al.*, 2008; Doreau y Chilliard, 1997), produciendo galactosa, **AG** libres y glicerol (Jenkins, *et al.*, 2008).

En la **BH** de los **AG 18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** intervienen una serie de bacterias que actúan de acuerdo al sustrato que utilizan durante dicho proceso. El grupo A que tiene la capacidad de hidrogenar los **AG** poliinsaturados a **18:1<sub>t11</sub>** (Vlaeminck, *et al.*, 2008) y **18:1<sub>c9</sub>** (Jenkins, *et al.*, 2008) y el grupo B que hidrogena el ácido **18:1<sub>t11</sub>** a esteárico (**18:0**) y el **18:2<sub>t11 c15</sub> ALC** a **18:1<sub>t11</sub>** o **18:1<sub>c15</sub>** (Vlaeminck, *et al.*, 2008). En la **BH**, se produce inicialmente una isomerización que origina varios compuestos cis y trans, entre los cuales se encuentra el **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** y el **18:1<sub>t11</sub>** (Doreau y Chilliard, 1997; Ribeiro, *et al.*, 2007), principal precursor de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en tejido adiposo y glándula mamaria.

La **BH** del **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** consiste en la isomerización del enlace c12 a la posición t11 o t13 (Jenkins, *et al.*, 2008), generando el compuesto **18:3<sub>c9 t11 c15</sub>** (Rojas, *et al.*, 2005); posteriormente uno de los dobles enlaces es saturado para producir un **18:2<sub>t11 c15</sub> ALC**, seguido de otra hidrogenación, produciendo un isómero del **18:2** (Jenkins, *et al.*, 2008) el **18:2<sub>t11 cis15</sub> ALC** (Rojas, *et al.*, 2005) o el **18:2<sub>t13 c15</sub> ALC**, el cual es completamente saturado para producir **18:0** como producto final (Jenkins, *et al.*, 2008). La principal vía de **BH** del **18:2<sub>c9 c12</sub>** consiste en la isomerización inicial para producir **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC**, el cual es biohidrogenado para producir ácido **18:1<sub>t11</sub>** para finalmente ser transformado a **18:0** (Moate, *et al.*, 2008). El **18:1<sub>t11</sub>** se constituye en un intermediario común de la **BH** incompleta de los **18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**, siendo el más importante de los isómeros **18:1** (Doreau y Chilliard, 1997).



y de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en leche (Collomb, *et al.*, 2006). Sin embargo, Lock y Gansworthy, (2002) encontraron que la suplementación de aceites de soya, oliva, linaza, girasol o semillas de colza generan proporciones similares de **18:2<sub>c9 t11</sub>** en leche para los aceites ricos en **18:2<sub>c9 c12</sub>** (girasol, soya y maíz) y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** (linaza).

### 1.7.1 Suplementación con aceites

#### **Ensayos in vivo**

- El suministro de aceite de girasol (53 g/kg de **MS** de la dieta) por 14 días en vacas lecheras generó una concentración de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en leche de 24.4 mg/g grasa, lo cual es significativamente superior a lo obtenido con inclusiones similares de aceites de linaza y maní (16.7 y 13.3 mg/g grasa respectivamente) (Kelly, *et al.*, 1998).
- El uso de semillas de oleaginosas como colza, girasol, y linaza produjo un incremento en la proporción de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** (g/100 g de **AG**) de 280% con la suplementación de 1.4 kg de semilla de girasol (15.46), 83% con 1 kg de semilla de girasol (7.46), 34% con 1 kg de semilla de colza (5.47), 81% con 1.4 kg de semilla de linaza (7.37) y 19% con 1 kg de semilla de linaza (4.85) respecto a una dieta control (4.07) (Collomb, *et al.*, 2004a; Collomb, *et al.*, 2004b).
- La sustitución parcial de grano de maíz y torta de soya por distintas fuentes de **AG** poliinsaturados (18% de soya cruda partida, 18% de soya tostada partida, 3.6% de aceite de soya, 2.2% de aceite de linaza y 4.4% de aceite de linaza) generó mayores niveles **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** respecto a una dieta control sin aceite. Las proporciones de **ALC** (g/ 100 g de **AG** día) fueron de 16.9, 16.5, 12.5, 3.8, 8.1 y 4.0 con aceite de soya, aceite de linaza al 2.2 y 4.4%, soya cruda partida, soya tostada partida y control respectivamente (Dhiman, *et al.*, 2000).
- La sustitución parcial del grano de maíz por aceite de soya (al 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0%) y aceite de linaza (al 1%) en una dieta control produjo concentraciones de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** (g/ 100 g de **AG** día) de 4.8 en la dieta control, 7.1, 8.5, 13.8 y 18.1 en las adiciones 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 de aceite de soya, y 7.5 en la suplementación de aceite de linaza en la grasa de leche bovina (Dhiman, *et al.*, 2000).

- Los aceites de maíz y girasol y su mezcla en una proporción 50:50 generaron mayores proporciones de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** respecto a otras suplementaciones (sales de calcio de aceite de palma, aceite de palma puro y aceite de girasol rico en **AG** oleico) y a un tratamiento control, con niveles hasta un 70% superiores (Stoffel, *et al.*, 2015).
- Aceite de maíz puro, una mezcla (50:50) de aceites de soya y linaza o aceite de linaza puro generaron concentraciones (g/100 g de **AG**) de 6.19, 3.04 y 4.53 para el **18:1<sub>t11</sub>** y de 2.39, 1.60 y 1.81 para el **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** respectivamente. El tratamiento control sin adición de aceite tuvo niveles de 1.48 y 0.64 para el **18:1<sub>t11</sub>** y el **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** respectivamente (Bu, *et al.*, 2007).
- La adición de aceite de maíz, linaza, palma, colza (rico en **18:1<sub>c9</sub>**) o colza modificada genéticamente (rico en **18:2<sub>c9 c12</sub>**) generó producciones (g/d) de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** de 33.93, 23.98, 16.25, 19.93 y 35.88 respectivamente. El tratamiento control generó una producción de 11.27 (He y Armentano, 2011).
- En ovejas, el reemplazo del concentrado con aceites vegetales de girasol ó linaza (260 y 300 g respectivamente) generó proporciones (g/ kg de **AG**) de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** e isómeros de **ALC** en leche para el aceite de girasol de 23 y 25 y para el aceite de linaza de 15 y 17 respectivamente. El control sin adición de grasa produjo proporciones de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** e isómeros de **ALC** de 10 y 11 respectivamente (Zhang, *et al.*, 2006).
- Aceites de girasol, soya o canola al 3% de la dieta de cabras Saanen generaron niveles de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en leche (g/100 g grasa) de 1.10, 0.92 y 0.84 respectivamente (Matsushita, *et al.*, 2007).
- La inclusión de 5% aceite de girasol, linaza, pescado a una dieta alta en concentrado de vacas lecheras generó flujos al duodeno de la sumatoria de los **AG** cis y trans **18:1** (g/d) de 322.6, 364.9 y 258.4 (Loor, *et al.*, 2005).

### **Ensayos in vitro**

- La adición de los **AG 18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** y sus mezclas en distintas proporciones (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 y 0:100) generó una mayor acumulación de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en fluido ruminal comparado a un control sin adición de

aceite. Se presentaron mayores tasas de acumulación de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** para el **18:2<sub>c9 c12</sub>** comparado al **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** (Castillo, 2012).

- La adición de **18:2<sub>c9 c12</sub>** produjo el doble de **18:1<sub>t11</sub>** y de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** comparada a la de **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** (AbuGhazaleh y Jacobson, 2007).
- En contradicción a lo anterior, Jouany, *et ál.*, (2007) encontraron que la inclusión de **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** produjo cerca de cuatro veces más ácido **18:1<sub>t11</sub>** que la de **18:2<sub>c9 c12</sub>**, concluyendo que las rutas de **BH** del **18:2<sub>c9 c12 c15</sub>** fueron menos diversas, representando la sumatoria de los **AG 18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** hasta un 75% de los intermediarios totales y en el caso del **18:2<sub>c9 c12</sub>** un 50%

El efecto de la suplementación de aceites vegetales sobre la producción de los **AG 18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* depende del perfil de **AG** de las fuentes suplementadas. Las mayores concentraciones de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** se producen cuando se suplementan aceites ricos en **18:2<sub>c9 c12</sub>** comparado con otros aceites ricos en otros **AG** (**18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**, **18:1<sub>c9</sub>**, **16:0**, entre otros). Sin embargo, algunos autores han reportado efectos similares con las suplementaciones de alimentos o fuentes ricas en **18:2<sub>c9 c12</sub>** o **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** sobre la producción de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub>**.

## 1.8 Conclusiones

Tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* la inclusión de aceites o semillas de oleaginosas en la dieta de los rumiantes o al sustrato modifica la fermentación ruminal y los efectos resultan dependientes de la proporción de los diferentes **AG** constitutivos. Aceites ricos en **AG** poliinsaturados (soya, girasol, linaza, colza) disminuyen la producción de **CH<sub>4</sub>** en el rumen aunque en menor proporción que los aceites con altas proporciones de **AG** saturados de cadena media **12:0** y **14:0** (aceite de coco y palmiste). Aceites ricos en **AG** poliinsaturados en la dieta aumentan la proporción de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la leche y la carne de rumiantes. Los alimentos con altos niveles de **18:2<sub>c9 c12</sub>** (girasol, maíz y soya) aumentan el contenido de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en leche comparados a otros aceites con altas concentraciones de **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** (linaza) y **18:1<sub>c9</sub>** (maní y colza).

## 1.9 Referencias bibliográficas

ABUGHAZALEH, A.A. y JENKINS, T.C. 2004. Disappearance of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids from cultures of mixed ruminal microorganisms. *J Dairy Sci.* 87(3):645-651.

ABUGHAZALEH, A.A. y JACOBSON, B.N. 2007. The effect of pH and polyunsaturated C18 fatty acid source on the production of vaccenic acid and conjugated linoleic acids in ruminal cultures incubated with docosahexaenoic acid. *Anim Feed Sci Technol.* 136(1-2):11-22.

AFSHAR, M.A. y NASER, M.S. 2011. Factors affecting mitigation of methane emission from ruminants. I: Feeding strategies. *Asian J Anim Vet Adv.* 6(9): 888-908.

AKAHOSHI, A.; GOTO, Y.; MURAO, K.; MIYAZAKI, T.; YAMASAKI, M.; NONAKA, M.; YAMADA, K. y SUGANO, M. 2002. Conjugated linoleic acid reduces body fats and cytokine levels of mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66(4):916-920.

BANNI, S. y MARTIN, J.C. 1998. Conjugated linoleic acid and metabolites en: *Trans Fatty Acids in Human Nutrition*, Sebedio, J.J y Christie, W.W. (Eds). Oily Press, Dundee, Scotland. Págs 261-302.

BAUMAN, D.E. y GRINARI, J.M. 2000. Regulation and nutritional manipulation of milk fat. Low-fat milk syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 480:209-216.

BAUMAN, D.E. y GRINARI, J.M. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest Prod Sci.* 70(1-2):15-29.

BAUMAN, D. E.; PERFIELD, J. W. II.; HARVATINE, K. J. y BAUMGARD, L. H. 2008. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: lactation and the ruminant model. *J Nutr.* 138(2):403-409.

BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M. y PETIT, H. 2007. Methane abatement strategies for cattle: lipid supplementation of diets. *Can J Anim Sci* 87(3):431-440.

BEAUCHEMIN, K.A.; KREUZER, M.; O'MARA, F. y McALLISTER, T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust J Exp Agri.* 48(2): 21-27.

BELURY, M.A. 1995. Conjugated dienoic linoleate: A polyunsaturated fatty acid with unique chemoprotective properties. *Nutr Rev.* 53(4 pt 1):83-89.

BOADI, D.; BENCHAAAR, C.; CHIQUETTE, J. y MASSÉ, D. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Can J Anim Sci.* 84(3):319-335.

BU, D. P.; WANG, J. Q.; DHIMAN, T. R. y LIU, S. J. 2007. Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *J Dairy Sci.* 90(2):998-1007.

CASTILLO, J.A. 2012. Cinética de biohidrogenación *in vitro* de ácidos grasos poliinsaturados en fluido ruminal. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia – FMVZ.

CHILLIARD, Y.; FERLAT, A. y DOREAU, M. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest Prod Sci.* 70(1-2):31-48.

CHIN, S.F.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; HA, Y.L. y PARIZA, M.W. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Compos Anal.* 5(3):185–197.

COLLOMB, M.; SIEBER, R. y BÜTIKOFER, U. 2004a. CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids.* 39(4):355–364.

COLLOMB, M.; SOLLBERGER, H.; BÜTIKOFER, U.; SIEBER, R.; STOLL, W. y SCHAEREN, W. 2004b. Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. *Int Dairy J.* 14(6):549–559.

COLLOMB, M.; SCHMID, A.; SIEBER, R.; WECHSLER, D. y RYHÄNEN, E.L. 2006. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *Int Dairy J.* 16(11):1347-1361.

CORL, B.A.; BAUMGARD, L.H.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; PHILLIPS, B.S. y BAUMAN, D.E. 2001. The role of  $\Delta 9$ -desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *J Nutr Biochem.* 12(11):622-630.

CULLENS, F.M.; STAPLES, C.R.; BILBY, T.R.; SILVESTRE, F.; BARTOLOME, J.; SOZZI, A.; BADINGA, L.; THATCHER, W.W. y ARTHINGTON, J.D. 2004. Effect of timing of initiation of fat supplementation on milk production, plasma hormones and metabolites, and conception rates of Holstein cows in summer. *J. Dairy Sci.* 2004;87:308 (Abstr.).

DHIMAN, T.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W.; GALLI, M.P.; ALBRIGHT, K. y TOLOSA, M.X. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J Dairy Sci.* 83(5):1016–1027.

DOHME, F.; MACHMÜLLER, A.; WASSERFALLEN, A. y KREUZER, M. 2000. Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. *Can J Anim Sci.* 80(3):473–484.

DONG, Y.; BAE, H.D.; McALLISTER, T.A.; MATHISON, G.W. y CHENG, K.J. 1997. Lipid-induced depression of methane production and digestibility in the artificial rumen system (RUSITEC). *Can J Anim Sci.* 77(2):269-278.

DOREAU, M. y CHILLIARD, Y. 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *Brit J Nutr.* 78(S1):S15-S35.

ELLIS, J.L.; DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E.; BANNINK, A.; ODONGO, N.E.; McBRIDE, B.W. y FRANCE, J. 2008. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. *J Agr Sci.* 146(Special Issue 02):213-233.

EUGENE, M.; MASSE, D.; CHIQUETTE, J. y BENCHAAAR, C. 2008. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Can J Anim Sci.* 88(2) :331-334.

FINLAY, D.J.; ESTEBAN, G.; CLARKE, K.J.; WILLIAMS, A.G.; EMBLEY, T.M. y HIRT, R.P. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogenesis. *FEMS Microbiol Lett.* 117(2): 157-162.

FONTECHA, J.; RECIO, M. y PILOSO, M.A. 2009. Componentes bioactivos de la grasa láctea en Funcionalidad de los componentes lácteos. Juárez M y Fontecha J eds. CEE Limencop, S.L. España. Págs 251-273.

GARNSWORTHY, P.C. 1997. Fats in dairy cow diets. en: Recent Developments in Ruminant Nutrition. Garnsworthy, P.C y Wiseman, J. (Eds.) Nottingham University Press. Págs 87-104.

GIGER-RIVERDIN, S.; MORAND-FEHR, P. y TRAN, G. 2003. Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. *Livest Prod Sci.* 82(1):73-79.

GRIINARI, J.M.; CORL, B.A.; LACY, S.H.; CHOUINARD, P.Y.; NURMELA, K.V. y BAUMAN, D.E. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta 9$ -desaturase. *J Nutr.* 130(9):2285-2291.

GRUNDY, S.M. 1994. Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 60 (Suppl):986S-990S.

HARFOOT, C.G. y HAZLEWOOD, G.P. 1988. Lipid metabolism in the rumen en: The rumen microbial ecosystem. Hobson, N. y Stewart C.S. (Eds.). Blackie Academic and Professional, London, UK. Págs 285-322.

HARVATINE, K.J. Y BAUMAN, D.E. 2006. SREBP1 and thyroid hormone response spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. *J Nutr.* 136(10):2468-2474.

HE, M. y ARMENTANO, L.E. 2001. Effect of fatty acid profile in vegetable oils and antioxidant supplementation on dairy cattle performance and milk fat depression. *J Dairy Sci.* 94(5):2481-2491.

HERMANSEN, J.E. 1995. Prediction of milk fatty acid profile in dairy cows fed dietary fat differing in fatty acid composition. *J Dairy Sci.* 78(4):872-879.

HOMEROSKY, E.R. 2007. Fatty acid digestibility of fat sources feed to dairy cows and effects on concentration of fat in milk. Honors project thesis, The Ohio State University, Department of Animal Science. Págs 1-10.

HOOK, S. E.; WRIGHT A. D. G. y MCBRIDE B.W. 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*. 2010(2010):1-11.

HOUSEKNECHT, K.L.; HEUVEL, J.P.V.; MOYA-CAMARENA. S.Y.; PORTOCARRERO, C.P.; PECK, L.W.; NICKEL, K.P. y BELURY MA. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 244(3):678-682.

HRISTOV, A.N.; VANDER POL, M.; AGLE, M.; ZAMAN, S.; SCHNEIDER, C.; NDEGWA, P.; VADDELLA, V.K.; JOHNSON, K.; SHINGFIELD, K.J. y Karnati, S.K.R. 2009. Effect of lauric acid and coconut oil on ruminal fermentation, digestion, ammonia losses from manure, and milk fatty acid composition in lactating cows. *J Dairy Sci*. 92(11):5561-5582.

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). 2007. Inventario Nacional de gases de efecto invernadero. Segunda comunicación Nacional ante la Convención marco de las Naciones Unidas sobre cambio climático. Cap 2. Inventario Nacional de gases de efecto invernadero. Colombia, Págs 119-152.

JENKINS, T.C.; WALLACE, R.J.; MOATE, P.J. y MOSLEY, E.E. 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J Anim Sci*. 86(2):397-412.

JENSEN, R.G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J Dairy Sci*. 85(2):295-350.

JOHNSON, K.A. y JOHNSON D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci*. 73(8): 2483-2492.

JORDAN, E.; KENNY, D.; HAWKINS, M.; MALONE, R.; LOVETT, D.K. y O'MARA, F.P. 2006. Effect of refined soy oil or whole soybeans on intake, methane output, and performance of young bulls. *J Anim Sci*. 84(9):2418–2425.

JOUANY, J.P.; LASSALAS, B.; DOREAU, M. y GLASSER, F. 2007. Dynamic features of the rumen metabolism of linoleic acid, linolenic acid and linseed oil measured *in vitro*. *Lipids*. 42(4): 351-360.

JOUANY, J.P. ; PAPON, Y. ; MORGAVI, D.P. y DOREAU, M. 2008. Linseed oil and a combination of sunflower oil and malic acid decrease rumen methane emissions *in vitro* en: Livestock and global climate change. Rowlinson, P. M Steele, M. y Nefzaoui, A. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK. Págs 140–143.

KELLY, M.L.; BERRY, J.R.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; CHOUINARD, P.Y.; VAN AMBURGH, M.E. y BAUMAN, D.E. 1998. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J Nutr*. 128(5): 881–885.

KHANAL, R.C.; DHIMAN, T.R. y BOMAN, R.L. 2008. Changes in fatty acid composition of milk from lactating dairy cows during transition to and from pasture. *Livest Sci*. 114(2-3):164-175.

KROMHOUT, D.; MENOTTI, A.; BLOEMBERG, B.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; DONTAS, A.S.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; KARVONEN,

M.; KATAN, M.; NISSINEN, S.; NEDELJKOVIC, J.; PEKKANEN, M.; PEKKARINEN, S.; PUNSAR, S.; RASANEN, L.; SIMIC, B. y TOSHIMA, H. 1995. Dietary saturated and trans-fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med.* 24(3): 308-315.

LIM, J.N.; OH, J.J.; WANG, T.; LEE, J.S.; KIM, S.H.; KIM, Y.J. Y LEE, H.G. 2014. *trans*-11 18:1 Vaccenic Acid (TVA) has a direct anti-carcinogenic effect on MCF-7 human mammary adenocarcinoma cells. *Nutrients*, 6(2):627–636.

LOCK, A.L. y GARNSWORTHY, P.C. 2002. Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Anim Sci.* 74(1):163–176.

LOOR, J.J.; UEDA, K.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. y DOREAU, M. Intestinal flow and digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. *Anim Feed Sci Tech.* 119(3-4):203-225.

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A.; WANNER, M. y KREUZER, M. 1998. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation *in vitro* (Rusitec). *Anim Feed Sci Technol.* 71(1-2):117–130.

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A. y M. KREUZER, M. 2000. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. *Anim Feed Sci Technol.* 85(1-2):41–60.

MACHMÜLLER, A. 2006. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Agric Ecosyst Environ.* 112(2-3):107-114.

MAIA, F.J.; BRANCO, A.F.; MOURO, G.F.; CONEGLIAN, S.M.; SANTOS, G.T.; MINELLA, T.F. y GUIMARÃES, K.C. 2006. Inclusão de fontes de óleo na dieta de cabras em lactação: digestibilidade dos nutrientes e parâmetros ruminais e sanguíneos. *Rev Bras Zootec.* 35(4) 1496-1503.

MARGARIDA, M.R.; CHAUDHARY, L.C.; FIQUERES, L. y WALLACE, R.J. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91(4):303-14.

MARTIN, C.; ROUEL, J.; JOUANY, J.P.; DOREAU, M. y CHILLIARD Y. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *J Anim Sci.* 86(10):2642–2650.

MARTIN C.; MORGAVI D. P. y DOREAU, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* 4(3):351-365.

MATSUSHITA, M.; TAZINAFO, N.; PADRE, R.; OLIVEIRA, C.; SOUZA, N.; VISENTAINER, J.; MACEDO, F. y RIBAS, N. 2007. Fatty acid profile of milk from Saanen goats fed a diet enriched with three vegetable oils. *Small Ruminant Res.* 72(2-3):127-143.

McGINN, S.M.; BEAUCHEMIN K.A.; COATES, T. y COLOMBATO, D. 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast and fumaric acid. *J Anim Sci.* 82(11): 3346-3356.

MENSINK, R.P.; ZOCK, PETER.L.; KESTER, A.D.M and KATAN, M.B. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 77(5): 1146-1155.

MOATE, P.J.; BOSTON, R.C.; JENKINS, T.C. y LEAN, I.J. 2008. Kinetics of ruminal lipolysis of triacylglycerol and biohydrogenation of long-chain fatty acids: new insights from old data. *J Dairy Sci.* 91(2):731-742.

MOSS, A.; JOUANY, J.P. y NEWBOLD, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann Zootech.* 49(3):231-253.

NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J. y DEMEYER, D.I. 1997. Manipulation of ruminal fermentation, en: Rumen Microbial Ecosystem. Hobson, N. y Stewart C.S. (Eds.), Blackie Academic and Professional, London, UK (1997), pp. 523-623

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition. National Academy Press. Washington, D.C., USA. Págs 1-408.

NICOLOSI, R.J.; ROGERS, E.J.; KRITCHEVSKY, D.; SCIMECA, J.A. y HUTH, P.J. 1997. Dietary conjugate linoleic acid reduces plasma lipoprotein and early aortic atherosclerosis in hypercholesteremic hamster. *Artery* 22(5):266-277.

NTAMBI, J.M. 1995. The regulation of stearoyl CoA desaturase (SCD). *Prog Lipid Res.* 34(2):139-150.

ODONGO, N.E.; OR-RASHID, M.M.; KEBREAB, E.; FRANCE, J. y McBRIDE, B.W. 2007. Effect of supplementing myristic acid in dairy cow rations on ruminal methanogenesis and fatty acid profile in milk. *J Dairy Sci.* 90(4):1851-1858.

PALMQUIST, D.L. y JENKINS, T.C. 1980. Fat in lactation rations: review. *J Dairy Sci.* 63(1): 1-14.

PALMQUIST, D.L. 1996. Utilización de lípidos en dietas de rumiantes. XII Curso de especialización FEDNA. Madrid 7-8 noviembre. Págs 39-57.

PARIZA, M.W. y HARGREAVES, W.A. 1985. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthrazene. *Carcinogenesis.* 6(4):591-593.

PARODI, P.W. 1977. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J Dairy Sci.* 60(10):1550-1553.

PATRA, A.K. 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. *Livest Sci.* 155(2-3):244-254.

- PATRA, A.K. 2014. A meta-analysis of the effect of dietary fat on enteric methane production, digestibility and rumen fermentation in sheep, and a comparison of these responses between cattle and sheep. *Livest Sci.* 167:97-103.
- PATRA, A.K. y YU, Z. 2013. Effects of coconut and fish oils on methane production, fermentation, abundance and diversity of rumen microbial populations *in vitro*. *J Dairy Sci.* 96(3):1782–1792.
- RABBIE, A.R.; BREINHILD, K.; SCOTT, W.; GOLDBER, H.M.; BLOCK, E. y LEAN, I.J. 2012. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. *J Dairy Sci.* 95(6):3225-3247.
- RAMIN, M. y HUHTANEN, P. 2012. Development of an *in vitro* method for determination of methane production kinetics using a fully automated *in vitro* gas system - A modelling approach. *Anim Feed Sci Tech.* 174(3-4):190-200.
- RIBEIRO, C.V.; EASTRIDGE, M.L.; FIRKINS, J.L.; ST-PIERRE, N.R. y PALMQUIST, D.L. 2007. Kinetics of fatty acid biohydrogenation *in vitro*. *J Dairy Sci.* 90(3):1405-1416.
- ROJAS, C.I. ; PABON, M.L. y CARULLA, J.E. 2005. Ácido linolénico conjugado (ALC): Factores dietarios que afectan su contenido en la leche. En: Pabón ML y Ossa JL (Eds.) Bioquímica, nutrición y alimentación de la vaca. Medellín. Págs 91-110.
- SCHRÖEDER, G.F.; GAGLIOSTRO, G.A.; BARGO, F.; DELAHOY, J.E. y MULLER, L.D. 2004. Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. *Livest Prod Sci.* 86(1-3):1-18.
- SEBEDIO, J.L.; GNAEDIG, S. y CHARDIGNY, J.M. 1999. Recent advances in conjugated linoleic acid research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2(6):499-506.
- SOLIVA, C.R.; HINDRICHSEN, I.K.; MEILE, L.; KREUZER, M. y MACHMÜLLER, A. 2003. Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis *in vitro*. *Lett Appl Microbiol.* 37:35–39.
- STAPLES, C.R. y CULLENS, F.M. 2005. Implications of fat-feeding practices for lactating dairy cows; Effects on milk fat. *Adv Dairy Technol.* 17:277-295.
- STANTON, C.; MURPHY, J. MCGRATH, E. y DEVERY, R. 2003. Animal feeding strategies for conjugated linoleic acid enrichment of milk en: Sebedio, J.L. Christie, W.W. y Adlof, R (Eds) Advances in conjugated linoleic acid research, Vol. 2, Champaign, IL, USA, AOAC Press. Págs123–145.
- STOFFEL, C.M.; CRUMP, P.M. y ARMENTANO, L.E. 2015. Effect of dietary fatty acid supplements, varying in fatty acid composition, on milk fat secretion in dairy cattle fed diets supplemented to less than 3% total fatty acids. *J Dairy Sci.* 98(1):431-442.
- STORRY, J.E.; ROOK, J.A.F. y HALL, A.J. 1967. The effect of the amount and type of dietary fat on milk fat secretion in the cow. *Br J Nutr* 21(2):425-438.

TORRENT, J. y JOHNSON, D.E. 1994. Methane production in the large intestine of sheep en: Energy metabolism of farm animals. Aguilera JF (Ed). EAAP Publication No. 76. CSIC. Publishing Service. Granada, Spain. Págs 391–394.

ULBRICHT, T. L. V. y SOUTHGATE, D. A. T. 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*. 338(8773):985-992.

VAN SOEST, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2 edition. Cornell University Press. USA. Págs 253-316.

VLAEMINCK, B.; MENGISTU, G.; FIEVEZ, V.; DE JONGE, L.; y DIJKSTRA, J. 2008. Effect of *in vitro* docosahexaenoic acid supplementation to marine algae-adapted and unadapted rumen inoculum on the biohydrogenation of unsaturated fatty acids in freeze-dried grass. *J Dairy Sci*. 91(3):1122-1132.

WILLIAMS, C.M. 2000. Dietary fatty acids and human health. *Ann Zootech*. 49(3):165-180.

YABUUCHI, Y.; MATSUSHITA, Y.; OTSUKA, H.; FUKAMACHI, K. y KOBAYASHI, Y. 2006. Effects of supplemental lauric acid-rich oils in high-grain diet on *in vitro* rumen fermentation. *Anim sci J*. 77(3):300-307.

YANG, S.L.; BU, D.P.; WANG, J.Q.; HU, Z.Y.; LI, D.; WEI, H.Y.; ZHOU, L.Y. y LOOR, J.J. 2009. Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal*. 3(11):1562–1569.

ZEITS, J.O.; BUCHER, S.; ZHOU, X.; MEILE, L.; KREUSER, M. y SOLIVA, C.R. Inhibitory effects of saturated fatty acids on methane production by methanogenic *Archaea*. *J Anim Feed Sci*. 22(1):44-49.

ZHANG, R.H.; MUSTAFA, A.F. y ZHAO, X. 2006. Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. *Anim Feed Sci Technol*. 127(3-4): 220–233.



## 2. Inclusión de aceites de maíz, linaza o palmiste y sus mezclas en un sistema *in vitro*: efectos sobre la fermentación ruminal

### Inclusion of corn, linseed or palm kernel oil and their mixtures in an *in vitro* system: effects on ruminal fermentation

J. Parales<sup>1,2</sup>, M. Pabón<sup>1</sup>, L.A. Giraldo<sup>3</sup>, J. Carulla<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Nutrición Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. E-mail: [jecarullaf@unal.edu.co](mailto:jecarullaf@unal.edu.co)

<sup>2</sup>MSc(c) Salud y Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. E-mail [jeparalesg@unal.edu.co](mailto:jeparalesg@unal.edu.co)

<sup>3</sup>Profesor Titular. Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. [lagirald@unal.edu.co](mailto:lagirald@unal.edu.co)

<sup>4</sup>Profesor Titular. Departamento de Producción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. E-mail: [jecarullaf@unal.edu.co](mailto:jecarullaf@unal.edu.co)

## Resumen

Se determinó el efecto de la inclusión de aceites de maíz (**M**), linaza (**L**) y palmiste (**P**) puros y sus mezclas sobre parámetros de fermentación ruminal en un sistema *in vitro*. Se evaluaron un control sin adición de aceite, los aceites puros y las mezclas **M-L**, **M-P** y **L-P** a las proporciones 75:25, 50:50 y 25:75 para un total de 13 tratamientos. Cincuenta y dos

botellas de vidrio de 100 ml con 350 mg de *Cenchrus clandestinus* y 150 mg de concentrado, con o sin adición de 15 µl de los aceites o sus mezclas fueron incubadas con 50 ml de fluido ruminal y medio de cultivo en una relación 1:4. Las botellas se gasificaron con dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e incubadas en un baño de María a 39° C, con agitación manual cada dos horas. En cada una de las botellas se determinó la degradación de la materia seca (**MS**) y de la fibra en detergente neutro (**FDN**). La producción total de gas, metano ( $\text{CH}_4$ ) y la concentración de  $\text{CH}_4$  se midió con extracciones periódicas entre las 0 y 48 horas. La concentración de ácidos grasos (**AG**) y ácidos grasos volátiles (**AGV**) fue determinada por cromatografía de gases (**CG**). Se empleó un modelo de bloques completamente al azar con contrastes ortogonales para evaluar el efecto de los tratamientos sobre los parámetros de la fermentación *in vitro* y la degradación de la **MS** y la **FDN**. La adición de aceites disminuyó la degradación de la **MS** (%) (**C**: 70.3 vs adición: 67.7;  $p < 0.001$ ), la **FDN** (%) (**C**: 50.3 vs adición: 42.5;  $p < 0.001$ ), la producción total de gas (ml) (**C**: 118.6 vs adición: 109.0;  $p < 0.001$ ), de  $\text{CH}_4$  (ml) (**C**: 36.0 vs adición: 29.1;  $p < 0.001$ ) y el porcentaje de  $\text{CH}_4$  (**C**: 30.3 vs adición: 26.7;  $p < 0.001$ ). Los aceites puros y sus mezclas no generaron respuestas diferentes sobre la mayoría de variables, con excepción de la degradación de la **FDN** (Puros: 41.7 vs mezclas: 42.8;  $p < 0.05$ ). La adición de **P** comparada con **M** y **L** disminuyó la degradación de la **MS** (%) (**P**: 67.8 vs **M** y **L** 63.0;  $p < 0.001$ ), de la **FDN** (%) (**P**: 44.5 vs **M** y **L** 35.9;  $p < 0.001$ ), la producción de gas (ml) (**P**: 116.8 vs **M** y **L** 93.1;  $p < 0.001$ ), la producción de  $\text{CH}_4$  (ml) (**P**: 32.2 vs **M** y **L** 24.1;  $p < 0.001$ ) y la concentración molar de **AGV** (mmol/l) (**P**: 81.65 vs **M** y **L**: 77.7;  $p < 0.01$ ). La adición de **L** generó una mayor degradación de la **FDN** (%) comparado a **M** (42.8 vs 41.7;  $p < 0.05$ ). Las mezclas **M-L** comparadas entre si y las mezclas **M-P** vs **L-P** no generaron respuestas diferentes en las variables evaluadas. Proporciones crecientes de **P** en mezclas con **M** y **L** disminuyeron la degradación de la **MS** y de la **FDN**, la producción de gas y  $\text{CH}_4$ . La adición de aceites en un sistema *in vitro* disminuye la degradación del sustrato y la producción de gases de fermentación. No se presentaron efectos asociativos de las mezclas en la mayoría de las variables evaluadas. La inclusión de **P** en una mezcla de aceites aun en bajas proporciones disminuye la degradación del sustrato y la producción de gases de fermentación.

**Palabras clave:** ácidos grasos (**AG**), adición, degradación, metano ( $\text{CH}_4$ ), producción

## Abstract

The effect of the inclusion of corn oil (**CO**), linseed oil (**LO**), or palm kernel (**PKO**) and their mixtures on ruminal fermentation parameters in a ruminal *in vitro* system was determined. A control without oil addition (**C**), pure oils and their mixtures **CO-LO**, **CO-PKO** and **LO-PKO** in different proportions (75:25, 50:50 and 25:75), for a total of 13 treatments, were evaluated. Fifty-two glass bottles of 100 ml with 350 mg of *Cenchrus clandestinus* and 150 mg of concentrate, with or without the addition of 15 µl of oils or their mixtures were incubated with 50 ml of ruminal fluid and culture media in a 1:4 ratio. The bottles were gasified with carbon dioxide (**CO<sub>2</sub>**) and incubated in a water bath at 39 ° C, with manual agitation every two hours. The degradation of dry matter (**DM**) and the neutral detergent fiber (**NDF**) was determined in each of the bottles. The total production of gas, methane (**CH<sub>4</sub>**) production and **CH<sub>4</sub>** concentration were measured with periodic extractions between 0 and 48 hours. The concentrations of fatty acids (**FA**) and volatile fatty acids (**VFA**) were determined by gas chromatography (**GC**). A completely randomized block model with orthogonal contrasts was used to assess the effect of treatments on *in vitro* fermentation parameters and the degradability of **DM** and **NDF**. The addition of oils decreased degradation of **DM** (%) (**C**: 70.3 vs addition: 67.7;  $p < 0.001$ ), **NDF** (%) (**C**: 50.3 vs addition: 42.5;  $p < 0.001$ ), total gas production (ml) (**C**: 118.6 vs addition: 109.0;  $p < 0.001$ ), **CH<sub>4</sub>** (ml) (**C**: 36.0 vs addition: 29.1;  $p < 0.001$ ) and the percentage of **CH<sub>4</sub>** (**C**: 30.3 vs addition: 26.7;  $p < 0.001$ ). Pure oils and their mixtures did not generate different responses on most variables, with the exception of the **NDF** degradation (%) (Pure: 41.7 vs mixtures: 42.8;  $p < 0.05$ ). The addition of **PKO** compared with **CO** and **LO** addition decreased degradation of **DM** (%) (**PKO**: 67.8 vs **CO** and **LO**: 63.0;  $p < 0.001$ ), **NDF** (%) (**PKO**: 44.5 vs **CO** and **LO**: 35.9;  $p < 0.001$ ), gas production (ml) (**P**: 116.8 vs **CO** and **LO**: 93.1;  $p < 0.001$ ), **CH<sub>4</sub>** production (ml) (**PKO**: 32.2 vs **CO** and **LO**: 24.1;  $p < 0.001$ ) and the molar concentration of **VFA's** (mmol/l) (**PKO**: 81.65 vs **CO** and **LO**: 77.7;  $p < 0.01$ ). The addition of **LO** generated a greater degradation of **NDF** (%) compared to **CO** (42.8 vs 41.7;  $p < 0.05$ ). Mixtures of the oils compared between then and **CO-PKO** mixtures vs **LO-PKO** did not generate different responses in the evaluated variables. Growing proportions of **PKO** in **CO** and **LO** mixtures decreased degradation of **DM** and **NDF**, gas and **CH<sub>4</sub>** production. The addition of oils in an *in vitro* system reduces substrate degradation and gas production. Associative effects of the mixtures were not presented in most of the variables evaluated. The inclusion of **PKO** in a mixture of oils still in low proportions reduces the substrate degradation and fermentation gas production.

**Key words:** addition, degradation, methane ( $CH_4$ ), production

### Abreviaturas

**AG:** ácido graso. **AGV:** ácidos grasos volátiles. **BH:** biohidrogenación. **C:** control sin inclusión de aceite. **CG:** cromatografía de gases. **CNE:** carbohidratos no estructurales. **EE:** extracto etéreo. **FDN:** fibra en detergente neutro. **FDNd:** fibra en detergente neutro degradada. **FDA:** fibra en detergente ácido. **L:** aceite de linaza. **L<sub>25</sub>P<sub>75</sub>:** mezcla de 25% de aceite de linaza y 75% de aceite de palmiste. **L<sub>50</sub>P<sub>50</sub>:** mezcla de 50% de aceite de linaza y 50% de aceite de palmiste. **L<sub>75</sub>P<sub>25</sub>:** mezcla de 75% de aceite de linaza y 25% de aceite de palmiste. **M:** aceite de maíz. **M<sub>25</sub>L<sub>75</sub>:** mezcla de 25% de aceite de maíz y 75% de aceite de linaza. **M<sub>50</sub>L<sub>50</sub>:** mezcla de 50% de aceite de maíz y 50% de aceite de linaza. **M<sub>75</sub>L<sub>25</sub>:** mezcla de 75% de aceite de maíz y 25% de aceite de linaza. **M<sub>25</sub>P<sub>75</sub>:** mezcla de 25% de aceite de maíz y 75% de aceite de palmiste. **M<sub>50</sub>P<sub>50</sub>:** mezcla de 50% de aceite de maíz y 50% de aceite de palmiste. **M<sub>75</sub>P<sub>25</sub>:** mezcla de 75% de aceite de maíz y 25% de aceite de palmiste. **MS:** materia seca. **MSd:** materia seca degradada. **P:** aceite de palmiste. **PC:** proteína cruda.

## 2.1 Introducción

La fermentación de la dieta es el principal factor que determina la producción de metano ( $CH_4$ ) en los rumiantes (Martin, *et al.*, 2010). En la fermentación ruminal se produce cerca del 87% del  $CH_4$  mientras que en la intestinal el restante 13% (Torrent y Johnson, 1994). La inclusión de lípidos en la dieta de rumiantes disminuye la producción de  $CH_4$  en el rumen mediante la reducción de la degradación de la materia orgánica, la modificación de las rutas metabólicas de la fermentación ruminal y cuando sustituye a los carbohidratos disminuye la cantidad de energía disponible para el crecimiento microbiano (Giger-Riverdin, *et al.*, 2003; Boadi, *et al.*, 2004; Hook, *et al.*, 2010; Martin, *et al.*, 2010; Afshar y Nasser, 2012; Patra, 2014). Adicionalmente, los lípidos ricos en ácidos grasos (**AG**) insaturados pueden actuar como receptores de hidrogeno en el rumen en el proceso de biohidrogenación (**BH**) (Ellis, *et al.*, 2008; Martín, *et al.*, 2010)

El perfil de **AG** de los lípidos parecería tener relación con la capacidad de reducir la producción de  $CH_4$  en el rumen. En experimentos *in vitro* e *in vivo* se ha encontrado que

la adición de aceites con mayores proporciones de ácido láurico (**12:0**) y mirístico (**14:0**) como el de coco y palmiste reducen más intensamente la producción de **CH<sub>4</sub>** que los aceites con altas proporciones de **AG** insaturados. Estos **AG** de cadena media disminuyen el número de microorganismos, especialmente el de archaeas y protozoarios en el rumen que han sido asociados a la producción de **CH<sub>4</sub>** (Machmüller, *et al.*, 2003; Soliva, *et al.*, 2003; Machmüller, *et al.*, 2006; Patra y Yu, 2013). Otros trabajos han reportado que los aceites vegetales ricos en **AG** poliinsaturados (linoleico o **18:2<sub>c9 c12</sub>** y linolénico o **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**) como el de maíz, soya, girasol y linaza también pueden tener un efecto tóxico sobre los microorganismos (Palmquist y Jenkins, 1980) disminuyendo la producción de **CH<sub>4</sub>** (McGinn, *et al.*, 2004; Beauchemin, *et al.*, 2007).

Nuestra hipótesis es que los mecanismos que causan la disminución de **CH<sub>4</sub>** debido a la adición de aceites con diferentes perfiles de **AG** son distintos, por lo cual podríamos encontrar sinergias (efectos asociativos positivos) cuando estos se mezclan. Esto es que la reducción del **CH<sub>4</sub>** debido a la mezcla será mayor que el efecto de la sumatoria de las reducciones parciales debida a los aceites puros. El objetivo de este ensayo fue determinar el efecto de la adición de aceites vegetales (maíz, linaza o palmiste) y sus mezclas a un sustrato (kikuyo + concentrado en una relación 75:25) sobre la degradación de la materia seca (**MS**), fibra en detergente neutro (**FDM**), fibra en detergente ácido (**FDA**), la producción de gas y de **CH<sub>4</sub>** en un sistema *in vitro*.

## 2.2 Metodología

Todos los procedimientos fueron avalados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá (Acta 04 del año 2012).

### 2.2.1 Localización

El experimento se realizó en dos etapas. La primera constituyó en el análisis composicional del forraje empleado, el concentrado y los aceites adicionados, la cual tuvo lugar en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, localizado a 4° 38' 8" de latitud norte, 74° 4' 58" de longitud oeste y a una altitud de 2640 msnm y temperatura 14° C. La segunda etapa, correspondiente al desarrollo de

la técnica de medición de gases, se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Ruminal de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, ubicado a 6° 13' 55" de latitud norte y 75° 34' 05" de longitud oeste, a una altitud de 1538 msnm y temperatura de 24° C.

### 2.2.2 Tratamientos

Los tratamientos evaluados consistieron en un control sin adición de aceite y la adición de aceites vegetales puros o sus mezclas (tabla 2.1). Como sustrato a incubar se empleó un kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) de 60 días de rebrote, proveniente del Centro Agropecuario Marengo de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, fertilizado con el protocolo sugerido por Castro, *et al.*, (2008), para gramíneas en Sabana de Bogotá más un concentrado (tabla 2.2). El forraje a incubar fue tomado siguiendo la metodología "Hand plucking" descrita por Cook, (1964) y secado a 60° C durante 48 horas y se molió en un molino Romer® con una criba de 2 mm. El concentrado se procesó de la misma forma que el forraje. La composición del concentrado, los parámetros de calidad del mismo y del forraje y los perfiles en **AG** se presentan en las tablas 2.2, 2.3 y 2.4 respectivamente.

**Tabla 2.1** Tratamientos

	<i>M</i>	<i>L</i>	<i>P</i>
	%		
<b>C</b>	0	0	0
<b>M<sub>100</sub></b>	100	0	0
<b>L<sub>100</sub></b>	0	100	0
<b>P<sub>100</sub></b>	0	0	100
<b>M<sub>75</sub>L<sub>25</sub></b>	75	25	0
<b>M<sub>50</sub>L<sub>50</sub></b>	50	50	0
<b>M<sub>25</sub>L<sub>75</sub></b>	25	75	0
<b>M<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b>	75	0	25
<b>M<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b>	50	0	50
<b>M<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>	25	0	75
<b>L<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b>	0	75	25
<b>L<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b>	0	50	50
<b>L<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>	0	25	75

**C:** control, **M:** aceite de maíz, **L:** aceite de linaza, **P:** aceite de palmiste

Tabla 2.2. Composición del concentrado

<b>Composición</b>	
<b>Ingrediente</b>	<b>% de la MS</b>
<b>Torta de soya 44</b>	38.10
<b>Maíz amarillo</b>	26.60
<b>Harina de yuca</b>	19.00
<b>Melaza</b>	10.00
<b>Carbonato de calcio</b>	3.96
<b>Mogolla</b>	2.30
<b>Premezcla mineral</b>	0.04

Tabla 2.3 Composición química del forraje y concentrado

	<b>Concentrado</b>	<b>Kikuyo</b>
	<b>% de la MS</b>	
<b>Proteína cruda (PC)</b>	21.0	16.4
<b>Fibra en detergente neutro (FDN)</b>	17.3	48.8
<b>Fibra en detergente ácido (FDA)</b>	5.5	21.3
<b>Carbohidratos no estructurales (CNE)<sup>1</sup></b>	54.1	20.1
<b>Extracto etéreo (EE)</b>	0.6	3.4
<b>Cenizas</b>	7.0	11.3

<sup>1</sup>CNE=100-(FDN+PC+EE+cenizas).

Tabla 2.4 Composición de AG de los alimentos utilizados (g/100 g de AG)

<b>AG</b>	<b>Kikuyo</b>	<b>Concentrado</b>
<b>8:0</b>	1.01	0,52
<b>10:0</b>	2.45	1.64
<b>12:0</b>	-	-
<b>14:0</b>	-	1.05
<b>14:1<sub>c9</sub></b>	-	-
<b>16:0</b>	29.91	14.51
<b>16:1<sub>c9</sub></b>	12.97	11.00
<b>16:1</b>	-	-
<b>18:0</b>	-	-
<b>18:1<sub>c9</sub></b>	-	14.60
<b>18:2<sub>t9 t12</sub></b>	-	-
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	10.41	38.45
<b>18:3<sub>c6 c9 c12</sub></b>	-	-
<b>18:3<sub>c9 c12 c15</sub></b>	37.06	14.36
<b>Otros</b>	6.18	3.86

### 2.2.3 Incubación

Se utilizaron cuatro botellas de vidrio color ámbar de 100 ml por tratamiento (52) y cuatro como blanco para un total de 56 botellas. Las 52 botellas que contenían 350 mg de kikuyo y 150 mg de concentrado sin aceite (**C**) o con aceites o sus mezclas (15  $\mu$ l) fueron incubadas con 10 ml de fluido ruminal y 40 ml de medio de cultivo (Theodorou, *et al.*, 1994). El fluido ruminal utilizado se obtuvo de cuatro vacas Holstein que consumieron una dieta consistente en kikuyo durante los 15 días previos al ensayo. Cada botella se empleó como una repetición para cada uno de los tratamientos. Las botellas se gasificaron con **CO<sub>2</sub>**, se sellaron y se colocaron en un horno a 39° C, con agitación manual cada dos horas. El residuo de la fermentación fue utilizado para calcular la degradación de la **MS** y de la **FDN** (AOAC, 2006; Van Soest, *et al.*, 1991). A los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas se midió la producción total de gas en cada una de las botellas (Theodorou, *et al.*, 1994) y se determinó la concentración de **CH<sub>4</sub>** en el gas para la hora 48 por cromatografía de gases (**CG**). En el sobrenadante a la hora 48 se determinó la concentración de ácidos grasos volátiles **AGV** por **CG** y se midió el pH con un potenciómetro (Schoot Instruments® Modelo 2006).

### 2.2.4 Análisis químicos

El forraje y el concentrado se analizaron para **MS**, extracto etéreo (**EE**), cenizas, proteína cruda (**PC**) (AOAC, 2006) **FDN**, fibra en detergente ácido (**FDA**) (Van Soest, *et al.*, 1991) y los **AG** se cuantificaron por **CG**. Para los aceites y sus mezclas se determinó el perfil de **AG** por **CG**.

### 2.2.5 Extracción de AG

Los **AG** del forraje y concentrado se extrajeron por el método sugerido de Garcés y Mancha, (1993) adaptado por Yamasaki, *et al.*, (1999). Se pesaron 50 mg de forraje seco o concentrado, se agregaron 2150  $\mu$ l de metanol absoluto, 990  $\mu$ l de tolueno, 1000  $\mu$ l de N,N-dimetilformamida, 66  $\mu$ l de ácido sulfúrico al 99.9%, y 2 ml de n-hexano; la mezcla se colocó en un baño de María (2 horas a 80° C) y se dejó en reposo (5-10 minutos). El sobrenadante se evaporó mediante corriente de N y la muestra seca se reconstituyó con 300  $\mu$ l de diclorometano para su posterior análisis por **CG**. La extracción de los **AG** en los aceites y sus mezclas se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Christie *et al.*, (1993).

**Tabla 2.5** Perfil de **AG** de los aceites y sus mezclas (g/100 g de **AG**)

<b>AG</b>	<b>M<sub>100</sub></b>	<b>L<sub>100</sub></b>	<b>P<sub>100</sub></b>	<b>M<sub>75</sub>L<sub>25</sub></b>	<b>M<sub>50</sub>L<sub>50</sub></b>	<b>M<sub>25</sub>L<sub>75</sub></b>	<b>M<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b>	<b>M<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b>	<b>M<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>	<b>L<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b>	<b>L<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b>	<b>L<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>
<b>12:0</b>	0.00	0.01	35.29	0.05	0.01	0.01	8.40	17.65	25.47	7.83	17.65	26.07
<b>14:0</b>	0.13	0.11	11.61	0.10	0.12	0.12	2.91	5.87	8.74	2.99	5.86	8.74
<b>14:1<sub>c9</sub></b>	0.03	0.03	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02
<b>16:0</b>	11.80	7.81	9.21	10.48	9.81	8.81	10.67	10.51	9.86	8.16	8.51	8,86
<b>16:1<sub>c9</sub></b>	0.03	0.27	0.26	0.12	0.15	0.21	0.26	0.15	0.20	0.27	0.27	0.26
<b>18:0</b>	5.18	6.62	3.45	5.34	5.90	6.26	4.87	4.32	3.88	5.03	5.04	4.24
<b>18:1<sub>c9</sub></b>	20.66	22.97	17.54	21.33	21.82	22.39	19.65	19.10	18.32	21.61	20.26	18.00
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	53.99	21.71	15.34	44.94	33.85	29.78	41.91	34.67	26.00	20.12	18.53	17.83
<b>18:3<sub>c6 c9 c12</sub></b>	0.26	0.01	0.02	0.17	0.14	0.07	0.15	0.14	0.08	0.01	0.02	0.02
<b>18:3<sub>c9 c12 c15</sub></b>	5.51	38.96	0.50	15.61	23.24	30.60	3.61	3.01	2.35	30.35	19.73	10.12
<b>Otros</b>	2.42	1.49	6.75	1.83	1.96	1.72	7.54	4.59	5.07	3.61	4.12	5.84

**C:** control, **M:** aceite de maíz, **L:** aceite de linaza, **P:** aceite de palmiste.

### **2.2.6 Cuantificación de AG, AGV y CH<sub>4</sub>**

Los **AG**, **AGV** y **CH<sub>4</sub>** se cuantificaron con un cromatógrafo de gases marca Shimadzu® modelo GC-2014 con detector tipo FID. Se utilizó helio como gas de arrastre con un flujo de 40.4 psi.

#### **AG**

Se tomaron 200 µl de la solución reconstituida con diclorometano. Se utilizó una columna capilar de 100 m x 0.25 mm x 0.2 µm. Rt 2560 (Restek®) con temperaturas del puerto de inyección y del puerto de detección de 260° C y 270° C respectivamente. La temperatura Inicial del horno fue de 140° C durante 5 minutos con un incremento de 4° C por minuto hasta llegar a 190° C y se mantuvo así hasta llegar a una duración total de 60 minutos. Se utilizó helio como gas de arrastre con un flujo de 40.4 psi (del inglés pounds-force per square inch) y un Split ratio de 1:100. El volumen inyectado fue de 1µl.

#### **AGV**

Se tomaron 800 µl del fluido ruminal por botella y se les adicionaron 500 µl de solución desproteinizante, acidificante (100 g/l de ácido metafosfórico y 0.6 g/l de ácido crotónico como estándar interno, 4° C) y se centrifugaron a 13000 revoluciones por minuto 3 veces para eliminar impurezas. Se utilizó una columna capilar de polietilenglicol de 25m x 0.32 mm x 0.5 µm Agilent® HP-FFAP (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). La temperatura del puerto de inyección fue de 260° C, de 280° C puerto de detección con una duración total de 10 minutos. Se utilizó helio como gas de arrastre con un flujo de 42 psi y un Split ratio de 1:50. El volumen inyectado fue de 1µl.

#### **CH<sub>4</sub>**

Se utilizó una columna capilar de 30 m x 0.53 mm x 50 µm Agilent® HP-PLOT Molsieve 5A (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). La temperatura del puerto de inyección fue de 100° C, la del puerto de detección 300° C durante 4 minutos. Como estándar se utilizó una mezcla de nitrógeno, que contenía 10% de **CH<sub>4</sub>**. Se utilizó helio como gas de arrastre con un flujo de 35.4 cm/segundo y un Split ratio de 1:50. Los cálculos finales de **CH<sub>4</sub>** se realizaron según la metodología descrita por López y Newbold, (2007).

### 2.2.7 Diseño experimental

Se empleó un diseño en bloques completamente al azar (Steel y Torrie, 1980) utilizando el fluido ruminal proveniente de cada animal como factor de bloqueo. Se compararon los efectos de los tratamientos sobre las variables de fermentación ruminal. El análisis estadístico se realizó utilizando el procedimiento PROC GLM del sistema estadístico SAS, (1998) según el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + T_j + e_{ijk} \text{ Donde:}$$

$Y_{ij}$  = es la lectura de la  $i$ -ésima botella en el  $j$ -ésimo tratamiento

$\mu$  = es el promedio poblacional de la variable respuesta.

$A_i$  = es el efecto del  $i$ -ésimo fluido ruminal ( $i=1, 2, 3, 4$ )

$T_j$  = es el efecto del  $j$ -ésimo tratamiento ( $j=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13$ )

$e_{ijk}$  = es el error asociado con la lectura del  $j$ -ésimo tratamiento en el  $i$ -ésimo fluido ruminal

Se realizaron comparaciones de medias planeadas con un nivel de significancia del 5% (tabla 2.6). El modelo cumplió con los supuestos de homogeneidad del material experimental, que el error experimental es una variable aleatoria, independiente, con distribución normal, media igual a 0 y varianzas homogéneas.

**Tabla 2.6** Contrastes ortogonales utilizados

1	<b>C vs (M, L, P y mezclas )</b>
2	<b>M, L y P vs mezclas</b>
3	<b>M y L vs P</b>
4	<b>M vs L</b>
5	Mezclas <b>M-L</b> vs mezclas <b>M-P L-P</b>
6	Mezclas <b>M-P</b> vs mezclas <b>L-P</b>
7	<b>M<sub>75</sub>L<sub>25</sub> VS (M<sub>50</sub>L<sub>50</sub> M<sub>25</sub>L<sub>75</sub>)</b>
8	<b>M<sub>50</sub>L<sub>50</sub> VS M<sub>25</sub>L<sub>75</sub></b>
9	<b>M<sub>75</sub>P<sub>25</sub> VS (M<sub>50</sub>P<sub>50</sub> M<sub>25</sub>P<sub>75</sub>)</b>
10	<b>M<sub>50</sub>P<sub>50</sub> VS M<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>
11	<b>L<sub>75</sub>P<sub>25</sub> VS (L<sub>50</sub>P<sub>50</sub> L<sub>25</sub>P<sub>75</sub>)</b>
12	<b>L<sub>50</sub>P<sub>50</sub> VS L<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>

**C:** control, **M:** aceite de maíz, **L:** aceite de linaza, **P:** aceite de palmiste

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Contraste 1 (C vs M, L, P y mezclas)

La adición de aceites y sus mezclas generaron menores valores en la degradación de la **MS (DMS)**, de la **FDN**, el porcentaje y producción total de **CH<sub>4</sub>**, **CH<sub>4</sub>** por **g/MSD**, y aumentaron la producción de gas por unidad de **FDN** degradado (**g/FDNd**) respecto al tratamiento **C**.

### 2.3.2 Contraste 2 (M, L y P vs mezclas)

Los aceites puros respecto a las mezclas generaron menor degradación de la **FDN**.

### 2.3.3 Contraste 3 (M y L vs P)

El tratamiento **P** respecto a **M** y **L** disminuyó la degradación de la **MS** y la **FDN**, la producción total de gas y **CH<sub>4</sub>**, la producción por **g/MSd** de gas y **CH<sub>4</sub>** y la concentración molar de **AGV**.

### 2.3.4 Contraste 4 (M vs L)

La degradación de la **FDN** fue menor para la inclusión de **M** respecto a **L**.

### 2.3.5 Contraste 5 (Mezclas M-L vs mezclas M-P L-P)

Las mezclas que incluyeron **P** disminuyeron la degradación de la **MS**, de la **FDN**, las producciones totales de gas, **CH<sub>4</sub>**, y las producciones por **g/MSd** de gas y **CH<sub>4</sub>**.

### 2.3.6 Contraste 6 (Mezclas M-P vs mezclas L-P)

No se detectaron diferencias significativas en los parámetros de fermentación evaluados.

### 2.3.7 Contrastes 7 (M<sub>75</sub>L<sub>25</sub> vs M<sub>50</sub>L<sub>50</sub> y M<sub>25</sub>L<sub>75</sub>)

No se presentaron diferencias significativas en los parámetros de fermentación evaluados.

### 2.3.8 Contraste 8 (M<sub>50</sub>L<sub>50</sub> vs M<sub>25</sub>L<sub>75</sub>)

No se presentaron diferencias significativas en los parámetros de fermentación evaluados.

### **2.3.9 Contraste 9 ( $M_{75}P_{25}$ vs $M_{50}P_{50}$ y $M_{25}P_{75}$ )**

Mayores proporciones de **P** (50 y 75%) en la mezcla adicionada al sustrato fermentado generaron efectos negativos sobre la degradación de la **MS** y **FDN**, disminución en la producción total y por **g/MSd** de gas y de **CH<sub>4</sub>**.

### **2.3.10 Contraste 10 ( $M_{50}P_{50}$ vs $M_{25}P_{75}$ )**

A una proporción de 75% de **P** se disminuyeron la degradación de la **FDN**, y la producción total y por **g/MSd** de gas.

### **2.3.11 Contraste 11 ( $L_{75}P_{25}$ vs $L_{50}P_{50}$ y $L_{25}P_{75}$ )**

Mayores proporciones de **P** en la mezcla adicionada (50 y 75%) generaron efectos negativos sobre la degradación de la **MS** y **FDN**, disminución en la producción total de gas y **CH<sub>4</sub>**, producción por **g/MSd** de gas y de **CH<sub>4</sub>**, y una mayor proporción de ácido valérico.

### **2.3.12 Contraste 12 ( $L_{50}P_{50}$ vs $L_{25}P_{75}$ )**

Mayor proporción de **P** en la mezcla adicionada generaron efectos negativos sobre la degradación de la **MS** y **FDN**, disminución en la producción total de gas y **CH<sub>4</sub>**, producción de gas por **g/MSd** y una menor proporción de ácido valérico.

## **2.4 Discusión**

Este trabajo se basó en la hipótesis de que los mecanismos que causan la disminución de **CH<sub>4</sub>** debido a la adición de aceites con diferentes perfiles de **AG** eran distintos, por lo cual se podrían encontrar efectos asociativos positivos sobre la reducción de **CH<sub>4</sub>** cuando estos se mezclan. También se exploró el efecto de adicionar aceite de maíz, linaza o palmiste y sus mezclas sobre la fermentación ruminal con énfasis en la producción de **CH<sub>4</sub>**.

**Tabla 2.7** Efecto de la adición de aceites de maíz, linaza, palmiste o sus mezclas sobre la fermentación ruminal (promedios)

Variable	Tratamiento													ESM <sup>1</sup>
	C	M <sub>100</sub>	L <sub>100</sub>	P <sub>100</sub>	M <sub>75</sub> L <sub>25</sub>	M <sub>50</sub> L <sub>50</sub>	M <sub>25</sub> L <sub>75</sub>	M <sub>75</sub> P <sub>25</sub>	M <sub>50</sub> P <sub>50</sub>	M <sub>25</sub> P <sub>75</sub>	L <sub>75</sub> P <sub>25</sub>	L <sub>50</sub> P <sub>50</sub>	L <sub>25</sub> P <sub>75</sub>	
<b>Degradación (%)</b>														
MS	70.3	67.7	68.0	63.0	67.4	67.9	67.4	65.9	65.2	64.2	66.7	65.9	64.0	0.30
FDN	50.3	43.3	45.8	35.9	44.4	45.5	44.5	44.5	41.6	38.3	44.4	42.5	39.0	0.59
<b>Producción de gas</b>														
ml	119	117	117	93	115	115	116	113	107	98	113	107	98	1.25
ml/gMSd	351	359	358	308	355	354	357	355	342	319	352	339	317	2.92
ml/gFDNd	916	1055	991	1008	1007	985.5	1015.6	984	1004	1006	990	981	975	9.68
<b>Producción de CH<sub>4</sub></b>														
% de gas total	30.3	27.1	27.9	25.8	26.8	26.7	26.7	27.3	27	25.8	27.2	26.6	25.5	0.25
ml	36	32	33	24	31	31	31	31	29	25	31	29	25	0.53
ml/gMSd	107	97	100	80	95	94	95	97	91	82	96	90	81	1.38
ml/gFDNd	278	286	277	260	270	263	271	269	268	260	270	261	250	3.60
<b>Fluido ruminal</b>														
pH	6.53	6.55	6.57	6.54	6.57	6.57	6.57	6.57	6.54	6.53	6.57	6.56	6.56	0.005
AGV (mmol/l)	80.2	81.6	81.7	77.7	82.0	82.4	82.6	81.6	81.1	80.0	81.6	81.1	80.8	0.35
Acético (%)	65.8	65.9	65.8	65.8	66.1	66.2	66.3	66.1	65.9	66.2	65.9	65.9	66.0	0.12
Propiónico (%)	22.7	22.7	22.8	22.6	22.4	22.5	22.2	22.4	22.4	22.4	22.6	22.5	22.3	0.11
Butírico (%)	10.6	10.6	10.7	10.8	10.7	10.5	10.7	10.7	10.9	10.6	10.8	10.7	10.9	0.06
Valérico (%)	0.80	0.80	0.79	0.78	0.76	0.78	0.82	0.80	0.75	0.80	0.78	0.82	0.82	0.01
Acético:Propiónico	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	0.02

C: Control, M: aceite de maíz, L: aceite de linaza, P: aceite de palmiste. <sup>1</sup>Error estándar de la media

**Tabla 2.8** Efecto de la adición de aceites de maíz, linaza, palmiste o sus mezclas sobre la fermentación ruminal (probabilidades)

Variable	Contraste											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	P											
<b>Degradación (%)</b>												
<b>MS</b>	***	NS	***	NS	***	NS	NS	NS	*	NS	**	**
<b>FDN</b>	***	*	***	*	***	NS	NS	NS	***	**	***	***
<b>Producción de gas</b>												
<i>ml</i>	***	NS	***	NS	***	NS	NS	NS	***	**	***	**
<i>g/MSd</i>	NS	NS	***	NS	**	NS	NS	NS	**	*	*	*
<i>g/FDNd</i>	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Producción de CH<sub>4</sub></b>												
%	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>ml</i>	***	NS	***	NS	**	NS	NS	NS	*	NS	**	*
<i>g/MSd</i>	***	NS	***	NS	*	NS	NS	NS	*	NS	*	NS
<i>g/FDNd</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Fluido ruminal</b>												
<i>pH</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>AGV (mmol/l)</b>	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Acético (%)</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Propiónico (%)</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Butírico (%)</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Valérico (%)</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	*
<i>Acético:Propiónico</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Significancia; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001. 1: **C** vs (**M**, **L** y **P**); 2: **M**, **L** y **P** vs Mezclas; 3: **M** y **L** vs **P**; 4: **M** vs **L**; 5: Mezclas **M-L** vs Mezclas **M-P** **L-P**; 6: Mezclas **M-P** vs Mezclas **L-P**; 7: **M**<sub>75</sub> **L**<sub>25</sub> vs (**M**<sub>50</sub>**L**<sub>50</sub> **M**<sub>25</sub>**L**<sub>75</sub>); 8: **M**<sub>50</sub>**L**<sub>50</sub> vs **M**<sub>25</sub>**L**<sub>75</sub>; 9: **M**<sub>75</sub>**P**<sub>25</sub> vs (**M**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> **M**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>); 10: **M**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> vs **M**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>; 11: **L**<sub>75</sub>**P**<sub>25</sub> vs (**L**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> **L**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>); 12: **L**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> vs **L**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>

### 2.4.1 Control vs adición de aceites

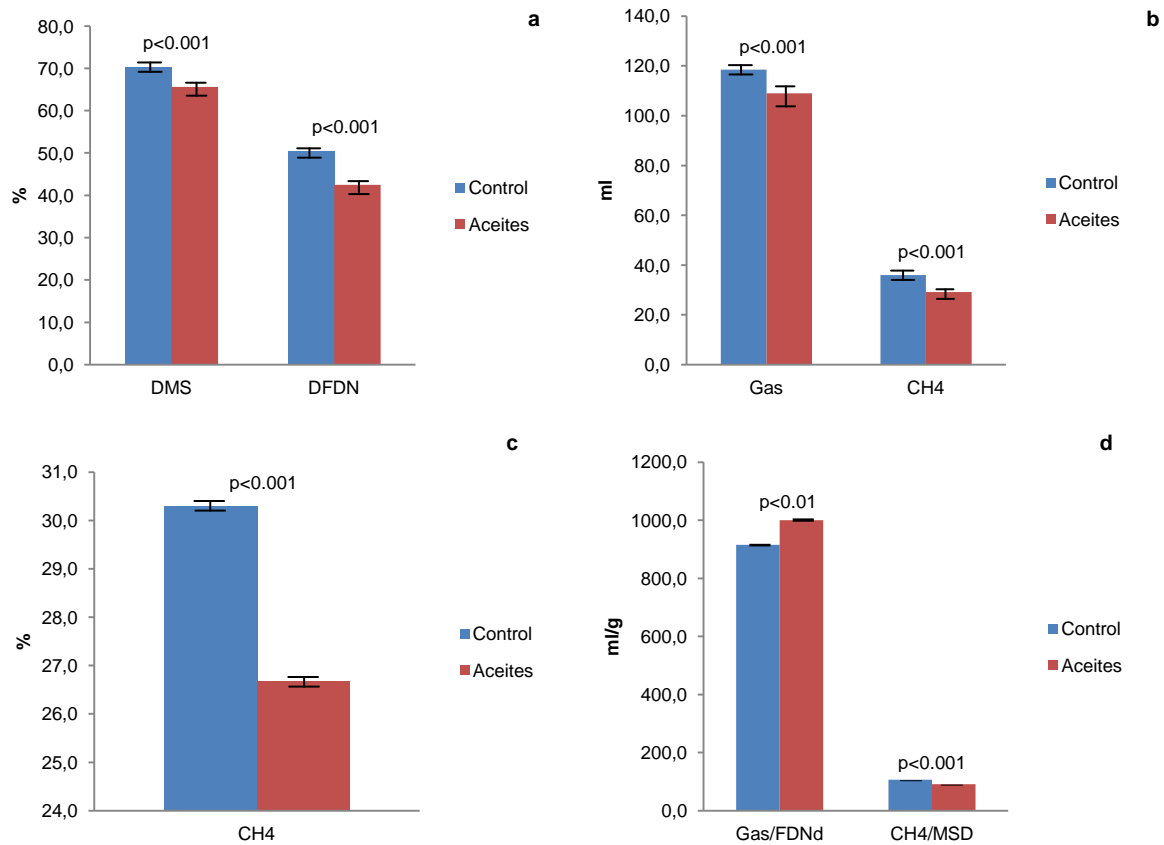
Similar a lo reportado en otros trabajos (Machmüller, *et al.*, 1998; Dohme, *et al.*, 2000; Yabuuchi, *et al.*, 2006; Patra y Yu, 2013) la adición de aceites disminuyó la degradación *in vitro* de la MS (4.7%), de la **FDN** (7.7%), la producción total de **CH<sub>4</sub>** (12%), la producción de **CH<sub>4</sub>** por **gMSd** (14%) y la proporción de **CH<sub>4</sub>** del total de gases de fermentación (12%) (figura 2.1). Se han sugerido diferentes mecanismos asociados capaces de explicar esta disminución de **CH<sub>4</sub>** como son: limitaciones de tipo físico debido al recubrimiento de los lípidos a las partículas de alimento que impiden el ataque enzimático por parte de los microorganismos (Palmquist, 1984; Dohme, *et al.*, 2000).; efectos tóxicos de lo **AG** sobre algunas poblaciones de microorganismos (Nagaraja, *et al.*, 1997; Machmüller, *et al.*, 2003; Machmüller, *et al.*, 2006; Margarida, *et al.*, 2007; Yang, *et al.*, 2009; Patra y Yu, 2013) y modificaciones en los patrones de fermentación debidos a cambios en las poblaciones microbianas (Yabuuchi, *et al.*, 2006; Martin, *et al.*, 2010). En nuestro trabajo la adición de aceites redujo la degradación de la **MS**, la degradación de la **FDN** en ausencia de toda modificación en la concentración de **AGV** o de sus proporciones molares. Este resultado sugeriría que el principal mecanismo asociado a la reducción de la producción de **CH<sub>4</sub>** sería un efecto tóxico sobre las poblaciones microbianas que explicarían las disminuciones de la degradación de la **MS** y la **FDN**.

Cuando la producción de **CH<sub>4</sub>** se expresó por unidad de **FDN** degradada no hubo diferencias entre el control (sin adición de aceites) y el grupo con adición de aceites. Esto sugeriría que es la degradación de la **MS** la que explicaría principalmente las diferencias en la producción de **CH<sub>4</sub>** con la adición de aceites y que estos inhibirían a los microorganismos degradadores de la **MS**. Algunos trabajos sugieren que los lípidos tienen efectos tóxicos sobre las poblaciones de microorganismos fibrolíticos (McGinn, *et al.*, 2004; Beauchemin, *et al.*, 2007; Margarida, *et al.*, 2007). Sin embargo, otros trabajos sugieren que el efecto tóxico no solo se da sobre esta poblaciones (Soliva, *et al.*, 2003; Machmüller, *et al.*, 2006; Dong, *et al.*, 2007; Patra y Yu, 2013).

La proporción de **CH<sub>4</sub>** dentro del total de gases producidos se redujo con la adición de aceites (figura 2.1c), similar a lo reportado por otros autores (Dong, *et al.*, 1997; Patra y Yu, 2013). Esta disminución se podría explicar por un efecto antimicrobiano de los aceites sobre poblaciones que se encuentran vinculadas a la síntesis de **CH<sub>4</sub>**. La menor

proporción de **CH<sub>4</sub>** también indicaría que la producción de otros gases como el hidrogeno (**H<sub>2</sub>**) y el dióxido de carbono (**CO<sub>2</sub>**) formaron una mayor proporción del gas producido. Sin embargo, solamente un aumento de **H<sub>2</sub>** en el gas total o una menor disponibilidad de **H<sub>2</sub>** para la reducción del **CO<sub>2</sub>** explicarían una reducción en la síntesis de **CH<sub>4</sub>** cuando las concentraciones y las proporciones molares de **AGV** no se modifican como lo ocurrido en nuestro experimento. Para los tratamientos con aceites poliinsaturados, una disminución en la disponibilidad de **H<sub>2</sub>** podría explicarse por un uso parcial de este en el proceso de **BH** de los **AG** (Ellis, et al., 2008). Esta sería una explicación menos relevante para el caso de **P** debido a que su grado de insaturación es muy inferior al de los otros dos aceites. Es más, Van Soest, (1994) sugiere que el uso del **H<sub>2</sub>** en los procesos de **BH** es menor y que estos podrían ir a otras rutas fermentativas, incluyendo la síntesis de propionato. Cuando el propionato no aumenta como en nuestro ensayo, el **H<sub>2</sub>** podría ser utilizado para la reducción de nitrato (**NO<sub>3</sub>**), la síntesis de proteína microbiana, la reducción de sulfatos o haber sido expulsado en forma gaseosa (Van Soest, 1994). Es poco probable que bajo las condiciones del presente experimento se aumente la síntesis de proteína microbiana, ya que se redujo la degradación de la **MS**, y la fibra comprometiendo la energía disponible para su síntesis. Por lo tanto, puede especularse que lo más probable es que haya aumentado la producción de **H<sub>2</sub>** gaseoso.

En nuestro ensayo, la concentración molar de **AGV** no disminuyó con la inclusión de aceites a pesar de una menor degradación de la **MS** y de la fibra. Esto podría explicarse porque los aminoácidos no usados para la síntesis de proteína microbiana debido a una menor disponibilidad de energía serían fermentados a **AGV**, amonio y **CO<sub>2</sub>**. El efecto nocivo de los aceites sobre los microorganismos ha sido ampliamente documentado (Soliva, et al., 2003; Machmüller, et al., 2006; Dong, et al., 2007; Patra y Yu, 2013).



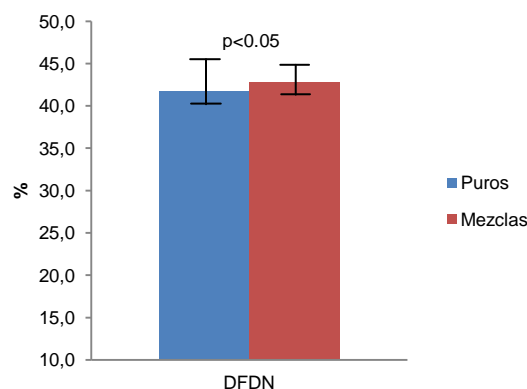
**Figura 2.1** Promedio de: a) Degradación de la **MS** (**DMS**), y del **FDN** (**DFDN**); b) Producción total de gas y **CH<sub>4</sub>**; c) Proporción de **CH<sub>4</sub>**; d) Producción de gas por **FDN** degradada y Producción **CH<sub>4</sub>** por unidad de **MS** degradada para el tratamiento control (sin adición de aceites) y los tratamientos con adición de aceites puros (maíz **-M-**, linaza **-L-** y palmiste **-P-**) y sus mezclas

### 2.4.2 Aceites puros vs mezclas

Contrario a la hipótesis original del presente trabajo, los aceites puros no generaron respuestas diferentes respecto a sus mezclas en la mayoría de los parámetros de fermentación ruminal evaluados, con la excepción de la degradación de la **FDN**. Esto sugiere ausencia de efectos asociativos (positivos o negativos) de mezclar aceites con diferente perfil de **AG** sobre la mayoría de las variables evaluadas. En el caso de la degradación de la fibra, mezclar los aceites produjo un efecto positivo, puesto que la fibra en los tratamientos con aceites mezclados presentó en promedio una mayor digestibilidad que cuando se adicionaron los aceites puros. Los mayores valores de digestibilidad para la fibra observados al compararlos con los valores de digestibilidad esperados (teniendo en cuenta las respuestas observadas en los aceites puros) sugerirían que las mayores

diferencias se presentaron en los tratamientos con las mezclas que contenían **P** (datos no incluidos). Para estas mezclas, la digestibilidad de la fibra fue superior a la esperada. Contrariamente a lo aquí observado, varios autores han reportado tanto en experimentos *in vitro* e *in vivo* que los aceites con alto contenido de **AG** saturados de cadena media como el **12:0** y el **14:0** tienen un efecto más deletéreo sobre la degradación de la fibra que aceites ricos en **AG** poliinsaturados (Dong, *et al.*, 1997; Machmüller, *et al.*, 2000; Machmüller, *et al.*, 2003, Beauchemin, *et al.*, 2008; Martin, *et al.* 2010; Patra y Yu, 2013; Patra, 2013; Patra, 2014).

Se sabe que la toxicidad de un compuesto varía de acuerdo a su concentración. Bajas concentraciones pueden no ser tóxicas y en algunos casos pueden inclusive tener efectos positivos (Henderson, 1973). Una mayor digestibilidad de la fibra en las mezclas que en los aceites puros sugeriría que los mecanismos de toxicidad de cada uno o de por lo menos uno de los aceites es diferente y que cuando se mezclan las menores concentraciones de uno o de varios de ellos tendrían efectos menos tóxicos que cuando se dan en forma pura. Es decir, se genera un efecto de dilución de los **AG** más tóxicos.



**Figura 2.2** Promedio de la degradación de la **FDN (DFDN)** para los tratamientos con aceites puros (maíz -**M**-, linaza -**L**- y palmiste -**P**-) y las mezclas de aceites

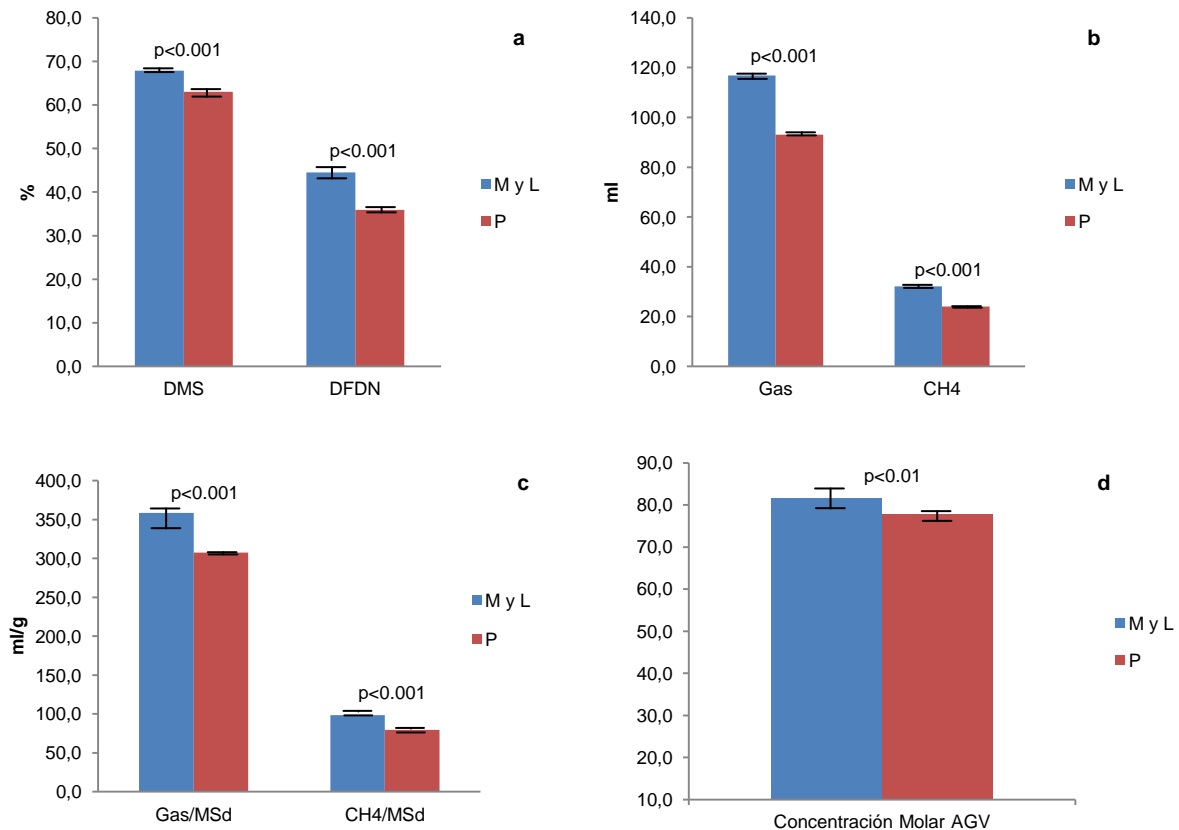
### **2.4.3 Aceites ricos en AG poliinsaturados (M y L) vs aceite rico en 12:0 (P)**

De los aceites utilizados, **P** fue el aceite que redujo en mayor grado la fermentación y la producción de **CH<sub>4</sub>** (Figura 2.3). Varios autores han reportado que aceites ricos en **AG** de

cadena media saturados (**12:0** y **14:0**) tienen un mayor impacto sobre la fermentación ruminal que otros aceites (Eugene, *et al.*, 2008; Beauchemin, *et al.*, 2008; Martín, *et al.*, 2010; Patra y Yu, 2013; Patra, 2013; Patra, 2014), debido al efecto tóxico de estos **AG** sobre las poblaciones ruminales (Machmüller, *et al.*, 2000; Machmüller, *et al.*, 2003; Machmüller, *et al.*, 2006; Beauchemin, *et al.*, 2008). Este efecto es mayor para los microorganismos fibrolíticos (Palmquist y Jenkins, 1980; Martín, *et al.*, 2010) y los asociados a la metanogénesis como las archaeas y protozoarios (Machmüller, *et al.*, 2003) que se evidencia con una menor producción de gases de fermentación (Dong, *et al.*, 1997; Yabuuchi, *et al.*, 2006). Existen reportes que indican que el aceite de linaza puede generar efectos negativos sobre la fermentación ruminal similares al de coco (Newbold, *et al.*, 1996; Machmüller, *et al.*, 1998) que tiene un perfil similar a **P**.

En nuestro ensayo, **P** redujo en mayor grado la producción de **CH<sub>4</sub>** comparado a **L** y **M** (Figura 2.3) sugiriendo que el **12:0** y **14:0** son más eficientes para disminuir la producción de **CH<sub>4</sub>** que los **AG** poliinsaturados. Cuando la producción de **CH<sub>4</sub>** es expresada por unidad de fibra degradada no se encontraron diferencias entre los tratamientos por lo cual se podría argumentar que el mecanismo que explica la reducción del **CH<sub>4</sub>** por los aceites estaría principalmente asociado a la reducción de la degradación de la **MS**. Se han sugerido diferentes mecanismos de cómo los lípidos podrían reducir esta degradación como son 1) el recubrimiento de los lípidos a las partículas de sustrato que impiden el ataque enzimático por parte de los microorganismos (Palmquist, 1984; Dohme, *et al.*, 2000) y 2) reducción de algunas poblaciones de microorganismos (Nagaraja, *et al.*, 1997; Machmüller, *et al.*, 2003; Machmüller, *et al.*, 2006; Margarida, *et al.*, 2007; Yang, *et al.*, 2009; Zeits, *et al.*, 2013; Patra y Yu, 2013). Algunos autores han sugerido que otro mecanismo por medio del cual las grasas podrían disminuir la producción de **CH<sub>4</sub>** está asociado a modificaciones de la fermentación ruminal por cambios en las poblaciones microbianas particularmente aumentando las proporciones molares de propionato (Yabuuchi, *et al.*, 2006; Martín, *et al.*, 2010). En nuestro experimento todos los aceites redujeron las concentraciones de **AGV** pero no modificaron las proporciones molares entre ellos (tablas 2.7 y 2.8). La concentración molar de **AGV** se redujo más con la adición de **P** que con **M** y **L** (Figura 2.3), lo cual se explica por una menor degradación de la **MS** y de la **FDN** debido al mayor efecto tóxico de **P** respecto a los otros aceites. Otros autores también han reportado mayores reducciones en la concentración de **AGV** con el uso de

aceites ricos en **AG** de cadena media comparado con otros aceites (Dong, *et al.*, 1997; Machmüller, *et al.*, 2000).

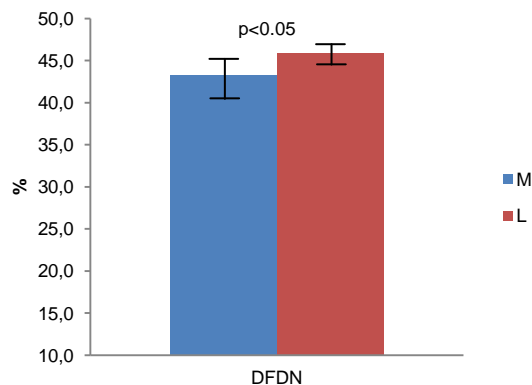


**Figura 2.3** Promedio de: a) Degradación de la **MS** (**DMS**) y de la **FDN** (**DFDN**); b) Producción total de gas y **CH<sub>4</sub>**; c) Producción de gas por **MS** degradada y Producción **CH<sub>4</sub>** por unidad de **MS** degradada; d) Concentración molar de **AGV** para el promedio de los tratamientos de aceite de maíz (**M**) y aceite de linaza (**L**) y el promedio del tratamiento con aceite de palmiste (**P**)

#### 2.4.4 Aceite rico en 18:2<sub>c9 c12</sub> (**M**) vs aceite rico en 18:3<sub>c9 c12 c15</sub> (**L**)

En nuestro experimento los aceites **M** y **L** generaron respuestas similares en la mayoría de las variables evaluadas, con excepción de las degradaciones de la **FDN** (figura 2.4). El tratamiento **L** generó una mayor degradación de la fibra, lo que sugiere un posible menor efecto del 18:3<sub>c9 c12 c15</sub> (mayoritario en **L**) sobre microorganismos fibrolíticos respecto al 18:2<sub>c9 c12</sub> (mayoritario en **M**). Otros autores han reportado que la degradación de la **MS** y de la fibra *in vitro* con la adición de aceite de linaza (rico en 18:3<sub>c9 c12 c15</sub>) fue mayor que

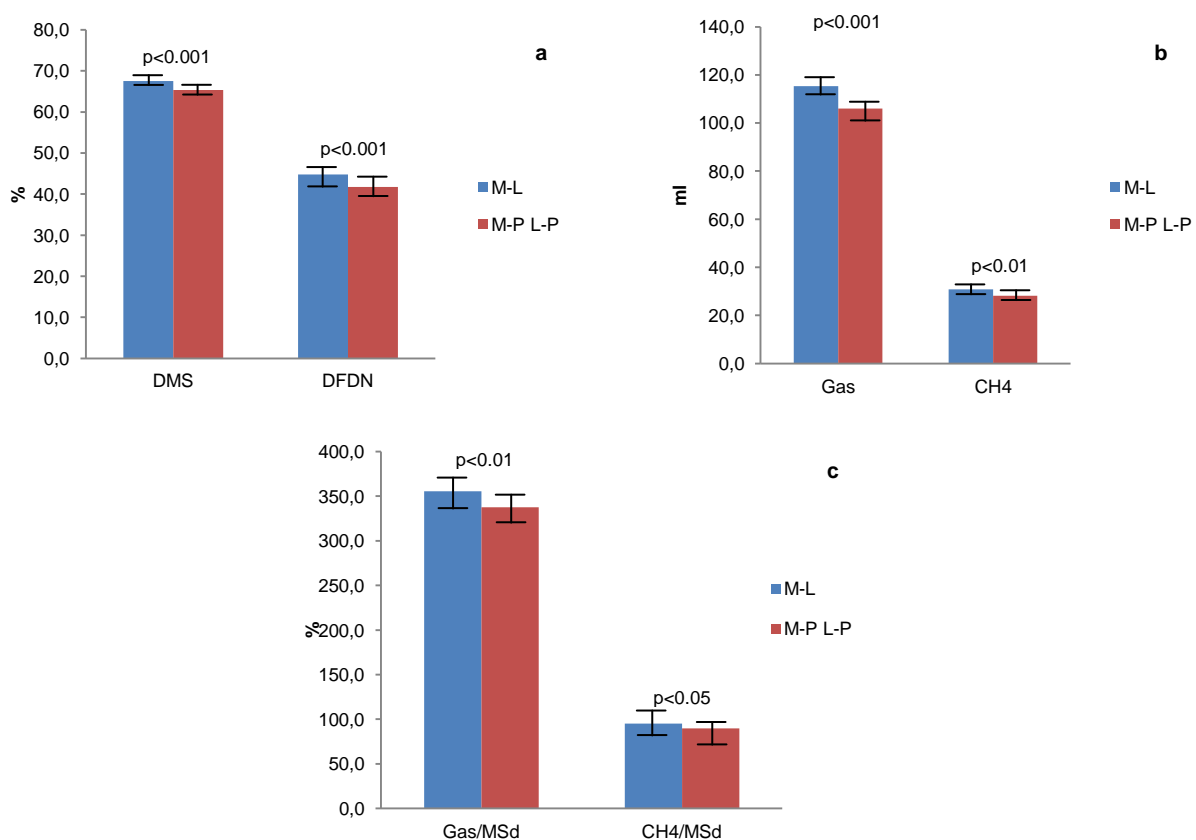
con el de soya (alta proporción de **18:2<sub>c9 c12</sub>**) y similares a un control sin grasa (Vargas, *et al.*, 2011). Machmüller, *et al.*, (2000) reportaron valores mayores para la degradación de la **FDN** *in vivo* cuando se suplementó aceite de linaza que cuando se suplementa con aceite de girasol (rico en **18:2<sub>c9 c12</sub>**) (47.7 vs 41.7%). Sin embargo, en el estudio previamente citado esas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Un menor impacto negativo como consecuencia de la adición de linaza (un aceite altamente insaturado) respecto al de maíz (menos insaturado) contradice la hipótesis tradicional que postula que al aumentar el grado de insaturación de los **AG** de cadena larga se afecta de manera más importante la fermentación ruminal (Palmquist, 1980; Palmquist y Jenkins, 1984). Dichos efectos han sido tradicionalmente evaluados en sistemas de producción basados en dietas **TMR**, las cuales resultan formuladas con altas proporciones de alimentos que contienen **18:2<sub>c9 c12</sub>** (granos, ensilaje de maíz, tortas de oleaginosas). En los sistemas pastoriles, el forraje constituye el componente principal de la dieta, con menores niveles de **AG** los que resultan a su vez altamente insaturados con importantes proporciones de **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**. (Dewhurst, *et al.*, 2001; De la Vega, 2011; De la Vega, 2012). En estas condiciones puede especularse que los microorganismos del rumen están naturalmente adaptados al **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** y sus productos de **BH** y no al **18:2<sub>c9 c12</sub>** y sus productos de **BH**. Las rutas metabólicas de estos dos **AG** no son sensiblemente diferentes, pero el **18:2<sub>c9 c12</sub>** produce mayores acumulaciones de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub>** conjugado que el **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**. Adicionalmente este último tiene más intermediarios que posiblemente son menos tóxicos o al producirse mayor cantidad de compuestos a menores concentraciones no se alcanzan los niveles que generarían toxicidad en los microorganismos.



**Figura 2.4** Promedio de la degradación de la **FDN** (**DFDN**) para el tratamiento con aceite de maíz (**M**) y el tratamiento con aceite de linaza (**L**)

### 2.4.5 Mezclas de aceite ricos en AG poliinsaturados (M-L) vs mezclas que contienen AG poliinsaturados y 12:0 (M-P y L-P)

Las respuestas observadas de las mezclas se explicaron principalmente por el efecto de la sumatoria parcial de los efectos principales de los aceites puros. Esto sugiere que no hubo interacciones debido a la mezcla de aceites y que la respuesta en los parámetros de fermentación podría predecirse por la participación de cada **AG** en la mezcla. En este sentido, y en coherencia a los resultados expuestos previamente, las mezclas que contenían **P** comprometieron más la degradación ruminal de la **MS** y de la fibra que aquellas que no lo contenían (figura 2.5). Como se ha discutido previamente, los aceites ricos en **12:0** y **14:0** y sus formas puras han sido reportados como nocivos para diferentes poblaciones de microorganismos asociados a la fermentación y a la producción de **CH<sub>4</sub>** comparados con aceites ricos en **AG** poliinsaturados (Henderson, 1973; Tesfa, 1993; Machmüller, *et al.*, 2000; Machmüller, *et al.*, 2006; Eugene, *et al.*, 2008; Beauchemin, *et al.*, 2008; Martín, *et al.*, 2010; Patra y Yu, 2013; Patra, 2013; Patra, 2014).



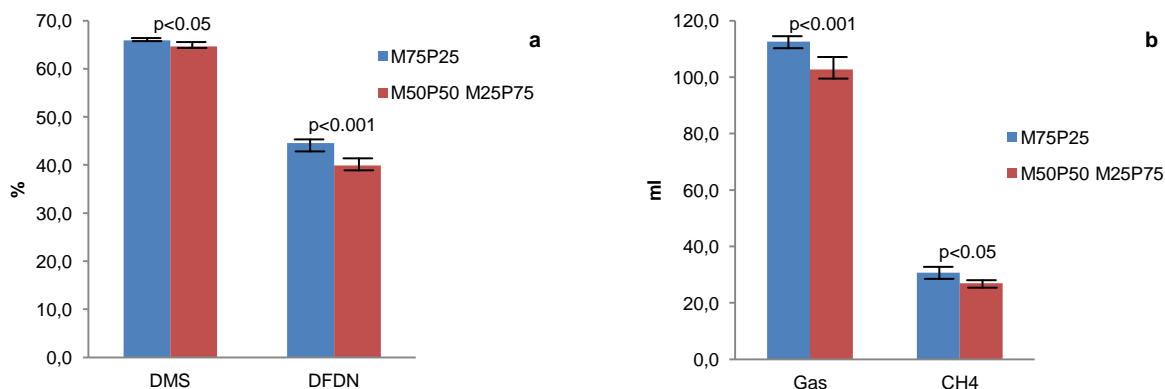
**Figura 2.5** Promedio de: a) Degradación de la **MS** (**DMS**) y de la **FDN** (**DFDN**); b) Producción total de gas y **CH<sub>4</sub>**; c) Producción de gas y **CH<sub>4</sub>** por unidad de **MS** degradada para los tratamientos de mezclas de aceite de maíz y aceite de linaza (**M-L**) y los tratamientos con mezclas de maíz y palmiste (**M-P**) y linaza y palmiste (**L-P**)

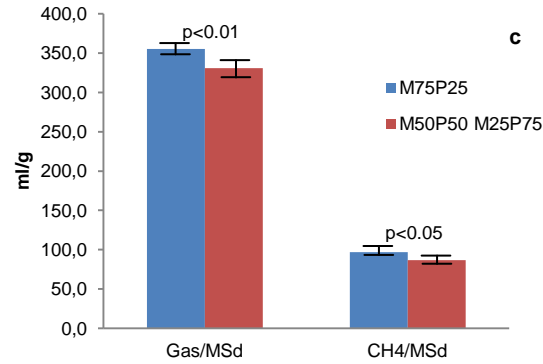
#### 2.4.6 Mezclas de aceite rico en 18:2<sub>c9 c12</sub> y aceite rico en 12:0 vs mezclas de aceite rico en ácido 18:3<sub>c9 c12 c15</sub> y aceite rico en 12:0 (Mezclas M-P vs mezclas L-P), Mezclas ricas en 18:2<sub>c9 c12</sub> y 18:3<sub>c9 c12 c15</sub> (M<sub>75</sub>L<sub>25</sub> vs M<sub>50</sub>L<sub>50</sub> y M<sub>25</sub>L<sub>75</sub>; M<sub>50</sub>L<sub>50</sub> vs M<sub>25</sub>L<sub>75</sub>)

Una de nuestras hipótesis era que mezclar los aceites generaría respuestas diferenciales debido a que su composición de **AG** era diferente. Sin embargo, mezclar **M** o **L** con **P** no produjo diferencias en la fermentación o la producción de **CH<sub>4</sub>**. Lo mismo ocurrió cuando se compararon diferentes proporciones de mezclas de **M** con **L**. Kim, *et al.*, (2007) tampoco encontraron diferencias en la digestibilidad de la dieta y el perfil de **AG** en el fluido ruminal al alimentar carneros con dietas que variaban en las relaciones de ω 3: ω 6.

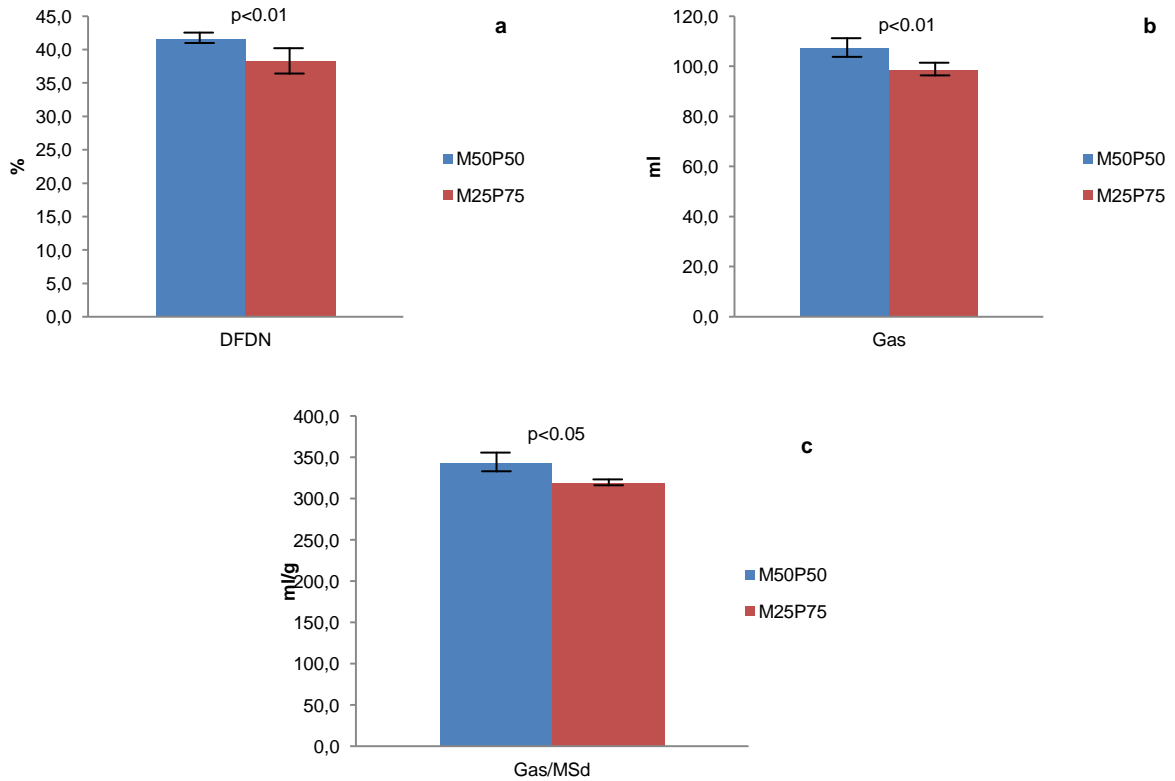
#### 2.4.7 Mezclas ricas en 18:2<sub>c9 c12</sub> y 12:0 en diferentes proporciones (M<sub>75</sub>P<sub>25</sub> vs M<sub>50</sub>P<sub>50</sub> y M<sub>25</sub>P<sub>75</sub>; M<sub>50</sub>P<sub>50</sub> vs M<sub>25</sub>P<sub>75</sub>)

Se encontró una menor degradación de fibra, menor producción de gas y **CH<sub>4</sub>** al aumentar la participación de **P** en la mezcla con **M** (figuras 2.6 y 2.7). Esto se explica por un mayor efecto del **12:0** y **14:0** vs el **18:2<sub>c9 c12</sub>** sobre los microorganismos fibrolíticos y metanogénicos (Henderson, 1973; Tesfa, 1993; Soliva *et al.*, 2003; Beauchemin, *et al.*, 2008; Martín, *et al.*, 2010; Patra y Yu, 2013; Patra, 2013; Patra, 2014).





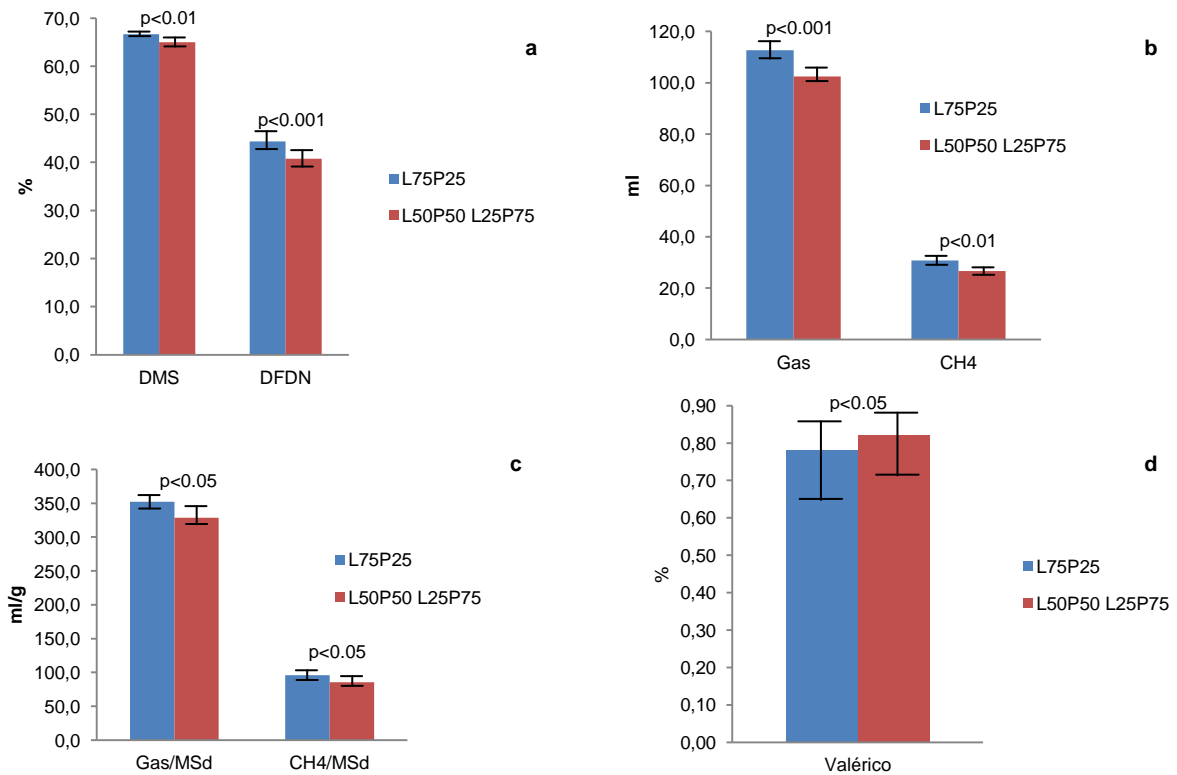
**Figura 2.6** Promedio de: a) Degradación de la *MS* (*DMS*) y de la *FDN* (*DFDN*); b) Producción total de gas y *CH*<sub>4</sub>; c) Producción de gas y *CH*<sub>4</sub> por unidad de *MS* degradada para los tratamientos con maíz:palmiste (*M*<sub>75</sub>*P*<sub>25</sub>) y para los tratamientos con maíz:palmiste (*M*<sub>50</sub>*P*<sub>50</sub>) y maíz:palmiste (*M*<sub>25</sub>*P*<sub>75</sub>)



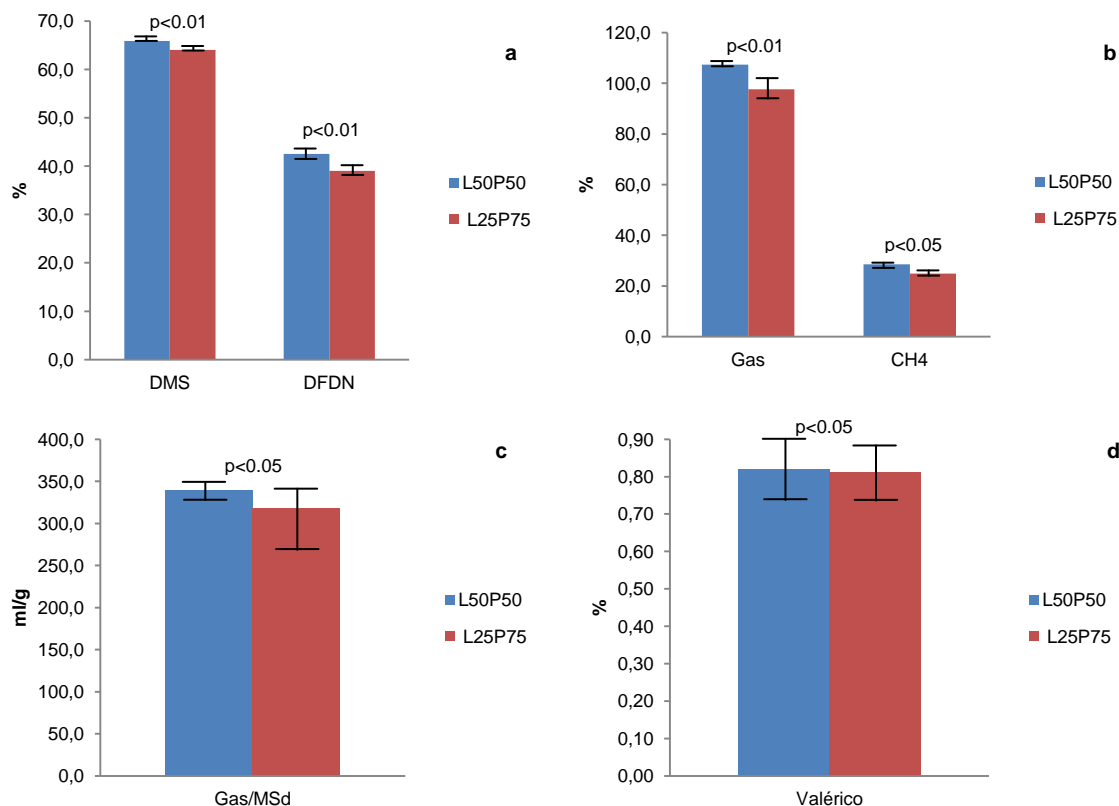
**Figura 2.7** Promedio de: a) Degradación de la *FDN* (*DFDN*); b) Producción total de gas y c) Producción de gas por unidad de *MS* degradada para los tratamientos los tratamientos con maíz:palmiste (*M*<sub>50</sub>*P*<sub>50</sub>) y maíz:palmiste (*M*<sub>25</sub>*P*<sub>75</sub>)

### 2.4.8 Mezclas ricas en 18:3<sub>c9 c12 c15</sub> y 12:0 en diferentes proporciones (L<sub>75</sub>P<sub>25</sub> vs L<sub>50</sub>P<sub>50</sub> y L<sub>25</sub>P<sub>75</sub>; L<sub>50</sub>P<sub>50</sub> vs L<sub>25</sub>P<sub>75</sub>)

La menor producción total de gas, **CH<sub>4</sub>** y proporción de ácido valérico (mmoles/100 mmoles de **AGV**) observada con la participación creciente de **P** en las mezclas (figuras 2.8 y 2.9) se debería a un mayor efecto del **12:0** y **14:0** vs el **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** sobre los microorganismos fibrolíticos y metanogénicos (Henderson, 1973; Tesfa, 1993; Machmüller, *et al.*, 2000; Machmüller, *et al.*, 2006; Eugene, *et al.*, 2008; Beauchemin, *et al.*, 2008; Martín, *et al.*, 2010; Patra y Yu, 2013; Patra, 2013; Patra, 2014). Si bien, la proporción de ácido valérico estuvo afectada por las proporciones de **P** en la dieta, sus cambios no revisten importancia biológica.



**Figura 2.8** Promedio de: a) Degradación de la **MS** (**DMS**) y de la **FDN** (**DFDN**); b) Producción total de gas y **CH<sub>4</sub>**; c) Producción de gas y **CH<sub>4</sub>** por unidad de **MS** degradada d) proporción de ácido valérico para los tratamientos con linaza:palmiste (**L<sub>75</sub>P<sub>25</sub>**) y para los tratamientos con linaza:palmiste (**L<sub>50</sub>P<sub>50</sub>**) y linaza:palmiste (**L<sub>25</sub>P<sub>75</sub>**)



**Figura 2.9** Promedio de: a) Degradación de la **MS** (**DMS**) y de la **FDN** (**DFDN**); b) Producción total de gas y **CH<sub>4</sub>**; c) Producción de gas por unidad de **MS** degradada; d) proporción de ácido valérico para los tratamientos con linaza:palmiste (**L<sub>50</sub>P<sub>50</sub>**) y linaza:palmiste (**L<sub>25</sub>P<sub>75</sub>**)

## 2.5 Conclusiones

La inclusión de aceites vegetales al 3% de la **MS** del sustrato incubado con diferentes perfiles de **AG** en un sistema ruminal *in vitro* disminuyó la degradación de la **MS**, la fibra, la producción de gas y de **CH<sub>4</sub>**. El **P** (rico en **12:0** y **14:0**) generó una mayor disminución en la degradación de la **MS**, de la fibra y la producción de gas y **CH<sub>4</sub>** comparado al **M** (rico en **18:2<sub>c9 c12</sub>**) y al **L** (rico en **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**) debido a un mayor efecto antimicrobiano. La degradación de la fibra presentó un efecto asociativo positivo para las mezclas comparadas con los aceites puros explicados por la dilución de los **AG** más tóxicos (**12:0** y **14:0**). La inclusión de **P** en una mezcla de aceites aun en bajas cantidades es un mecanismo potente para la disminución de la degradación de la **MS**, de la fibra, la producción de gas y **CH<sub>4</sub>**. Sin embargo, esta reducción en la degradación de la **MS** y la consecuente disminución en la producción de **CH<sub>4</sub>** con la adición de **P** tendrían

probablemente impactos negativos sobre la productividad animal que merecen ser evaluados experimentalmente.

## 2.6 Agradecimientos

A la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá por el apoyo económico para la elaboración de este trabajo. Al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia -UNAL Bogotá-, al Laboratorio de Biotecnología Ruminal -UNAL Medellín- y al Grupo de Investigación en Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia -UNAL Bogotá- por su apoyo en los análisis de laboratorio.

## 2.7 Referencias bibliográficas

AFSHAR, M.A. y NASER, M.S. 2011. Factors affecting mitigation of methane emission from ruminants. I: Feeding strategies. *Asian J Anim Vet Adv.* 6(9): 888-908.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 2006. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18 ed. Chapter 4: Animal Feed. USA:WENDT THIEX NJ.

BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M. y PETIT, H. 2007. Methane abatement strategies for cattle: lipid supplementation of diets. *Can J Anim Sci* 87(3):431–440.

BEAUCHEMIN, K. A.; KREUSER, M.; O'MARA, F. y MCALLISTER, T. T. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust J Exp Agri.* 48(2): 21-27.

BOADI, D.; BENCHAAAR, C.; CHIQUETTE, J. y MASSÉ, D. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Can J Anim Sci.* 84(3):319-335.

CASTRO, E.; MOJICA, J. E.; LEÓN, J. M.; PABÓN, M. L.; CARULLA, J. E. y CÁRDENAS, E. A. 2008. Productividad de pasturas y producción de leche bovina bajo pastoreo de gramínea y gramínea + *Lotus uliginosus* en Mosquera, Colombia. *Rev Med Vet Zoot.* 55:9-21.

CHRISTIE, W. W. 1993. Advances in Lipid Methodology – Two. Ed. W.W. Christie, Oily Press, Dundee. Págs 69-111.

COOK, C. W. 1964. Symposium on nutrition forages and pastures: Collecting forage samples representative of ingested material of grazing animals for nutritional studies. *J Anim Sci.* 23(1):265-270.

DE LA VEGA, E.; LEÓN, J.M; PARALES, J.E.; DIAZ, G.J.; PABÓN, M.L. y CARULLA, J.E. 2011. Identification of regions that produce milk rich in conjugated linoleic acid (CLA) a bioactive compound beneficial to human health in Colombia. *48a Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Belém – PA, Brasil 18 a 21 de Julio.

DE LA VEGA, E.A.; PARALES, J.E.; MENDOZA, C.A.; KNOWLES, M.M.; DÍAZ, G.J.; PABÓN, M.L. y CARULLA, J.E. 2012. Nutritional characterization of pastures used in Colombian dairies with emphasis on fatty acid profile (Abstract). *ADSA-AMPA-ASAS-CSAS-WSASAS. Joint Annual Meeting*, Phoenix – AR, USA.

DEMEYER, D.I. 1981. Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agric Environ.* 6(2-3):295–337.

DOHME, F.; MACHMÜLLER, A.; WASSERFALLEN, A. y KREUZER, M. 2000. Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. *Can J Anim Sci.* 80(3):473–484.

DONG, Y.; BAE, H.D.; McALLISTER, T.A.; MATHISON, G.W. y CHENG, K.J. 1997. Lipid-induced depression of methane production and digestibility in the artificial rumen system (RUSITEC). *Can J Anim Sci.* 77(2):269-278.

ELLIS, J.L.; DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E.; BANNINK, A.; ODONGO, N.E.; McBRIDE, B.W. y FRANCE, J. 2008. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. *J Agr Sci.* 146(Special Issue 02):213-233.

EUGENE, M.; MASSE, D.; CHIQUETTE, J. y BENCHAAAR, C. 2008. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Can J Anim Sci.* 88(2):331-334.

GARCÉS, R. y MANCHA, M. 1993. One step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal Biochem.* 211(1):139-143.

GIGER-RIVERDIN, S.; MORAND-FEHR, P. y TRAN, G. 2003. Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. *Livest Prod Sci* 82(1):73–79.

HENDERSON, C. 1973. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. *J Agri Sci.* 81(1):107-112.

HOOK, S. E.; WRIGHT A. D. G. y MCBRIDE B.W. 2010. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea.* 2010(2010):1-11.

KIM, S.C.; ADESOGAN, A.T.; BADINGA, L. y STAPLES, R.C. 2007. Effects of dietary n-6:n-3 fatty acid ratio on feed intake, digestibility, and fatty acid profiles of the ruminal contents, liver, and muscle of growing lambs. *J Anim Sci.* 85(3):706-716.

LÓPEZ, S. y NEWBOLD, C.J. 2007. Measuring methane emission of ruminants by *in vitro* and *in vivo* techniques, en : *Measuring Methane Production from Ruminants*, Harinder P.S.; Vercoe Makkar, Philip E. (Eds.). Vienna, Austria: Springer. Págs 1-13.

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A.; WANNER, M. y KREUZER, M. 1998. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation *in vitro* (Rusitec). *Anim Feed Sci Technol.* 71(1-2):117–130.

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A. y M. KREUZER, M. 2000. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. *Anim Feed Sci Technol.* 85(1-2):41–60.

MACHMÜLLER, A.; SOLIVA, C. R. y KREUZER, M. 2003. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reprod Nutr Dev.* 43(1): 41-55.

MACHMÜLLER, A. 2006. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Agric Ecos Envir* (2-3)112:107-114.

MAIA, F.J.; BRANCO, A.F.; MOURO, G.F.; CONEGLIAN, S.M.; SANTOS, G.T.; MINELLA, T.F. y GUIMARÃES, K.C. 2006. Inclusão de fontes de óleo na dieta de cabras em lactação: digestibilidade dos nutrientes e parâmetros ruminais e sanguíneos. *Rev Bras Zootec.* 35(4) 1496-1503.

MARGARIDA, M.R.; CHAUDHARY, L.C.; FIQUERES, L. y WALLACE, R.J. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91(4):303-14.

MARTIN, C.; ROUEL, J.; JOUANY, J.P.; DOREAU, M. y CHILLIARD, Y. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *J Anim Sci.* 86(10): 2642-2650.

MARTIN C.; MORGAVI D. P. y DOREAU, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* 4(3):351-365.

McGINN, S.M.; BEAUCHEMIN K.A.; COATES, T. y COLOMBATO, D. 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast and fumaric acid. *J Anim Sci.* 82(11): 3346-3356.

NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J. y DEMEYER, D.I. 1997. Manipulation of ruminal fermentation, en: Rumen Microbial Ecosystem. Hobson, N. y Stewart C.S. (Eds.), Blackie Academic and Professional, London, UK (1997), pp. 523-623

NEWBOLD, C.J.; MOSS, A.R. y MOLLINSON, G.S.; 1996. The effect of dietary fat on methane production in sheep and cattle, en: Proceedings of the British Society of Animal Science, 18–20. Scarborough, UK. Págs 182.

PALMQUIST, D. L. y JENKINS, T.C. 1980. Fat in lactation rations: review. *J Dairy Sci.* 63(1): 1-14.

PALMQUIST, D.L. 1984. Use of fats in diets for lactating dairy cows. Chap. 18 en Fats in Animal Nutrition. J. Wiseman, (Ed). Butterworths, London, England. Págs 357-381.

PATRA, A.K. 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. *Livest Sci.* 155(2-3):244–254.

PATRA, A.K. 2014. A meta-analysis of the effect of dietary fat on enteric methane production, digestibility and rumen fermentation in sheep, and a comparison of these responses between cattle and sheep. *Livest Sci.* 167:97-103.

PATRA, A.K. y YU, Z. 2013. Effects of coconut and fish oils on methane production, fermentation, abundance and diversity of rumen microbial populations *in vitro*. *J Dairy Sci.* 96 (3):1782-1792.

SAS. 1998. SAS User's Guide: Statistics (Version 8); Cary NC: the Institute.

SOLIVA, C.R.; HINDRICHSEN, I.K.; MEILE, L.; KREUZER, M. y MACHMÜLLER, A. 2003. Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis *in vitro*. *Lett Appl Microbiol.* 37:35-39.

STEEL, R. G. D. y TORRIE, J. H. 1980. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 2<sup>nd</sup> edition. McGraw-Hill Book Company, New York, NY, USA. Págs 633.

TESFA, A. T. 1992. Effects of rapeseed oil on rumen enzyme activity and in sacco degradation of grass silage. *Anim Feed Sci Technol.* 36(1-2): 77-89.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; MEALLAN, A. B. y FRANCE, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol.* 48(3-4):185-197.

TORRENT. J. y JOHNSON D. E. 1994. Methane production in the large intestine of sheep. In Aguilera JF, eds. Energy metabolism of farm animals. EAAP Publication N°. 76. CSIC. Publishing Service. Granada, Spain. Págs 391-394.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. y LEWIS, B. 1991. Methods for dietary fiber, neutral fiber and no starch polysaccharides in relation to nutrition. *J Dairy Sci.* 74(10): 3583-3597.

VAN SOEST, P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2<sup>nd</sup> edition. Cornell University Press. USA. Págs 253-316.

VARGAS, J.E.; ANDRÉS, S. YAÑEZ RUIZ, D.R. y LÓPEZ, S. 2011. The effect of olive, sunflower or linseed oils on the fermentation pattern and methane production in the rumen simulating technique. En Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context. Ranilla, M.J., Carro, M.D., Ben Salem, H., Morand-Fehr, P. (Eds). Zaragoza: CIHEAM / CSIC / Universidad de León / FAO. Págs 163-168

YABUUCHI, Y.; MATSUSHITA, Y.; OTSUKA, H.; FUKAMACHI, K. y KOBAYASHI, Y. 2006. Effects of supplemental lauric acid-rich oils in high-grain diet on *in vitro* rumen fermentation. *Anim sci J.* 77(3):300-307.

YAMASAKI, M.; KISHIHARA, K.; IKEDA, I.; SUGANO, M. y YAMADA, K. 1999. A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugated linoleic acid. *J Am Oil Chem Soc.* 76(8):933-938.

YANG, S.L.; BU, D.P.; WANG, J.Q.; HU, Z.Y.; LI, D.; WEI, H.Y.; ZHOU, L.Y. y LOOR, J.J. 2009. Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal*. 3(11):1562–1569.

ZHANG, C.M.; GUO, Y.Q.; YUAN, Z.P.; WU, Y.M.; WANG, J.K.; LIU, J.X. y ZHU, W.Y. 2008. Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora *in vitro*. *Anim Feed Sci Technol*. 146(3-4) 259-269.

ZEITZ, J.O.; BUCHER, S.; ZHOU, X.; MEILE, L.; KREUZER, M. y SOLIVA, C.R. 2013. Inhibitory effects of saturated fatty acids on methane production by methanogenic Archaea. *J Anim Feed Sci*. 22(1):44-49.

### 3. Inclusión de aceites de maíz, linaza o palmiste y sus mezclas en un sistema *in vitro*: efectos sobre el perfil de ácidos grasos

### Inclusion of corn, linseed or palm kernel oil and their mixtures in an *in vitro* system: effects on fatty acid profile

J. Parales<sup>1,2</sup>, M. Pabón<sup>1</sup>, J. Carulla<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Nutrición Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. E-mail: [jecarullaf@unal.edu.co](mailto:jecarullaf@unal.edu.co)

<sup>2</sup>MSc(c) Salud y Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. E-mail [jeparalesg@unal.edu.co](mailto:jeparalesg@unal.edu.co)

<sup>3</sup>Profesor Titular. Departamento de Producción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. E-mail: [jecarullaf@unal.edu.co](mailto:jecarullaf@unal.edu.co)

#### Resumen

Se determinó el efecto de la inclusión de aceites de maíz (**M**), linaza (**L**), palmiste (**P**) puros y sus mezclas sobre el perfil de ácidos grasos (**AG**) del fluido ruminal en un sistema *in vitro*. Se evaluaron un tratamiento control sin adición de aceite, los aceites puros y las mezclas **M-L**, **M-P** y **L-P** en las proporciones 75:25, 50:50 y 25:75 para un total de 13 tratamientos. Treinta y nueve tubos de PVC de 100 ml con 350 mg de *Cenchrus clandestinus* y 150 mg de concentrado, con o sin adición de 15 µl de los aceites o sus mezclas fueron incubados con 50 ml de fluido ruminal y medio de cultivo en una relación 1:4. A la hora 9 de incubación, se detuvo la actividad microbiana y el contenido de cada

uno de los tubos se transfirió a frascos de vidrio, se congeló y liofilizó. En el material liofilizado se determinó el perfil de **AG** por cromatografía de gases (**CG**). Se empleó un modelo de bloques completamente al azar generalizado con contrastes ortogonales para evaluar el efecto de los tratamientos sobre las proporciones de **AG**. La adición de aceites modificó el perfil de la mayoría de los **AG** y disminuyó la cantidad de **AG** impares y *trans* con excepción del **19:0** y de los de 18 carbonos ( $p < 0.001$ ). La adición de **M** y **L** comparada con **P** generó un aumento en las proporciones de **18:1<sub>t11</sub>** (**M** y **L**: 21.07 vs **P**: 12.32;  $p < 0.001$ ), **18:2<sub>c9 t11</sub>** (**M** y **L**: 2.23 vs **P**: 0.82;  $p < 0.001$ ), **18:2<sub>t10 c12</sub>** (**M** y **L**: 1.67 vs **P**: 0.39;  $p < 0.001$ ) y menores para **12:0** (**M** y **L**: 0.09 vs **P**: 6.14;  $p < 0.001$ ), **14:0** (**M** y **L**: 0.12 vs **P**: 3.87;  $p < 0.001$ ) y **16:0** (**M** y **L**: 11.71 vs **P**: 14.85;  $p < 0.001$ ). La adición de **M** comparado con **L** produjo mayores proporciones de **18:1<sub>t11</sub>** (**M**: 24.06 vs **L**: 18.07;  $p < 0.001$ ), **18:2<sub>c9 t11</sub>** (**M**: 3.04 vs **L**: 1.42;  $p < 0.001$ ) y disminuyó la de **18:2<sub>t10 c12</sub>** (**M**: 0.48 vs **L**: 2.85;  $p < 0.001$ ). Las mezclas de aceites produjeron proporciones diferentes para la mayoría de los **AG** comparado a los aceites puros. La inclusión de 25% de **P** a una mezcla con **M** o **L** produjo mayores proporciones de **18:2<sub>c9 c12</sub>** (**M<sub>75</sub>P<sub>25</sub>**: 7.83 vs **M<sub>50</sub>P<sub>50</sub>** y **M<sub>25</sub>P<sub>75</sub>**: 5.17;  $p < 0.05$ ) y de **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** (**L<sub>75</sub>P<sub>25</sub>**: 6.95 vs **L<sub>50</sub>P<sub>50</sub>** y **L<sub>25</sub>P<sub>75</sub>**: 5.27;  $p < 0.05$ ) respectivamente. La adición de aceites disminuyó la actividad microbiana explicada por la reducción en la proporción de **AG** impares. Las mezclas de aceites tuvieron efectos asociativos positivos sobre la proporción de algunos **AG**. La adición de **P** disminuyó la biohidrogenación (**BH**) del **18:2<sub>c9 c12</sub>** y del **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**.

**Palabras clave:** adición, biohidrogenación (**BH**), proporción

## Abstract

The effect of the inclusion of corn oil (**CO**), linseed oil (**LO**) or palm kernel oil (**PKO**) and their mixtures on the fatty acid (**FA**) profile in a ruminal *in vitro* system was evaluated. A control (**C**) without addition of oil, pure oils and their mixtures **CO-LO**, **CO-PKO** and **LO-PKO** in different proportions (75:25, 50:50 and 25:75) for a total of 13 treatments were evaluated. Thirty-nine PVC tubes of 100 ml with 350 mg of *Cenchrus clandestinus* and 150 mg of concentrate, with or without the addition of 15 µl of oils or their mixtures were incubated with 50 ml of ruminal fluid and culture medium in a 1:4 ratio. After 9 hour of incubation, microbial activity was stopped and the content of each of the tubes was

transferred to glass bottles, frozen and freeze dried. **FA** profile was determined to the freeze dried material by gas chromatography (**GC**). A completely randomized block generalized model with orthogonal contrasts was used to assess the effect of treatments on the proportions of **FA**. The addition of oils changed the profile of the majority of the **FA** and decreased the amount of odd and *trans* **FA** except **19:0** and the eighteen-carbons ( $p < 0.001$ ). The addition of **CO** and **LO** compared to **PKO** increased the proportions of **18:1<sub>t11</sub>** (**CO** and **LO**: 21.07 vs **PKO**: 12.32;  $p < 0.001$ ), **18:2<sub>c9 t11</sub>** (**CO** and **LO**: 2.23 vs **PKO**: 0.82;  $p < 0.001$ ), **18:2<sub>t10 c12</sub>** (**CO** and **LO**: 1.67 vs **PKO**: 0.39;  $p < 0.001$ ) and **12:0** (**CO** and **LO**: 0.09 vs **PKO**: 6.14;  $p < 0.001$ ), **14:0** (**CO** and **LO**: 0.12 vs **PKO**: 3.87,  $p < 0.001$ ) and **16:0** (**CO** and **LO**: 11.71 vs **PKO**: 14.85,  $p < 0.001$ ). The addition of **CO** compared with **LO** produced higher proportions of **18:1<sub>t11</sub>** (**CO**: 24.06 vs **LO**: 18.07,  $p < 0.001$ ), **18:2<sub>c9 t11</sub>** (**CO**: 3.04 vs **LO**: 1.42;  $p < 0.001$ ) and decreased that of **18:2<sub>t10 c12</sub>** (**CO**: 0.48 vs 2.85 **LO**:  $p < 0.001$ ). Mixtures of oils produced different proportions for the majority of the **FA** compared to pure oils. The inclusion of 25% of **PKO** in the mixture with **CO** or **LO** produced higher proportions of, **18:2<sub>c9 c12</sub>** (**M<sub>75</sub>P<sub>25</sub>**: 7.83 vs **M<sub>50</sub>P<sub>50</sub>** and **M<sub>25</sub>P<sub>75</sub>**: 5.17;  $p < 0.05$ ) and **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** (**L<sub>75</sub>P<sub>25</sub>**: 6.95 vs. **L<sub>50</sub>P<sub>50</sub>** and **L<sub>25</sub>P<sub>75</sub>**: 5.27;  $p < 0.05$ ) respectively. The addition of oils reduced microbial activity explained by a decrease in the proportion of odd **FA**. Mixtures of oils had associative effects on proportion of some **FA** In ruminal fluid. The addition of **PKO** reduced the biohydrogenation (**BH**) of **18:2<sub>c9 c12</sub>** and **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**.

**Keywords:** adición, biohydrogenation (**BH**), proportion

### Abreviaturas

**AG:** ácido graso. **ALC:** ácido linoleico conjugado. **BH:** biohidrogenación. **C:** control sin inclusión de aceite. **CG:** cromatografía de gases. **CNE:** carbohidratos no estructurales. **EE:** extracto etéreo. **FDN:** fibra en detergente neutro. **FDA:** fibra en detergente ácido. **L:** aceite de linaza. **L<sub>25</sub>P<sub>75</sub>:** mezcla de 25% de aceite de linaza y 75% de aceite de palmiste. **L<sub>50</sub>P<sub>50</sub>:** mezcla de 50% de aceite de linaza y 50% de aceite de palmiste. **L<sub>75</sub>P<sub>25</sub>:** mezcla de 75% de aceite de linaza y 25% de aceite de palmiste. **M:** aceite de maíz. **M<sub>25</sub>L<sub>75</sub>:** mezcla de 25% de aceite de maíz y 75% de aceite de linaza. **M<sub>50</sub>L<sub>50</sub>:** mezcla de 50% de aceite de maíz y 50% de aceite de linaza. **M<sub>75</sub>L<sub>25</sub>:** mezcla de 75% de aceite de maíz y 25% de aceite de linaza. **M<sub>25</sub>P<sub>75</sub>:** mezcla de 25% de aceite de maíz y 75% de aceite de palmiste. **M<sub>50</sub>P<sub>50</sub>:** mezcla de 50% de aceite de maíz y 50% de aceite de palmiste. **M<sub>75</sub>P<sub>25</sub>:** mezcla de

75% de aceite de maíz y 25% de aceite de palmiste. **MS**: materia seca. **P**: aceite de palmiste. **PC**: proteína cruda.

### 3.1 Introducción

En experimentos *in vitro* e *in vivo* la adición de aceites ricos en ácido linoleico (**18:2<sub>c9 c12</sub>**) y linolénico (**18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**) ha incrementado las proporciones de ácido trans-vaccénico (**18:1<sub>t11</sub>**) y ácido linoleico conjugado (**18:2<sub>c9 t11</sub> ALC**) en el medio de cultivo o en fluido ruminal (Chouinard, *et al.*, 2001; Agazzi, *et al.*, 2004; AbuGhazaleh, *et al.* 2007).

La proporción de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la grasa láctea está relacionada con la proporción de los **AG** presentes en los aceites suplementados (Stanton, *et al.*, 2003). Los aceites ricos en **18:2<sub>c9 c12</sub>** (maíz, girasol, soya) generan mayores incrementos en la proporción de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la leche comparados con los que tienen altas proporciones de **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** (linaza) y **18:1<sub>c9</sub>** (oliva, colza) (Kelly, *et al.*, 1998; Dhiman, *et al.*, 2000; Stanton, *et al.*, 2003; Collomb, *et al.*, 2004a; Collomb, *et al.*, 2004b; Zhang, *et al.*, 2006; Bu, *et al.*, 2007; Matsushita, *et al.*, 2007; Stoffel, *et al.*, 2015). En sistemas *in vitro*, la adición de aceite de girasol incrementa las proporciones de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** comparado con aceite de linaza (Loor, *et al.*, 2005) y este comportamiento también ha sido evidenciado con el uso de **AG** puros (Castillo, 2012).

La inclusión de aceites ricos en ácido láurico (**12:0**) y mirístico (**14:0**) como los de coco y palmiste disminuye el conteo de microorganismos involucrados en las rutas de biohidrogenación (**BH**) como *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fusocillus spp* y de algunos protozoarios (Jensen, 2002; Moate, *et al.*, 2008; Doreau y Chilliard, 1997; Jenkins, *et al.*, 2008; Vlaeminck, *et al.*, 2008) afectando la **BH** de los **AG 18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**. El uso de aceites vegetales como el de coco y palmiste (ricos en **12:0** y **14:0**) en la alimentación animal podría tener un efecto negativo sobre la calidad de la leche, ya que inclusiones elevadas de estos recursos incrementan la proporción de **12:0** y **14:0** en el rumen y su posterior incorporación en leche (Storry, *et al.*, 1971; Hermansen, 1995; Hristov, *et al.*, 2009).

Nuestra hipótesis es que los mecanismos que causan la modificación del perfil de **AG** en el fluido ruminal debido a la adición de aceites con diferentes perfiles de **AG** son distintos, por lo cual podríamos encontrar sinergias (efectos asociativos positivos) cuando estos se mezclan. Esto es que el incremento de **AG** de interés biológico (**18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>**, **18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**) y la reducción de otros nocivos para la salud humana (**12:0**, **14:0**, **16:0**) debido a la mezcla será mayor que el efecto de la sumatoria de los efectos parciales de los aceites puros. El objetivo de este ensayo fue determinar el efecto de la adición de aceites vegetales (maíz, linaza o palmiste) y sus mezclas sobre el perfil de **AG** del fluido ruminal en un sistema *in vitro* a un sustrato de kikuyo + concentrado (relación 75:25).

## 3.2 Metodología

Todos los procedimientos fueron avalados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá (Acta 04 del año 2012).

### 3.2.1 Localización

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, localizado a 4° 38' 8" de latitud norte, 74° 4' 58" de longitud oeste y a una altitud de 2640 msnm y temperatura 14° C.

### 3.2.2 Tratamientos

Los tratamientos evaluados consistieron en un control sin adición de aceite y la adición de aceites puros o sus mezclas (tabla 3.1). Como sustrato a incubar se empleó un kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) de 60 días de rebrote, proveniente del Centro Agropecuario Marengo de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, fertilizado con el protocolo sugerido por Castro, *et al.*, (2008), para gramíneas en Sabana de Bogotá más un concentrado (tabla 2.2). El forraje a incubar fue tomado siguiendo la metodología "Hand plucking" descrita por Cook, (1964) y secado a 60° C durante 48 horas y se molió en un molino Romer® con una criba de 2 mm. El concentrado se procesó de la misma forma que el forraje.

**Tabla 3.1** Tratamientos

	<i>M</i>	<i>L</i>	<i>P</i>
	%		
<b>C</b>	0	0	0
<b>M<sub>100</sub></b>	100	0	0
<b>L<sub>100</sub></b>	0	100	0
<b>P<sub>100</sub></b>	0	0	100
<b>M<sub>75</sub>L<sub>25</sub></b>	75	25	0
<b>M<sub>50</sub>L<sub>50</sub></b>	50	50	0
<b>M<sub>25</sub>L<sub>75</sub></b>	25	75	0
<b>M<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b>	75	0	25
<b>M<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b>	50	0	50
<b>M<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>	25	0	75
<b>L<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b>	0	75	25
<b>L<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b>	0	50	50
<b>L<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>	0	25	75

**C:** control, **M:** aceite de maíz, **L:** aceite de linaza, **P:** aceite de palmiste

**Tabla 3.2.** Composición del concentrado

<b>Composición porcentual</b>	
<b>Ingrediente</b>	<b>% de la MS</b>
<b>Torta de soya 44</b>	38.10
<b>Maíz amarillo</b>	26.60
<b>Harina de yuca</b>	19.00
<b>Melaza</b>	10.00
<b>Carbonato de calcio</b>	3.96
<b>Mogolla</b>	2.30
<b>Premezcla mineral</b>	0.04

**Tabla 3.3** Composición química del forraje y concentrado

	<b>Concentrado</b>	<b>Kikuyo</b>
	% de la MS	
<b>Proteína cruda (PC)</b>	21.0	16.4
<b>Fibra en detergente neutro (FDN)</b>	17.3	48.8
<b>Fibra en detergente ácido (FDA)</b>	5.5	21.3
<b>Carbohidratos no estructurales (CNE)<sup>1</sup></b>	54.1	20.1
<b>Extracto etéreo (EE)</b>	0.6	3.4
<b>Cenizas</b>	7.0	11.3

<sup>1</sup>CNE=100-(FDN+PC+EE+cenizas).

**Tabla 3.4** Composición de **AG** de los alimentos utilizados (g/100 g de **AG**)

<b>AG</b>	<b>Kikuyo</b>	<b>Concentrado</b>
<b>8:0</b>	1.01	0,52
<b>10:0</b>	2.45	1.64
<b>12:0</b>	-	-
<b>14:0</b>	-	1.05
<b>14:1<sub>c9</sub></b>	-	-
<b>16:0</b>	29.91	14.51
<b>16:1<sub>c9</sub></b>	12.97	11.00
<b>16:1</b>	-	-
<b>18:0</b>	-	-
<b>18:1<sub>c9</sub></b>	-	14.60
<b>18:2<sub>t9 c12</sub></b>	-	-
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	10.41	38.45
<b>18:3<sub>c6 c9 c12</sub></b>	-	-
<b>18:3<sub>c9 c12 c15</sub></b>	37.06	14.36
<b>Otros</b>	6.18	3.86

### 3.2.3 Incubación

Se utilizaron tres tubos de PVC de 100 ml por tratamiento (39) y 3 como blanco para un total de 42 tubos. Los 39 tubos que contenían 350 mg de kikuyo y 150 mg de concentrado sin aceite (**C**) o con aceites o sus mezclas (15 µl) fueron incubados con 10 ml de fluido ruminal y 40 ml buffer McDougal (Tilley y Terry, 1963). El fluido ruminal fue extraído de un toro de la raza normando, el cual recibió una alimentación consistente en kikuyo y harina de maíz amarillo en una relación de 70:30 15 días previos al inicio del ensayo. Los tubos se gasificaron con **CO<sub>2</sub>**, se taparon y se pusieron en un baño de María a 39 °C, con agitación manual cada dos horas. Los tubos fueron retirados del baño de maría a las 9 horas de iniciada la incubación. La actividad microbiana se detuvo agregando 500 µl de HgCl<sub>2</sub> al 2% y con un shock térmico. El contenido de cada uno de los tubos se transfirió a frascos de vidrio de forma individual y se almacenó a -20 °C para su posterior liofilización. El fluido ruminal se liofilizó en un equipo CHRIST ® Alpha 1-4 D, a una presión de 0.0014 bares durante 48 horas y se determinó el perfil de **AG** mediante cromatografía de gases (**CG**). Este procedimiento fue duplicado en el tiempo.

### 3.2.4 Análisis químicos

El forraje y el concentrado se analizaron para **MS**, extracto etéreo (**EE**), cenizas, proteína cruda (**PC**) (AOAC, 2006b) fibra en detergente neutro (**FDN**), fibra en detergente ácido (**FDA**) (Van Soest, *et al.*, 1991). Los **AG** del forraje, el concentrado y las incubaciones se cuantificaron por **CG**. Para los aceites y sus mezclas se determinó el perfil de **AG** por **CG**.

### 3.2.5 Extracción de AG

Los **AG** del forraje, concentrado y fluido ruminal liofilizado se extrajeron por el método sugerido de Garcés y Mancha, (1993) adaptado por Yamasaki, *et al.*, (1999). Se pesaron 50 mg de forraje seco, concentrado o fluido ruminal liofilizado se agregaron 2150 µl de metanol absoluto, 990 µl de tolueno, 1000 µl de N,N-dimetilformamida, 66 µl de ácido sulfúrico al 99.9%, y 2 ml de n-hexano; la mezcla se colocó en un baño de María (2 horas a 80° C) y se dejó en reposo (5-10 minutos). El sobrenadante se evaporó mediante corriente de N y la muestra seca se reconstituyó con 300 µl de diclorometano para su posterior análisis por **CG**. La extracción de los **AG** en los aceites y sus mezclas se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Christie *et al.*, (1993).

### 3.2.6 Análisis de AG

Los **AG** del forraje, concentrado y fluido ruminal liofilizado fueron cuantificados por **CG** utilizando un cromatógrafo de gases marca Shimadzu® modelo GC-2014 con detector tipo FID y columna capilar de 100 m x 0.25 mm x 0.2 µm. Rt 2560 (Restek®). Se inyectaron 200 µl de la solución reconstituida con diclorometano. La temperatura del puerto de inyección y del puerto de detección fue de 260°C y 270°C respectivamente. La temperatura Inicial del horno fue de 140° C durante 5 minutos con un incremento de 4° C por minuto hasta llegar a 190° C y se mantuvo así hasta llegar a una duración total de 60 minutos. Se utilizó helio como gas de arrastre con una presión de 40.4 psi y un Split ratio de 1:100.

**Tabla 3.5** Perfil de **AG** de los aceites y sus mezclas (g/100 g de **AG**)

<b>AG</b>	<b>M<sub>100</sub></b>	<b>L<sub>100</sub></b>	<b>P<sub>100</sub></b>	<b>M<sub>75</sub>L<sub>25</sub></b>	<b>M<sub>50</sub>L<sub>50</sub></b>	<b>M<sub>25</sub>L<sub>75</sub></b>	<b>M<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b>	<b>M<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b>	<b>M<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>	<b>L<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b>	<b>L<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b>	<b>L<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>
<b>12:0</b>	0.00	0.01	35.29	0.05	0.01	0.01	8.40	17.65	25.47	7.83	17.65	26.07
<b>14:0</b>	0.13	0.11	11.61	0.10	0.12	0.12	2.91	5.87	8.74	2.99	5.86	8.74
<b>14:1<sub>c9</sub></b>	0.03	0.03	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.02
<b>16:0</b>	11.80	7.81	9.21	10.48	9.81	8.81	10.67	10.51	9.86	8.16	8.51	8,86
<b>16:1<sub>c9</sub></b>	0.03	0.27	0.26	0.12	0.15	0.21	0.26	0.15	0.20	0.27	0.27	0.26
<b>18:0</b>	5.18	6.62	3.45	5.34	5.90	6.26	4.87	4.32	3.88	5.03	5.04	4.24
<b>18:1<sub>c9</sub></b>	20.66	22.97	17.54	21.33	21.82	22.39	19.65	19.10	18.32	21.61	20.26	18.00
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	53.99	21.71	15.34	44.94	33.85	29.78	41.91	34.67	26.00	20.12	18.53	17.83
<b>18:3<sub>c6 c9 c12</sub></b>	0.26	0.01	0.02	0.17	0.14	0.07	0.15	0.14	0.08	0.01	0.02	0.02
<b>18:3<sub>c9 c12 c15</sub></b>	5.51	38.96	0.50	15.61	23.24	30.60	3.61	3.01	2.35	30.35	19.73	10.12
<b>Otros</b>	2.42	1.49	6.75	1.83	1.96	1.72	7.54	4.59	5.07	3.61	4.12	5.84

**C:** control, **M:** aceite de maíz, **L:** aceite de linaza, **P:** aceite de palmiste.

### 3.2.7. Estimación del índice de efecto asociativo

El denominado índice asociativo se determinó para las proporciones de **AG** producidas por las mezclas con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de efecto asociativo} = \text{Pr observada} / ((\text{Pr Aceite A}) + (\text{Pr Aceite B}))$$

Donde: Pr observada: Es la proporción del **AG** producida por cada una de las mezclas

Pr A= Es el producto de la proporción del **AG** producida por el aceite puro A por su porcentaje de inclusión en la mezcla (75,50 o 25)

Pr B= Es el producto de la proporción del **AG** producida por el aceite puro B por su porcentaje de inclusión en la mezcla (75,50 o 25)

Valores > 1 indican un efecto asociativo de las mezclas; Valores < 1 indican un efecto asociativo negativo de las mezclas; Valores = 1 indican que no se presentaron diferencias entre la suma de los efectos parciales de los aceites (valor esperado) y los valores observados (Van Soest, 1994).

### 3.2.8 Diseño experimental

Se empleó un diseño en bloques completamente al azar generalizado (Steel y Torrie, 1980) utilizando el duplicado del ensayo en el tiempo como factor de bloqueo. Se compararon los efectos de los tratamientos sobre las proporciones de los **AG** identificados en el fluido ruminal liofilizado. El análisis estadístico se realizó utilizando el procedimiento PROC GLM del sistema estadístico SAS (1998) según el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + T_j + (PT)_{ij} + E_{ijk} \text{ Donde:}$$

$Y_{ij}$  = la lectura del i-ésimo fluido ruminal en el j-ésimo tratamiento

$\mu$  = el promedio poblacional de la variable respuesta

$P_i$  = efecto del i-ésimo montaje (i= 1,2)

$T_i$  = efecto del j-ésimo tratamiento (j=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13)

(PT)  $ij$  = efecto de la interacción del ensayo y el tratamiento

$E_{ijk}$  = es el error asociado con la lectura del j-ésimo tratamiento en el i-ésimo animal

Se realizaron comparaciones de medias planeadas con un nivel de significancia del 5% (tabla 3.6). El modelo cumplió con los supuestos de homogeneidad del material experimental, que el error experimental es una variable aleatoria, independiente, con distribución normal, media igual a 0 y varianzas homogéneas.

**Tabla 3.6** Contrastes ortogonales

1	<b>C vs (M, L, P y mezclas)</b>
2	<b>M, L y P vs mezclas</b>
3	<b>M y L vs P</b>
4	<b>M vs L</b>
5	Mezclas <b>M-L</b> vs mezclas <b>M-P L-P</b>
6	Mezclas <b>M-P</b> vs mezclas <b>L-P</b>
7	<b>M<sub>75</sub>L<sub>25</sub> VS (M<sub>50</sub>L<sub>50</sub> M<sub>25</sub>L<sub>75</sub>)</b>
8	<b>M<sub>50</sub>L<sub>50</sub> VS M<sub>25</sub>L<sub>75</sub></b>
9	<b>M<sub>75</sub>P<sub>25</sub> VS (M<sub>50</sub>P<sub>50</sub> M<sub>25</sub>P<sub>75</sub>)</b>
10	<b>M<sub>50</sub>P<sub>50</sub> VS M<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>
11	<b>L<sub>75</sub>P<sub>25</sub> VS (L<sub>50</sub>P<sub>50</sub> L<sub>25</sub>P<sub>75</sub>)</b>
12	<b>L<sub>50</sub>P<sub>50</sub> VS L<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>

**C:** control, **M:** aceite de maíz, **L:** aceite de linaza, **P:** aceite de palmiste

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Contraste 1 (C vs M, L y P)

La inclusión de aceites modificó la mayoría del nivel de los **AG** del fluido ruminal con excepción del **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** y de los **AG** preformados.

#### 3.3.2 Contraste 2 (M, L y P vs mezclas)

Se observaron mayores concentraciones en los **AG** de más de 10 átomos de C, **12:0**, **16:0**, **18:1<sub>t11</sub>**, **18:1<sub>c6</sub>**, **18:2<sub>c9 c12 c15</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>**, **18:2<sub>t10 c12</sub>**, **19:0**, insaturados, monoinsaturados, preformados, impares, y menores de **18:1<sub>t6</sub>**, **18:1<sub>t9</sub>**, **18:2<sub>t9 t12</sub>**, **18:2<sub>c9 c12</sub>**, **18:2<sub>c9 c12 c15</sub>**, saturados, poliinsaturados y *de novo* en los aceites puros respecto a las mezclas.

### 3.3.3 Contraste 3 (M y L vs P)

Los tratamientos *M* y *L* respecto al tratamiento *P* produjeron mayores concentraciones de los **18:1<sub>c6</sub>**, **18:1<sub>c11</sub>**, **18:2<sub>t9 t12</sub>**, **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>**, **18:2<sub>t10 c12</sub>**, **19:0**, preformados, insaturados y menores de **8:0**, **12:0**, **14:0**, **14:1<sub>c9</sub>**, **16:0**, **16:1<sub>t9</sub>**, otros, saturados y *de novo*.

### 3.3.4 Contraste 4 (M vs L)

El tratamiento *M* produjo mayores concentraciones de los **AG** de menos de 10 átomos de C, **12:0**, **15:1<sub>t10</sub>**, **16:0**, **16:1<sub>t9</sub>**, **17:1<sub>t10</sub>**, **18:1<sub>t11</sub>**, **18:1<sub>c11</sub>**, **18:2<sub>c19 t11</sub>**, insaturados, monoinsaturados, *de novo* y menores de **14:0**, **14:1<sub>c9</sub>**, **18:1<sub>c6</sub>**, **18:2<sub>t9 t12</sub>**, **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**, **18:2<sub>t10 c12</sub>**, **19:0**, otros, saturados, poliinsaturados y preformados.

### 3.3.5 Contraste 5 (Mezclas M-L vs mezclas M-P L-P)

Las mezclas de *M* y *L* generaron mayores cocentraciones de los **AG** **6:0**, **18:1<sub>t11</sub>**, **18:1<sub>c9</sub>**, **18:2<sub>t9 t12</sub>**, **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>**, **18:2<sub>t10 c12</sub>**, **19:0**, insaturados, monoinsaturados, poliinsaturados, preformados y menores de **8:0**, **12:0**, **14:0**, **15:0**, **16:0**, otros, saturados, impares y *de novo* que las mezclas que contenían *P*.

### 3.3.6 Contraste 6 (Mezclas M-P vs mezclas L-P)

Las mezclas *M-P* favoreció la aparición de los **AG** **12:0**, **14:0**, **15:0**, **16:0**, **18:1<sub>t6</sub>**, **18:1<sub>t11</sub>**, impares, y redujeron los **AG** **15:0**, **16:1<sub>c9</sub>**, **18:1<sub>c9</sub>**, **18:2<sub>t9 t12</sub>**, **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**, **18:2<sub>t10 c12</sub>**, **19:0**, *de novo* y preformados respecto a las mezclas *L-P*.

### 3.3.7 Contrastes 7 (M<sub>75</sub>L<sub>25</sub> vs M<sub>50</sub>L<sub>50</sub> M<sub>25</sub>L<sub>75</sub>)

A una menor proporción de *L* (25%) en la mezcla adicionada se presentaron mayores niveles de **AG** **12:0**, **17:1<sub>t10</sub>**, **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 c12</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>**, monoinsaturados, y menores de **6:0**, **14:0**, **14:1<sub>c9</sub>**, **18:1<sub>c9</sub>**, **18:2<sub>t9 t12</sub>**, **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**, **18:2<sub>t10 c12</sub>**, **19:0**, saturados, insaturados, impares, *de novo* y preformados.

**Tabla 3.7** Perfil de **AG** (g/100 g de **AG**) del fluido ruminal incubado con aceites de maíz, linaza, palmiste o sus mezclas (promedios)

AG	Tratamiento													ESM <sup>1</sup>
	C	M <sub>100</sub>	L <sub>100</sub>	P <sub>100</sub>	M <sub>75</sub> L <sub>25</sub>	M <sub>50</sub> L <sub>50</sub>	M <sub>25</sub> L <sub>75</sub>	M <sub>75</sub> P <sub>25</sub>	M <sub>50</sub> P <sub>50</sub>	M <sub>25</sub> P <sub>75</sub>	L <sub>75</sub> P <sub>25</sub>	L <sub>50</sub> P <sub>50</sub>	L <sub>25</sub> P <sub>75</sub>	
<b>6:0</b>	0.17	0.06	0.03	0.03	0.04	0.08	0.07	0.02	0.04	0.03	0.04	0.05	0.10	0.0320
<b>8:0</b>	0.12	0.04	0.03	0.06	0.05	0.08	0.08	0.03	0.04	0.04	0.06	0.10	0.14	1.0183
<b>10:0</b>	1.09	0.69	0.64	0.55	1.02	0.88	0.62	0.50	0.62	0.54	0.63	0.48	0.61	0.0361
<b>12:0</b>	0.21	0.10	0.07	6.14	0.13	0.11	0.13	1.37	3.27	5.53	1.97	4.91	5.67	0.2961
<b>14:0</b>	0.23	0.10	0.14	3.87	0.09	0.12	0.13	0.98	2.20	3.55	1.21	2.60	3.62	0.0752
<b>14:1<sub>t9</sub></b>	0.47	0.23	0.25	0.33	0.28	0.30	0.29	0.30	0.27	0.32	0.34	0.34	0.33	0.0077
<b>15:0</b>	1.25	0.70	0.82	1.24	0.79	0.83	0.79	1.09	1.06	0.97	0.85	1.00	1.00	0.0489
<b>15:1<sub>t10</sub></b>	0.29	0.16	0.12	0.16	0.13	0.18	0.15	0.14	0.17	0.16	0.16	0.18	0.20	0.0058
<b>16:0</b>	14.38	12.56	10.85	14.95	12.19	12.62	12.10	13.52	14.40	15.16	12.78	13.58	14.21	0.1453
<b>16:1<sub>t9</sub></b>	0.09	0.07	0.05	0.08	0.07	0.08	0.07	0.06	0.06	0.07	0.06	0.08	0.08	0.0020
<b>16:1<sub>c9</sub></b>	0.25	0.17	0.16	0.21	0.14	0.14	0.15	0.15	0.14	0.18	0.15	0.15	0.18	0.0015
<b>17:0</b>	0.33	0.19	0.20	0.27	0.22	0.27	0.21	0.20	0.21	0.21	0.21	0.21	0.22	0.0054
<b>17:1<sub>t10</sub></b>	0.05	0.03	0.01	0.013	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.0053

C: control, M: aceite de maíz, L: aceite de linaza, P: aceite de palmiste. <sup>1</sup>Error estándar de la media.

**Tabla 3.7** Perfil de **AG** (g/100 g de **AG**) del fluido ruminal incubado con aceites de maíz, linaza, palmiste o sus mezclas (Continuación)

AG	Tratamiento												ESM <sup>1</sup>	
	C	M <sub>100</sub>	L <sub>100</sub>	P <sub>100</sub>	M <sub>75</sub> L <sub>25</sub>	M <sub>50</sub> L <sub>50</sub>	M <sub>25</sub> L <sub>75</sub>	M <sub>75</sub> P <sub>25</sub>	M <sub>50</sub> P <sub>50</sub>	M <sub>25</sub> P <sub>75</sub>	L <sub>75</sub> P <sub>25</sub>	L <sub>50</sub> P <sub>50</sub>		L <sub>25</sub> P <sub>75</sub>
<b>18:0</b>	40.74	30.38	32.75	32.28	30.33	30.61	31.22	29.01	29.58	31.56	31.33	30.07	30.77	0.3769
<b>18:1<sub>t6</sub></b>	0.55	0.44	0.46	0.40	0.32	0.40	0.31	0.45	0.49	0.60	0.41	0.47	0.54	0.1173
<b>18:1<sub>t9</sub></b>	0.64	0.50	0.52	0.48	0.51	0.47	0.52	0.47	0.55	0.51	0.45	0.62	0.57	0.0309
<b>18:1<sub>t11</sub></b>	16.07	24.06	18.07	12.32	22.22	20.24	19.04	20.00	17.67	14.69	15.96	16.07	14.17	0.3773
<b>18:1<sub>c6</sub></b>	1.31	1.42	1.70	1.06	1.16	0.97	1.12	0.98	0.99	0.84	1.02	1.01	0.96	0.0143
<b>18:1<sub>c9</sub></b>	4.88	9.77	12.00	8.48	10.30	11.17	11.82	10.21	9.74	8.82	11.62	10.29	9.38	0.2147
<b>18:1<sub>c11</sub></b>	0.60	0.86	0.85	0.61	0.76	0.94	0.93	0.82	0.73	0.71	0.86	0.72	0.70	0.0235
<b>18:2<sub>t9 t12</sub></b>	0.64	0.74	2.05	0.66	1.27	1.50	1.87	0.61	0.60	0.62	2.12	1.82	1.08	0.0669
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	3.59	5.49	3.05	3.80	5.06	5.30	4.24	7.83	5.89	4.45	3.42	3.35	3.86	0.1665
<b>18:2<sub>c9 c12 c15</sub></b>	4.56	3.06	5.55	4.06	4.20	4.80	5.69	3.49	3.57	3.71	6.95	5.88	4.65	0.0316
<b>18:2<sub>c9 t11</sub></b>	0.30	3.04	1.42	0.82	2.54	2.29	1.90	2.06	1.75	1.08	0.98	0.41	0.34	0.0383
<b>18:2<sub>t10 c12</sub></b>	0.43	0.48	2.85	0.39	0.94	1.39	2.20	0.28	0.31	0.31	1.71	0.91	0.46	0.0432
<b>19:0</b>	0.15	0.11	0.53	0.09	0.27	0.34	0.50	0.10	0.08	0.10	0.31	0.29	0.17	0.0177
<b>Otros</b>	6.60	4.56	4.84	6.69	4.96	3.85	3.83	5.31	5.55	5.22	4.41	4.40	5.97	0.0262

C: control, M: aceite de maíz, L: aceite de linaza, P: aceite de palmiste. <sup>1</sup>Error estándar de la media.

**Tabla 3.7** Perfil de **AG** (g/100 g de **AG**) del fluido ruminal incubado con aceites de maíz, linaza, palmiste o sus mezclas (Continuación)

Variable	Tratamiento													ESM <sup>1</sup>
	C	M <sub>100</sub>	L <sub>100</sub>	P <sub>100</sub>	M <sub>75</sub> L <sub>25</sub>	M <sub>50</sub> L <sub>50</sub>	M <sub>25</sub> L <sub>75</sub>	M <sub>75</sub> P <sub>25</sub>	M <sub>50</sub> P <sub>50</sub>	M <sub>25</sub> P <sub>75</sub>	L <sub>75</sub> P <sub>25</sub>	L <sub>50</sub> P <sub>50</sub>	L <sub>25</sub> P <sub>75</sub>	
<b>Saturados</b>	58.66	44.92	46.07	59.47	45.12	45.96	45.85	46.82	51.50	57.69	49.39	53.29	56.51	0.6573
<b>Insaturados</b>	34.70	50.52	49.09	33.85	42.92	50.19	50.32	47.87	42.94	37.09	46.21	42.32	37.52	0.7230
<b>Monoinsaturados</b>	25.86	38.44	36.22	24.78	37.17	36.42	36.28	34.21	31.43	27.54	33.16	31.77	28.20	0.5190
<b>Poliinsaturados</b>	8.88	12.07	12.87	9.06	12.75	13.77	14.03	13.66	11.52	9.55	13.05	10.55	9.32	0.2505
<b>Impares</b>	3.38	1.52	2.25	3.16	1.93	2.18	2.16	2.61	2.50	2.26	2.11	2.53	2.43	0.0116
<b>≤ 10 C</b>	1.38	0.79	0.71	0.63	0.66	1.11	1.05	0.75	0.70	0.61	0.72	0.64	0.86	0.0249
<b>De novo (≤ 17 C)</b>	18.94	15.09	13.37	27.88	15.16	15.73	14.81	18.38	22.50	26.78	18.46	23.69	26.39	0.5799
<b>Preform (≥18 C)</b>	74.46	80.35	81.79	65.43	79.88	80.42	81.36	76.31	71.94	68.00	77.13	71.91	67.65	0.6281

C: control, M: aceite de maíz, L: aceite de linaza, P: aceite de palmiste. <sup>1</sup>Error estándar de la media.

### 3.3.8 Contraste 8 ( $M_{50}L_{50}$ vs $M_{25}L_{75}$ )

Se presentaron mayores concentraciones en los **AG 8:0, 14:1<sub>c9</sub>, 17:0, 18:1<sub>t11</sub>, 18:2<sub>c9 t11</sub>**, monoinsaturados, impares, *de novo* y menores de **18:1<sub>c6</sub>, 18:1<sub>c9</sub>, 18:2<sub>t9 t12</sub>, 18:2<sub>c9 c12 c15</sub>, 18:2<sub>t10 c12</sub>** y **19:0**, a una menor proporción de **L** en la mezcla.

### 3.3.9 Contraste 9 ( $M_{75}P_{25}$ vs $M_{50}P_{50}$ $M_{25}P_{75}$ )

La menor proporción de **P** (25%) en la mezcla produjo mayores concentraciones de **AG 14:1<sub>c9</sub>, 18:1<sub>t11</sub>, 18:1<sub>c6</sub>, 18:1<sub>c9</sub>, 18:2<sub>c9 c12</sub>, 18:1<sub>c9</sub>, 19:0**, insaturados, monoinsaturados, poliinsaturados, preformados y menores de **6:0, 12:0, 14:0, 16:0, 16:1<sub>c9</sub>, 18:1<sub>t6</sub>, 18:2<sub>t9 t12</sub>, 18:2<sub>t10 c12</sub>**, saturados y *de novo*.

### 3.3.10 Contraste 10 ( $M_{50}P_{50}$ vs $M_{25}P_{75}$ )

A una proporción de 50% de **M** se presentaron mayores concentraciones de los **AG 10:0, 15:0, 18:1<sub>t11</sub>, 18:2<sub>c9 t11</sub>, 18:2<sub>t10 c12</sub>**, insaturados, monoinsaturados, impares, preformados y menores de **12:0, 14:0, 16:0, 18:1<sub>t6</sub>, 18:2<sub>t9 t12</sub>, 19:0**, saturados y *de novo*.

### 3.3.11 Contrastes 11 ( $L_{75}P_{25}$ vs $L_{50}P_{50}$ $L_{25}P_{75}$ )

A una mayor proporción de **L** en la mezcla se favoreció la aparición de los **AG 18:0, 18:1<sub>t11</sub>, 18:2<sub>t9 t12</sub>, 18:2<sub>c9 t11</sub>, 18:3<sub>c9 c12 c15</sub>, 18:2<sub>c9 t11</sub>, 18:2<sub>t10 c12</sub>, 19:0**, insaturados, monoinsaturados, poliinsaturados, preformados y menores niveles de **6:0, 8:0, 12:0, 14:0, 16:1<sub>c9</sub>, 17:0, 18:1<sub>t6</sub>, 18:2<sub>c9 c12</sub>**, saturados y *de novo*.

### 3.3.12 Contraste 12 ( $L_{50}P_{50}$ vs $L_{25}P_{75}$ )

A una menor proporción de **L** se produjeron mayores concentraciones de los **AG 18:1<sub>t11</sub>, 18:1<sub>c9</sub>, 18:1<sub>c11</sub>, 18:2<sub>t9 t12</sub>, 18:3<sub>c9 c12 c15</sub>, 18:2<sub>c9 t11</sub>, 18:2<sub>t10 c12</sub>, 19:0**, insaturados, monoinsaturados, poliinsaturados, impares, preformados y menores de **6:0, 8:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 16:1<sub>c9</sub>, 17:0, 16:1<sub>t6</sub>**, otros, saturados y preformados.

### 3. 4 Discusión

Se sabe que la adición de lípidos a la dieta de rumiantes modifica el perfil de **AG** de la carne o la leche (Palmquist, 1996; Collomb, *et al.*, 2004a; Khanal, *et al.*, 2008; Stoffel, *et al.*, 2015) debido a cambios en los productos finales de la **BH** de los **AG** que generan flujos diferenciales de estos al intestino (Loor, *et al.*, 2004; Loor, *et al.*, 2005). En la mayoría de trabajos se han utilizado fuentes de lípidos ricos en **18:2<sub>c9 c12</sub>** (maíz, soya, algodón) y en **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** (linaza) que en algunos casos se han comparado con lípidos saturados (palma, coco, grasas animales). Sin embargo, pocos estudios han comparado si mezclar lípidos con diferentes perfiles puede tener ventajas comparativas en los perfiles de **AG** consecuencia de la **BH**. Este estudio exploró la hipótesis de si al mezclar aceites con diferentes perfiles de **AG** se presentarían efectos asociativos positivos. Esto es que el perfil de **AG** después de la incubación *in vitro* de las mezclas de aceites tendría un perfil de **AG** diferente que el perfil estimado por la sumatoria de los efectos parciales de los aceites puros. Para este fin, se evaluaron un aceite rico en **18:2<sub>c9 c12</sub>** (maíz -**M**-), uno rico en **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** (linaza -**L**-) y uno rico en **12:0** (palmiste -**P**-) y sus mezclas. En este trabajo se hizo énfasis en algunos de los **AG** que consideramos relevantes en la valoración de las grasas para la salud humana (**12:0**, **14:0**, **16:0**, **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>**, **18:2<sub>t10 c12</sub>**, **18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**). Esperábamos que este trabajo nos permitiera identificar mezclas que generaran mejores perfiles de **AG** como consecuencia de la **BH** para ser evaluadas posteriormente en vacas lecheras y mejorar así la composición de la grasa láctea.

#### 3.4.1 Efecto de la adición de aceites

La adición de aceites al 3% del sustrato incubado modificó el perfil de **AG** resultantes de la fermentación ruminal (Tabla 3.9). Se observó que la mayoría de **AG** que están asociados a la síntesis de *novo* (menos de 18 átomos de C) disminuyeron así como los **AG** de cadenas impares (excepto en **19:0**) y *trans* (con excepción del **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>t10 c12</sub>**). El único aceite donde esta tendencia no fue clara fue en el de **P** muy posiblemente explicada por su aporte basal de **12:0**. La menor proporción de estos **AG** sugeriría que la actividad microbiana disminuyó ya que dichos **AG** son producto de la síntesis *de novo* de los microorganismos (Wu y Palmquist, 1991; Doreau y Ferlay, 1994; Harfoot y Hazlewood, 1997). La toxicidad de los aceites sobre los microorganismos ruminales ha sido ampliamente descrita (Beauchemin, *et al.*, 2008; Yang, 2009; Margarida, *et al.*, 2007; Patra y Yu, 2013).

**Tabla 3.8** Efecto de la adición de aceites de maíz, linaza, palmiste o sus mezclas sobre el perfil de **AG** del fluido ruminal (probabilidades)

Variable	Contraste											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	P											
<b>6:0</b> <sup>*a</sup>	***	***	NS	***	***	NS	***	NS	*	NS	***	***
<b>8:0</b> <sup>*b</sup>	***	**	***	***	*	NS	NS	***	NS	NS	***	*
<b>10:0</b> <sup>+</sup>	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS
<b>12:0</b> <sup>*c</sup>	***	***	***	***	***	***	NS	NS	***	***	***	***
<b>14:0</b> <sup>*c</sup>	***	***	***	***	***	***	***	NS	***	***	***	***
<b>14:1</b> <sub>t9</sub>	***	NS	*	**	NS	NS	**	**	*	NS	NS	NS
<b>15:0</b> <sup>*d</sup>	***	NS	NS	NS	***	*	NS	NS	NS	*	NS	*
<b>15:1</b> <sub>t10</sub>	***	NS	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>16:0</b>	***	***	***	***	***	**	NS	NS	***	***	**	***
<b>16:1</b> <sub>t9</sub>	**	NS	**	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>16:1</b> <sub>c9</sub>	***	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	**	NS	*	***
<b>17:0</b>	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	***	NS	NS	*	**
<b>17:1</b> <sub>t10</sub> <sup>*c,+</sup>	***	NS	NS	*	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS

<sup>+</sup>Variables sin distribución normal del error. <sup>\*</sup>Variables transformadas, <sup>a</sup>Logaritmo, <sup>b</sup>1/y, <sup>c</sup>Raíz, <sup>d</sup>Cuadrado. Significancia; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . 1: **C** vs (**M**, **L** y **P**); 2: **M**, **L** y **P** vs Mezclas; 3: **M** y **L** vs **P**; 4: **M** vs **L**; 5: Mezclas **M-L** vs Mezclas **M-P** **L-P**; 6: Mezclas **M-P** vs Mezclas **L-P**; 7: **M**<sub>75</sub> **L**<sub>25</sub> vs (**M**<sub>50</sub>**L**<sub>50</sub> **M**<sub>25</sub>**L**<sub>75</sub>); 8: **M**<sub>50</sub>**L**<sub>50</sub> vs **M**<sub>25</sub>**L**<sub>75</sub>; 9: **M**<sub>75</sub>**P**<sub>25</sub> vs (**M**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> **M**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>); 10: **M**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> vs **M**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>; 11: **L**<sub>75</sub>**P**<sub>25</sub> vs (**L**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> **L**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>); 12: **L**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> vs **L**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>

**Tabla 3.8** Efecto de la adición de aceites de maíz, linaza, palmiste o sus mezclas sobre el perfil de **AG** del fluido ruminal (continuación)

Variable	Contraste											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>18:0<sup>a</sup></b>	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS
<b>18:1<sub>16</sub></b>	**	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	***	***	*	*
<b>18:1<sub>19</sub><sup>*b</sup></b>	***	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>18:1<sub>t11</sub></b>	***	***	**	***	***	**	***	***	***	***	***	***
<b>18:1<sub>c6</sub><sup>*c</sup></b>	**	**	**	***	NS	NS	NS	***	*	NS	NS	NS
<b>18:1<sub>c9</sub></b>	***	NS	**	***	***	*	**	**	**	NS	**	***
<b>18:1<sub>c11</sub><sup>*d</sup></b>	***	NS	*	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	***
<b>18:2<sub>19 t12</sub></b>	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	**	***	*	*	NS	*	***	**	*	*	***	**
<b>18:2<sub>c9 c12 c15</sub><sup>*c</sup></b>	NS	***	*	*	***	**	***	***	NS	NS	***	***
<b>18:2<sub>c9 t11</sub><sup>*a</sup></b>	***	***	***	***	**	**	***	*	***	***	***	***
<b>18:2<sub>t10 c12</sub><sup>*c</sup></b>	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
<b>19:0</b>	***	***	*	***	***	***	**	***	**	***	***	***
<b>Otros</b>	***	NS	**	**	***	NS	NS	NS	NS	NS	*	***

<sup>a</sup>Variables sin distribución normal del error. <sup>\*</sup>Variables transformadas, <sup>a</sup>Logaritmo, <sup>b</sup>1/y, <sup>c</sup>Raíz, <sup>d</sup>Cuadrado. Significancia; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001. 1: **C** vs (**M**, **L** y **P**); 2: **M**, **L** y **P** vs Mezclas; 3: **M** y **L** vs **P**; 4: **M** vs **L**; 5: Mezclas **M-L** vs Mezclas **M-P** **L-P**; 6: Mezclas **M-P** vs Mezclas **L-P**; 7: **M**<sub>75</sub> **L**<sub>25</sub> vs (**M**<sub>50</sub>**L**<sub>50</sub> **M**<sub>25</sub>**L**<sub>75</sub>); 8: **M**<sub>50</sub>**L**<sub>50</sub> vs **M**<sub>25</sub>**L**<sub>75</sub>; 9: **M**<sub>75</sub>**P**<sub>25</sub> vs (**M**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> **M**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>); 10: **M**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> vs **M**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>; 11: **L**<sub>75</sub>**P**<sub>25</sub> vs (**L**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> **L**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>); 12: **L**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> vs **L**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>

**Tabla 3.8** Efecto de la adición de aceites de maíz, linaza, palmiste o sus mezclas sobre el perfil de **AG** del fluido ruminal (continuación)

Variable	Contraste											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Saturados</b>	***	***	*	***	***	NS	NS	NS	***	***	***	***
<b>Insaturados</b>	***	***	***	***	***	NS	NS	NS	***	***	***	***
<b>Monoinsaturados</b>	***	***	***	**	**	NS	*	NS	***	***	***	***
<b>Poliinsaturados<sup>ab</sup></b>	***	**	***	***	**	NS	*	NS	***	*	**	***
<b>≤ 10 C<sup>b</sup></b>	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Impares<sup>e</sup></b>	***	*	*	*	***	*	**	NS	NS	NS	NS	NS
<b>De novo (≤ 17 C)</b>	***	***	***	***	***	***	NS	*	***	***	***	***
<b>Preform (≥18 C)</b>	NS	***	***	***	***	***	**	NS	***	***	***	***

<sup>a</sup>Variables transformadas, <sup>b</sup>1/y, <sup>c</sup>1/y<sup>2</sup>. Significancia; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001. 1: **C** vs (**M**, **L** y **P**); 2: **M**, **L** y **P** vs Mezclas; 3: **M** y **L** vs **P**; 4: **M** vs **L**; 5: Mezclas **M-L** vs Mezclas **M-P** **L-P**; 6: Mezclas **M-P** vs Mezclas **L-P**; 7: **M**<sub>75</sub> **L**<sub>25</sub> vs (**M**<sub>50</sub>**L**<sub>50</sub> **M**<sub>25</sub>**L**<sub>75</sub>); 8: **M**<sub>50</sub>**L**<sub>50</sub> vs **M**<sub>25</sub>**L**<sub>75</sub>; 9: **M**<sub>75</sub>**P**<sub>25</sub> vs (**M**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> **M**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>); 10: **M**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> vs **M**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>; 11: **L**<sub>75</sub>**P**<sub>25</sub> vs (**L**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> **L**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>); 12: **L**<sub>50</sub>**P**<sub>50</sub> vs **L**<sub>25</sub>**P**<sub>75</sub>

Los aceites generan cambios en las poblaciones microbianas y en el conteo total de microorganismos, lo que afecta de manera directa los procesos de lipólisis, **BH** y síntesis de *novo* de **AG** en el rumen (Beam, *et al.*, 2000; Chow, *et al.*, 2004; Loor, *et al.* 2005).

**Tabla 3.9** Efecto de la adición de aceites maíz (**M**), linaza (**L**), palmiste (**P**) o sus mezclas sobre el perfil de **AG** del fluido ruminal

<b>AG</b>	<b>Control</b>	<b>Adiciones</b>	<b>p</b>
	<b>g/100 g de AG</b>		
<b>6:0</b> <sup>*a</sup>	0.17	0.05	***
<b>8:0</b> <sup>*b</sup>	0.12	0.07	***
<b>10:0</b> <sup>+</sup>	1.09	0.66	**
<b>12:0</b> <sup>*c</sup>	0.21	2.55	***
<b>14:0</b> <sup>*c</sup>	0.23	1.60	***
<b>14:1</b> <sub>t9</sub>	0.47	0,30	***
<b>15:0</b> <sup>*d</sup>	1.25	0.91	***
<b>15:1</b> <sub>t10</sub>	0.29	0.16	***
<b>16:0</b>	14.38	13.21	***
<b>16:1</b> <sub>t9</sub>	0.09	0.07	**
<b>16:1</b> <sub>c9</sub>	0.25	0.16	***
<b>17:0</b>	0.33	0.22	***
<b>17:1</b> <sub>t10</sub> <sup>*c,+</sup>	0.05	0.02	***
<b>18:0</b> <sup>+</sup>	40.74	30.82	***
<b>18:1</b> <sub>t6</sub>	0.55	0.44	***
<b>18:1</b> <sub>t9</sub> <sup>*b</sup>	0.64	0.51	***
<b>18:1</b> <sub>t11</sub>	16.07	17.88	**
<b>18:1</b> <sub>c6</sub> <sup>*c</sup>	1.31	1.10	***
<b>18:1</b> <sub>c9</sub>	4.88	10.30	***
<b>18:1</b> <sub>c11</sub> <sup>*d</sup>	0.60	0.79	***
<b>18:2</b> <sub>t9 t12</sub>	0.64	1.25	**
<b>18:2</b> <sub>c9 c12</sub>	3.59	4.65	NS
<b>18:3</b> <sub>c9 c12 c15</sub> <sup>*c</sup>	4.56	4.63	***
<b>18:2</b> <sub>c9 t11</sub> <sup>*a</sup>	0.30	1.55	***
<b>18:2</b> <sub>t10 c12</sub> <sup>*c</sup>	0.43	1.02	***
<b>19:0</b>	0.15	0.24	***

**C** Control. <sup>+</sup>Variables sin distribución normal del error. <sup>\*</sup>Variables transformadas, <sup>a</sup>Logaritmo, <sup>b</sup>1/y, <sup>c</sup>Raíz, <sup>d</sup>Cuadrado. Significancia; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001

Adicionalmente a la disminución en **AG** de síntesis de *novo*, la proporción de **18:0** disminuyó sensiblemente (24,4%) y la de **18:1**<sub>c9</sub> aumentó (211%) lo que podría indicar

que la adición de aceites podría inhibir el último paso de la **BH**. Por último, la adición de aceites aumentó las proporciones de **18:2<sub>c9 t11</sub>** y **18:2<sub>t10 c12</sub>** muy probablemente asociado a un mayor aporte de sus precursores por los aceites. Esto coincide con lo reportado por otros autores (Collomb, *et al.*, 2004a; Collomb, *et al.*, 2004b; Loor, *et al.*, 2005; AbuGhazaleh y Jacobson, 2007; Matsushita, *et al.*, 2007; Castillo, 2012; Stoffel, *et al.*, 2015), quienes argumentan que la adición de los aceites, particularmente aquellos ricos en **AG** poliinsaturados, aumentan la producción de compuestos intermediarios de la **BH**.

### **3.4.2 Comparaciones de aceites ricos en AG poliinsaturados (M y L) con aceite rico en 12:0 (P) y de aceites ricos en 18:2<sub>c9 c12</sub> (M) o 18:3<sub>c9 c12 c15</sub> (L)**

Las adiciones de aceites ricos en **AG** poliinsaturados (**M** y **L**) aumentaron las proporciones de **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>** y **18:2<sub>t10 c12</sub>** y disminuyeron las de **12:0**, **14:0** y **16:0** en el perfil de **AG** del fluido ruminal después de la fermentación comparados al aceite rico en ácido **12:0 (P)** (Tabla 3.10).

Los **AG 18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>** y **18:2<sub>t10 c12</sub>** son producto de la **BH** incompleta en el rumen del **18:2<sub>c9 c12</sub>** y del **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** (Kemp y Lander, 1984; Trogeler, *et al.*, 2003; Lee y Jenkins, 2011) lo que explica que la inclusión de aceites o semillas ricas en **18:2<sub>c9 c12</sub>** (maíz, soya, girasol) o **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** (linaza) en la dieta de los rumiantes aumenten su flujo al duodeno, y su proporción en los **AG** de la leche (Loor, *et al.*, 2005; AbuGhazaleh y Jacobson, 2007; Bu, *et al.*, 2007; Matsushita, *et al.*, 2007; Castillo, 2012; Stoffel, *et al.*, 2015). Por otro lado y dado que los microorganismos del rumen no modifican sustancialmente los **AG** saturados de la dieta (Hartoot y Hazlewood, 1995), esto podría explicar porque la adición de **P** incrementó las proporciones de **AG** de cadena media en el fluido ruminal. Varios autores han reportado que la inclusión de aceites de coco y palmiste (ricos en **AG** de cadena media) favorece la aparición de los ácidos **12:0** y **14:0** en leche, explicado por la transferencia de estos compuestos desde el alimento (Storry, *et al.*, 1971; Hermansen, 1995; Hristov, *et al.*, 2009).

**Tabla 3.10** Efecto de la adición de aceites sobre el perfil de **AG** del fluido ruminal

<b>AG</b>	<b>M y L</b>		<b>P</b>	<b>M L</b>		<b>p</b>
	<b>g/100 g de AG</b>			<b>g/100 g de AG</b>		
<b>12:0</b> <sup>a</sup>	0.09	6.14	***	0.10	0.07	***
<b>14:0</b> <sup>a</sup>	0.12	3.87	***	0.10	0.14	***
<b>16:0</b>	11.71	14.85	***	12.56	10.85	***
<b>18:0</b> <sup>+</sup>	31.57	32.28	NS	30.38	32.75	NS
<b>18:1</b> <sub>t11</sub>	21.07	12.32	***	24.06	18.07	***
<b>18:2</b> <sub>c9 c12</sub>	4.27	3.80	*	5.49	3.05	*
<b>18:3</b> <sub>c9 c12 c15</sub> <sup>a</sup>	4.31	4.06	*	3.06	5.55	*
<b>18:2</b> <sub>c9 t11</sub> <sup>b</sup>	2.23	0.82	***	3.04	1.42	***
<b>18:2</b> <sub>t10 c12</sub> <sup>a</sup>	1.67	0.39	***	0.48	2.85	***
<b>Σ AG</b>						
Saturados	45.50	59.47	*	44.92	46.07	***
Insaturados	49.86	33.85	***	50.62	49.09	***
Monoinsaturados	37.33	24.78	***	38.44	36.22	**
Poliinsaturados <sup>c</sup>	12.47	9.06	***	12.07	12.87	***
<10C <sup>c</sup>	0.75	0.63	NS	0.79	0.71	NS
Impares <sup>d</sup>	1.89	3.16	*	1.52	2.25	*
De novo (≤ 17 C)	14.23	27.88	***	15.09	13.37	***
Preform (≥ 18 C)	81.07	65.43	***	80.35	81.79	***

**M**: aceite de maíz; **L**: aceite de linaza; **P**: aceite de palmiste. Significancia; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001. <sup>+</sup>Variables sin distribución normal del error; <sup>\*</sup>Variables transformadas, <sup>a</sup>Raíz, <sup>b</sup>Logaritmo, <sup>c</sup>1/y, <sup>d</sup>1/y<sup>2</sup>

Cuando se comparan los aceites ricos en **AG** poliinsaturados, la adición de un aceite rico en ácido linoleico (**M**) produjo mayores proporciones de **18:1**<sub>t11</sub> y **18:2**<sub>c9 t11</sub> en el fluido ruminal después de la incubación respecto a un aceite rico en ácido linolénico (**L**) (Tabla 3.10). Esto coincide por lo reportado por varios autores trabajando en sistemas *in vitro* (AbuGhazaleh y Jacobson, 2007; Castillo, 2012) y en ensayos *in vivo* (Loor, *et al.*, 2005). Se estima que la **BH** del **18:2**<sub>c9 c12</sub> genera una menor cantidad de isómeros comparada a la del **18:3**<sub>c9 c12 c15</sub>, lo que permite que la proporción de **18:1**<sub>t11</sub> aumente con la inclusión de **M** comparado a **L**. Además, se estima que las enzimas que realizan los primeros pasos de la **BH** de los **AG** poliinsaturados de 18 carbonos tienen una mayor afinidad por el **18:2**<sub>c9 c12</sub> que por el **18:3**<sub>c9 c12 c15</sub> (Castillo, 2012), lo que favorecería también la formación

de **18:1<sub>t11</sub>** a partir de **M** comparado con **L**. La inclusión de **L** generó mayores niveles de **18:2<sub>t10 c12</sub>**, compuesto que ha sido relacionado con el síndrome de baja grasa en leche (Bauman y Griinari, 2001; Bauman y Griinari, 2003). Estos resultados indicarían que la inclusión de aceite de **L** en la dieta de vacas lecheras debe limitarse para no generar efectos nocivos sobre las concentraciones de grasa en la leche. Contrario a lo mostrado en nuestro estudio, otros autores han reportado que la adición de aceites ricos en **18:2<sub>c9 c12</sub>** o de éste **AG** incrementan las proporciones de **18:2<sub>t10 c12</sub>** (Loor, *et al.*, 2005; AbuGhazaleh y Jacobson, 2007). Sin embargo, estos estudios han sido realizados en sistemas que emplean dietas totalmente mezcladas (**TMR** por sus siglas en inglés) y con la adición de aceites de pescado o **AG** provenientes de organismos marinos (EPA y DHA). Este tipo de dietas y suplementaciones generaría condiciones de fermentación diferentes a las dadas en nuestro ensayo y modificarían la **BH** ruminal (Chow, *et al.*, 2004).

Los pastos son la principal fuente de alimentación de los rumiantes en pastoreo y tienen mayor proporción de **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** que de **18:2<sub>c9 c12</sub>** (De la Vega, 2012). En la alimentación de rumiantes el **18:2<sub>c9 c12</sub>** se encuentra presente en la dieta mediante suplementaciones (granos, aceites, ensilajes de cereales). En el capítulo dos de esta tesis se propone la hipótesis de que el **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** es menos tóxico, lo que puede reflejar una respuesta adaptativa de los microorganismos a la alimentación consistente en forrajes. Teniendo en cuenta que la proporción de **AG** impares (propios del metabolismo microbiano) es mayor en **L** (rico en **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**) comparado a **M** (rico en **18:2<sub>c9 c12</sub>**) se podría hipotetizar que la actividad microbiana resultó mayor con la adición de **L** lo que se explicaría por un menor efecto tóxico de este aceite comparado a **M**.

### **3.4.3 Efectos asociativos de mezclar aceites (Aceites puros vs mezclas)**

Las mezclas de aceites generaron un perfil de **AG** diferente que el perfil estimado por la sumatoria de los efectos parciales de los aceites puros (tablas 3.11 y 3.12), lo que indicaría que se presentaron efectos asociativos (positivos o negativos). Mezclar los aceites tuvo un efecto negativo sobre el perfil final de la **BH**, pues aumentaron las proporciones de **AG** saturados (30.7%) particularmente el **12:0** y **14:0** y se redujeron las proporciones de los **AG** insaturados (32.2%), monoinsaturados (33.6%) y poliinsaturados

(27.3%) comparativamente con los aceites puros. Solamente se observaron efectos positivos (aumento en la proporción) para los **AG 18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** (Tabla 3.11 y 3.12). Los **AG trans (18:1<sub>t11</sub>, 18:2<sub>c9 t11</sub> y 18:2<sub>t10 c12</sub>)** también disminuyeron como consecuencia de usar mezclas.

**Tabla 3.11** Efecto de la adición de aceites puros o sus mezclas sobre el perfil de **AG** del fluido ruminal

AG	M, L y P Mezclas		p
	g/100 g de AG		
<b>12:0<sup>a</sup></b>	2.10	2.72	***
<b>14:0<sup>a</sup></b>	1.37	1.69	***
<b>16:0</b>	12.75	13.38	***
<b>18:0<sup>+</sup></b>	31.80	30.50	NS
<b>18:1<sub>t11</sub></b>	18.15	17.78	***
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	4.11	4.82	***
<b>18:3<sub>c9 c12 c15</sub><sup>a</sup></b>	4.22	4.77	***
<b>18:2<sub>c9 t11</sub><sup>b</sup></b>	1.76	1.48	***
<b>18:2<sub>t10 c12</sub><sup>a</sup></b>	1.24	0.95	***
<b>Σ AG</b>			
Saturados	45.50	59.47	***
Insaturados	49.86	33.85	***
Monoinsaturados	37.33	24.78	***
Poliinsaturados <sup>c</sup>	12.47	9.06	**
<10C <sup>c</sup>	0.75	0.63	NS
Impares <sup>d</sup>	1.89	3.16	*
De novo (≤ 17 C)	14.23	27.88	***
Preform (≥ 18 C)	81.07	65.43	***

**M:** aceite de maíz; **L:** aceite de linaza; **P:** aceite de palmiste. Significancia; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001. <sup>+</sup>Variables sin distribución normal del error; <sup>\*</sup>Variables transformadas, <sup>a</sup>Raíz, <sup>b</sup>Logaritmo, <sup>c</sup>1/y, <sup>d</sup>1/y<sup>2</sup>

Tanto la síntesis de *novo* como la isomerización reflejan actividad microbiana (Kemp y Lander, 1984) lo cual señalaría una aparente contradicción en los resultados de nuestro experimento ya que en un caso las mezclas tendrían un efecto estimulador de la actividad microbiana (síntesis de *novo*) y a la vez inhibitorio (isomerización). Sin embargo, la actividad de isomerización se relaciona con grupos de microorganismos determinados (Kemp y Lander, 1984) lo cual sugeriría que las mezclas podrían tener efectos inhibitorios

**Tabla 3.12** Efecto asociativo de las mezclas de aceites sobre el perfil de **AG** (g/100 g de grasa) del fluido ruminal

AG	Tratamiento								
	M <sub>75</sub> L <sub>25</sub>	M <sub>50</sub> L <sub>50</sub>	M <sub>25</sub> L <sub>75</sub>	M <sub>75</sub> P <sub>25</sub>	M <sub>50</sub> P <sub>50</sub>	M <sub>25</sub> P <sub>75</sub>	L <sub>75</sub> P <sub>25</sub>	L <sub>50</sub> P <sub>50</sub>	L <sub>25</sub> P <sub>75</sub>
<b>12:0</b>									
Observado	0.13	0.11	0.13	1.37	3.27	5.53	1.97	4.91	5.67
Esperado	0.09	0.09	0.08	1.61	3.12	4.63	1.59	3.11	4.62
Índice efecto asociativo	<b>1.41</b>	<b>1.29</b>	<b>1.68</b>	<b>0.85</b>	<b>1.05</b>	<b>1.19</b>	<b>1.24</b>	<b>1.58</b>	<b>1.23</b>
<b>14:0</b>									
Observado	0.09	0.12	0.13	0.98	2.20	3.55	1.21	2.60	3.62
Esperado	0.11	0.12	0.13	1.04	1.99	2.93	1.07	2.01	2.94
Índice efecto asociativo	<b>0.82</b>	<b>1.00</b>	<b>1.00</b>	<b>0.94</b>	<b>1.11</b>	<b>1.21</b>	<b>1.13</b>	<b>1.30</b>	<b>1.23</b>
<b>16:0</b>									
Observado	12.19	12.62	12.10	13.52	14.40	15.16	12.78	13.58	14.21
Esperado	12.13	11.71	11.28	13.13	13.71	14.28	11.85	12.85	13.85
Índice efecto asociativo	<b>1.00</b>	<b>1.08</b>	<b>1.07</b>	<b>1.03</b>	<b>1.05</b>	<b>1.06</b>	<b>1.08</b>	<b>1.06</b>	<b>1.03</b>
<b>18:0</b>									
Observado	30.33	30.61	31.22	29.01	29.58	31.56	31.33	30.07	30.77
Esperado	30.97	31.57	32.16	30.86	31.33	31.81	32.63	32.52	32.40
Índice efecto asociativo	<b>0.98</b>	<b>0.97</b>	<b>0.97</b>	<b>0.94</b>	<b>0.94</b>	<b>0.99</b>	<b>0.96</b>	<b>0.92</b>	<b>0.95</b>
<b>18:1<sub>t11</sub></b>									
Observado	22.22	20.24	19.04	20.00	17.67	14.69	15.96	16.07	14.17
Esperado	22.56	21.07	19.57	21.13	18.19	15.26	16.63	15.20	13.76
Índice efecto asociativo	<b>0.98</b>	<b>0.96</b>	<b>0.97</b>	<b>0.95</b>	<b>0.97</b>	<b>0.96</b>	<b>0.96</b>	<b>1.06</b>	<b>1.03</b>
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>									
Observado	5.06	5.30	4.24	7.83	5.89	4.45	3.42	3.35	3.86
Esperado	4.88	4.27	3.66	5.07	4.65	4.22	3.24	3.43	3.61
Índice efecto asociativo	<b>1.04</b>	<b>1.24</b>	<b>1.16</b>	<b>1.55</b>	<b>1.27</b>	<b>1.05</b>	<b>1.06</b>	<b>0.98</b>	<b>1.07</b>
<b>18:3<sub>c9 c12 c15</sub></b>									
Observado	4.20	4.80	5.69	3.49	3.57	3.71	6.95	5.88	4.65
Esperado	3.68	4.31	4.93	3.31	3.56	3.81	5.18	4.81	4.43
Índice efecto asociativo	<b>1.14</b>	<b>1.11</b>	<b>1.15</b>	<b>1.05</b>	<b>1.00</b>	<b>0.97</b>	<b>1.34</b>	<b>1.22</b>	<b>1.05</b>
<b>18:2<sub>c9 t11</sub></b>									
Observado	2.54	2.29	1.90	2.06	1,75	1.08	0.98	0.41	0.34
Esperado	2.64	2.23	1.83	2.49	1,93	1.38	1.27	1.12	0.97
Índice efecto asociativo	<b>0.96</b>	<b>1.03</b>	<b>1.04</b>	<b>0.83</b>	<b>0.91</b>	<b>0,79</b>	<b>0.77</b>	<b>0.37</b>	<b>0.35</b>
<b>18:2<sub>t10 c12</sub></b>									
Observado	0.94	1.39	2.20	0.28	0,31	0.31	1.71	0.91	0.46
Esperado	1.07	1.67	2.26	0.46	0,44	0.41	2.24	1.62	1.01
Índice efecto asociativo	<b>0.88</b>	<b>0.83</b>	<b>0.97</b>	<b>0.61</b>	<b>0,71</b>	<b>0.75</b>	<b>0.77</b>	<b>0.56</b>	<b>0.46</b>

**M:** aceite de maíz; **L:** aceite de linaza; **P:** aceite de palmiste. *El índice de efecto asociativo comprende la relación del valor observado y el valor esperado estimado*

sobre grupos específicos de microorganismos ruminales y en particular aquellos que realizan la isomerización.

El aumento en las proporciones de **18:2**<sub>c9 c12</sub> y **18:3**<sub>c9 c12 c15</sub> en los tratamientos con aceites mezclados sería coherente con esta menor actividad en las mezclas ya que la isomerización es esencial para el primer paso de la biohidrogenación (**BH**) (Kemp y Lander, 1984, Trogeler, *et al.*, 2003; Lee y Jenkins, 2011). No es claro porque las mezclas podrían tener efectos diferentes a los aceites puros. Sin embargo, como lo hemos argumentado en el capítulo 2 de esta tesis, al mezclar los aceites se generan concentraciones menores del **AG** predominante en los aceites (**12:0**, **18:2**<sub>c9 c12</sub> o **18:3**<sub>c9 c12 c15</sub>) que podrían resultar en que sus concentraciones estén por debajo de sus umbrales o concentraciones mínimas inhibitorias. Esto explicaría los efectos estimulantes del crecimiento microbial pero no los efectos diferenciales sobre la isomerización.

#### **3.4.4 Mezclas M-L vs mezclas M-P L-P; mezclas M-P vs L-P**

El adicionar mezclas de aceites poliinsaturados (**M** y **L**) a un sistema de fermentación ruminal *in vitro* produjo mayores proporciones de **AG** insaturados (18.5%), poliinsaturados (19.9%), de **18:1**<sub>t11</sub>, **18:2**<sub>c9 t11</sub> y **18:2**<sub>t10 c12</sub> y menores proporciones de **AG** de cadena media que las mezclas de estos aceites con **P** (**M-P** y **L-P**). Estas diferencias se explican principalmente por un mayor aporte de **AG** poliinsaturados de **M** y **L** que **P** (Tabla 3.13).

A su vez, las mezclas de **M-P** resultaron en mayores proporciones de **18:1**<sub>t11</sub>, **18:2**<sub>c9 t11</sub> que cuando se mezcló **L-P**. Se ha sugerido que la **BH** del **18:2**<sub>c9 c12</sub> es más efectiva que la del **18:3**<sub>c9 c12 c15</sub> para la producción de **18:1**<sub>t11</sub> y **18:2**<sub>c9 t11</sub> que aquellos recursos ricos en **18:2**<sub>c9 c12</sub> tanto en sistemas *in vitro* (AbuGhazaleh y Jacobson, 2007; Castillo, 2012) e *in vivo* en la digesta ruminal o en leche (Collomb, *et al.*, 2004a; Collomb, *et al.*, 2004b; Loor, *et al.*, 2005; Matsushita, *et al.*, 2007; Stoffel, *et al.*, 2015). La adición de **P** a **M** o **L** aumento las proporciones de **18:2**<sub>c9 c12</sub> y **18:3**<sub>c9 c12 c15</sub>. Teniendo en cuenta que los niveles de **AG** poliinsaturados es superior en las mezclas **M-P** y **L-P** comparado a **M** o **L**, se podría afirmar que la inclusión de **P** en la mezcla genera una disminución de la **BH** del **18:2**<sub>c9 c12</sub> y del **18:3**<sub>c9 c12 c15</sub>. Este efecto asociativo positivo de la adición de **P** fue más evidente cuando este estaba en menor proporción en las mezclas (Tabla 3.12).

**Tabla 3.13** Efecto de la adición de las mezclas **M-L** **M-P** y **L-P** sobre el perfil de **AG** del fluido ruminal

<b>AG</b>	<b>M-L M-P L-P</b>			<b>P</b>	<b>M-P L-P</b>		<b>p</b>
	<b>g/100 g de AG</b>				<b>g/100 g de AG</b>		
<b>12:0<sup>a</sup></b>	0.12	4.27		***	4.40	4.18	***
<b>14:0<sup>a</sup></b>	0.11	2.64		***	2.88	2.48	***
<b>16:0</b>	12.30	14.03		***	14.78	13.52	**
<b>18:0<sup>+</sup></b>	30.72	30.39		NS	30.05	30.72	NS
<b>18:1<sub>t11</sub></b>	20.50	16.43		***	17.45	15.40	**
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	4.87	4.80		NS	6.06	3.54	*
<b>18:3<sub>c9 c12 c15</sub><sup>a</sup></b>	4.90	4.71		***	3.59	5.83	**
<b>18:2<sub>c9 t11</sub><sup>b</sup></b>	2.24	1.10		**	1.63	0.58	**
<b>18:2<sub>t10 c12</sub><sup>a</sup></b>	1.51	0.66		***	0.30	1.03	***
<b>Σ AG</b>							
Saturados	45.64	52.53		***	52.00	53.06	NS
Insaturados	50.14	42.33		***	42.63	42.02	NS
Monoinsaturados	36.62	31.05		**	31.06	31.04	NS
Poliinsaturados <sup>c</sup>	13.52	11.28		**	11.58	10.97	NS
<10C <sup>c</sup>	0.94	0.71		NS	0.69	0.74	NS
Impares <sup>d</sup>	2.09	2.41		***	2.46	2.36	*
De novo (≤ 17 C)	15.23	22.70		***	22.55	22.85	***
Preform (≥18 C)	80.55	72.16		***	72.08	72.23	***

**M**: aceite de maíz; **L**: aceite de linaza; **P**: aceite de palmiste. Significancia; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001. <sup>+</sup>Variables sin distribución normal del error; <sup>^</sup>Variables transformadas, <sup>a</sup>Raíz, <sup>b</sup>Logaritmo, <sup>c</sup>1/y, <sup>d</sup>1/y<sup>2</sup>

### 3.4.5 Mezclas M-L

Una mayor proporción de **M** en una mezcla con **L** produjo mayores niveles de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub>**. El **18:2<sub>t10 c12</sub>** aumentó conforme incrementó la proporción de **L** en la mezcla. No se presentaron diferencias significativas para las proporciones de **AG** de cadena media (excepto el **14:0**) debido a que los aceites **M** y **L** no son fuentes importantes de dichos ácidos. Las diferencias que se presentan en los **AG** monoinsaturados con una mayor inclusión de **M** está explicada por una mayor **BH** del **18:2<sub>c9 c12</sub>** a **18:1<sub>t11</sub>**.

Se ha postulado que el aumento de la proporción de **18:1**<sub>t11</sub> con la adición de **18:2**<sub>c9 c12</sub> en su forma pura o aceites ricos en el comparado al **18:3**<sub>c9 c12 c15</sub> en su forma pura o como **L** se debe a una mayor afinidad de las enzimas de los primeros pasos de la **BH** y a una menor generación de intermediarios con la adición de **18:2**<sub>2c9 c12</sub> comparado con **18:3**<sub>c9 c12 c15</sub> (Loor, *et al.*, 2005, AbuGhazaleh y Jacobson, 2007; Ribeiro, *et al.*, 2007; Castillo, 2012).

**Tabla 3.14** Efecto de la adición de las mezclas **M**<sub>75L25</sub>, **M**<sub>50L50</sub> y **M**<sub>25L75</sub> sobre el perfil de **AG** del fluido ruminal

AG	<b>M</b> <sub>75L25</sub> <b>M</b> <sub>50L50</sub> <b>M</b> <sub>25L75</sub>		p	<b>M</b> <sub>50L50</sub> <b>M</b> <sub>25L75</sub>		p
	g/100 g de AG			g/100 g de AG		
<b>12:0</b> <sup>a</sup>	0.13	0.12	NS	0.11	0.13	NS
<b>14:0</b> <sup>a</sup>	0.09	0.13	***	0.12	0.13	NS
<b>16:0</b>	12.19	12.36	NS	12.62	12.10	NS
<b>18:0</b> <sup>t</sup>	30.33	30.92	NS	30.61	31.22	NS
<b>18:1</b> <sub>t11</sub>	22.22	19.64	***	20.24	19.04	***
<b>18:2</b> <sub>c9 c12</sub>	5.06	4.77	***	5.30	4.24	**
<b>18:3</b> <sub>c9 c12 c15</sub> <sup>a</sup>	4.20	5.25	***	4.80	5.69	***
<b>18:2</b> <sub>c9 t11</sub> <sup>b</sup>	2.54	2.10	***	2.29	1.90	*
<b>18:2</b> <sub>t10 c12</sub> <sup>a</sup>	0.94	1.80	***	1.39	2.20	***
<b>Σ AG</b>						
Saturados	45.12	45.91	NS	45.96	45.85	NS
Insaturados	49.92	50.26	NS	50.19	50.32	NS
Monoinsaturados	37.17	36.35	*	36.42	36.28	NS
Poliinsaturados <sup>c</sup>	12.75	13.90	*	13.77	14.03	NS
<10C <sup>c</sup>	0.66	1.08	NS	1.11	1.05	NS
Impares <sup>d</sup>	1.93	2.17	**	2.18	2.16	NS
De novo (≤ 17 C)	15.16	15.27	NS	15.73	14.81	*
Preform (≥18 C)	79.88	80.89	**	80.42	81.36	NS

**M**: aceite de maíz; **L**: aceite de linaza; Significancia; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001.  
<sup>a</sup>Variables sin distribución normal del error; <sup>\*</sup>Variables transformadas, <sup>a</sup>Raíz, <sup>b</sup>Logaritmo, <sup>c</sup>1/y, <sup>d</sup>1/y<sup>2</sup>

### 3.4.6 Mezclas M-P

La inclusión de **P** en una mezcla con **M** produjo menores cantidades de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub>** y la disminución es mayor cuando aumenta la proporción de **P**. Esto se explica principalmente por una dilución en el aporte de precursores para la producción de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub>** y a un efecto antimicrobiano de los **AG** de cadena media de **P** sobre poblaciones de microorganismos ruminales (Beauchemin, *et al.* 2008; Patra y yu, 2013) que se pueden encontrar involucradas en la lipólisis y **BH** (Jensen, 2002; Moate, *et al.*, 2008; Doreau y Chilliard, 1997; Jenkins, *et al.*, 2008; Vlaeminck, *et al.*, 2008).

**Tabla 3.15** Efecto de la adición de las mezclas **M<sub>75</sub>P<sub>25</sub>**, **M<sub>50</sub>P<sub>50</sub>** y **M<sub>25</sub>P<sub>75</sub>** sobre el perfil de **AG** del fluido ruminal

AG	<b>M<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b> <b>M<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b> <b>M<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>		p	<b>M<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b> <b>M<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>		p
	g/100 g de AG			g/100 g de AG		
<b>12:0<sup>a</sup></b>	1.37	4.40	***	3.27	5.53	***
<b>14:0<sup>a</sup></b>	0.98	2.88	***	2.20	3.55	***
<b>16:0</b>	13.52	14.78	***	14.40	15.16	***
<b>18:0<sup>+</sup></b>	29.01	30.57	NS	29.58	31.56	NS
<b>18:1<sub>t11</sub></b>	20.00	16.18	***	17.67	14.69	***
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	7.83	5.17	*	5.89	4.45	*
<b>18:3<sub>c9 c12 c15</sub><sup>a</sup></b>	3.49	3.62	NS	3.51	3.71	NS
<b>18:2<sub>c9 t11</sub><sup>b</sup></b>	2.06	1.42	***	1.75	1.08	***
<b>18:2<sub>t10 c12</sub><sup>a</sup></b>	0.28	0.31	***	0.31	0.31	NS
<b>Σ AG</b>						
Saturados	46.82	54.60	***	51.50	57.69	***
Insaturados	47.87	40.02	***	42.94	37.09	***
Monoinsaturados	34.21	29.49	***	31.43	27.54	***
Poliinsaturados <sup>c</sup>	13.66	10.54	***	11.52	9.55	*
<10C <sup>c</sup>	0.75	0.66	NS	0.70	0.61	NS
Impares <sup>d</sup>	2.61	2.38	NS	2.50	2.26	NS
De novo (≤ 17 C)	18.38	24.64	***	22.50	26.78	***
Preform (≥18 C)	76.31	69.97	***	71.94	68.00	***

**M**: aceite de maíz; **P**: aceite de palmiste. Significancia; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001.  
<sup>a</sup>Variables sin distribución normal del error; <sup>b</sup>Variables transformadas, <sup>a</sup>Raiz, <sup>b</sup>Logaritmo, <sup>c</sup>1/y, <sup>d</sup>1/y<sup>2</sup>

Si bien, en este ensayo no se compararon los efectos de **M** con las mezclas **M-P**, se observó que la inclusión de **P** en una mezcla con **M** aumentó las proporciones de **18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** respecto a **M** (5.49 y 3.06 respectivamente). La inclusión de hasta un 50% de **P** en la mezcla produjo mayores proporciones de **18:2<sub>c9 c12</sub>**. Esto indicaría que la inclusión de **P** disminuye la **BH** del **18:2<sub>c9 c12</sub>**, teniendo en cuenta la composición de **AG** de las mezclas adicionadas. Para las proporciones de **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** se observó un comportamiento similar y se presenta una relación directamente proporcional entre la cantidad de **P** en la mezcla y la proporción de dicho **AG** en el fluido ruminal.

El **18:2<sub>c9 c12</sub>** ha sido asociado a efectos benéficos en la salud humana, contrario al **12:0**, **14:0** y **16:0** (Ulbricht y Southgate, 1991). La inclusión de 25% **P** en una mezcla con **M** en dietas de vacas lecheras podría aumentar el flujo duodenal de **18:2<sub>c9 c12</sub>** y generar mayores niveles de dicho ácido en leche sin aumentar de manera considerable los **AG** de cadena media saturados.

### 3.4.7 Mezclas L-P

La inclusión de **P** en una mezcla con **L** produjo menores cantidades de **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>** y **18:2<sub>t10 c12</sub>** y la disminución es mayor cuando aumenta la proporción de **P**. Similar a lo ocurrido en las mezclas **M-P**, en las mezclas **L-P** hay una dilución en el aporte de precursores para la producción de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub>** y la inclusión de **P** pudo tener un efecto antimicrobiano sobre poblaciones ruminales (Beauchemin, *et al.* 2008; Patra y Yu, 2013) que están involucradas en la lipólisis y **BH** (Jensen, 2002; Moate, *et al.*, 2008; Doreau y Chilliard, 1997; Jenkins, *et al.*, 2008; Vlaeminck, *et al.*, 2008) lo cual explica las menores proporciones de **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>** y **18:2<sub>t10 c12</sub>**. En este ensayo no se compararon los efectos de **L** con las mezclas **L-P**, pero al observar las proporciones de **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** y **18:2<sub>c9 c12</sub>** producidas con la adición de **L** (5.55 y 3.05 respectivamente) y las producidas con las mezclas **L-P** se podría afirmar que la inclusión de **P** en una mezcla con **L** incrementó las proporciones de dichos **AG** respecto a **L**. En cuanto a las mezclas, la inclusión creciente de **P** hasta un 50% produjo mayores proporciones de **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**. Esto indicaría que la inclusión de **P** en la mezcla disminuyó la **BH** del **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**, teniendo en cuenta las proporciones de **AG** adicionadas con las mezclas.

El **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** ha sido asociado a efectos benéficos sobre la salud humana, contrario a los **AG** de cadena media saturados (Ulbricht y Southgate, 1991). La disminución de la **BH** producida con la inclusión de 25% **P** en una mezcla con **M** podría indicar que mediante el suministro de esta mezcla a vacas lecheras se incrementa el flujo de **18:2<sub>c9 c12</sub>** del rumen al duodeno y se generan mayores proporciones de dicho ácido en leche sin aumentar de manera considerable los **AG** de cadena media saturados. Sin embargo, la inclusión de **L** en la dieta de vacas lecheras podría aumentar las proporciones de **18:2<sub>t10 c12</sub>**, compuesto asociado al síndrome de baja grasa en leche (Bauman y Griinari, 2001; Bauman y Griinari, 2003).

**Tabla 3.16** Efecto de la adición de las mezclas **L<sub>75</sub>P<sub>25</sub>**, **L<sub>50</sub>P<sub>50</sub>** y **L<sub>25</sub>P<sub>75</sub>** sobre el perfil de **AG** del fluido ruminal

AG	<b>L<sub>75</sub>P<sub>25</sub></b> <b>L<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b> <b>L<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>		P	<b>L<sub>50</sub>P<sub>50</sub></b> <b>L<sub>25</sub>P<sub>75</sub></b>		p
	g/100 g de AG			g/100 g de AG		
<b>12:0<sup>a</sup></b>	1.97	5.29	***	4.91	5.67	***
<b>14:0<sup>a</sup></b>	1.21	3.11	***	2.60	3.62	***
<b>16:0</b>	12.78	13.90	**	13.58	14.21	***
<b>18:0<sup>+</sup></b>	31.33	30.42	*	30.07	30.77	NS
<b>18:1<sub>t11</sub></b>	15.96	15.12	***	16.07	14.17	***
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	3.42	3.61	***	3.35	3.86	**
<b>18:3<sub>c9 c12 c15</sub><sup>a</sup></b>	6.95	5.27	***	5.88	4.65	***
<b>18:2<sub>c9 t11</sub><sup>b</sup></b>	0.98	0.38	***	0.41	0.34	***
<b>18:2<sub>t10 c12</sub><sup>a</sup></b>	1.71	0.69	***	0.91	0.46	***
<b>Σ AG</b>						
Saturados	49.39	54.90	***	53.29	56.51	***
Insaturados	46.21	39.92	***	42.32	37.52	***
Monoinsaturados	33.16	29.99	***	31.77	28.20	***
Poliinsaturados <sup>c</sup>	13.05	9.94	**	10.55	9.32	***
<10C <sup>c</sup>	0.72	0.75	NS	0.64	0.86	NS
Impares <sup>d</sup>	2.11	2.48	NS	2.53	2.43	NS
De novo (≤ 17 C)	18.46	25.04	***	23.69	26.39	***
Preform (≥ 18 C)	77.13	69.78	***	71.91	67.65	***

**L**: aceite de linaza; **P**: aceite de palmiste. Significancia; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001.  
<sup>+</sup>Variables sin distribución normal del error; <sup>\*</sup>Variables transformadas, <sup>a</sup>Raíz, <sup>b</sup>Logaritmo, <sup>c</sup>1/y, <sup>d</sup>1/y<sup>2</sup>

### 3.5 Conclusiones

La adición de aceites vegetales y sus mezclas en un sistema *in vitro* al 3% de la **MS** modificó el perfil de **AG** como consecuencia de la **BH** de estos en el fluido ruminal. Los aceites de **M** y **L** produjeron mayores proporciones de **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>** y **18:2<sub>t10 c12</sub>** comparado con **P**, que aumentó las proporciones de **12:0**, **14:0** y **16:0**. Debido a su perfil de **AG**, **M** generó mayores proporciones de **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>** comparado con **L**, que aumentó los niveles de **18:2<sub>t10 c12</sub>**. Las mezclas de aceites tuvieron efectos diferentes a los aceites puros, generando efectos asociativos sobre las proporciones de **AG**. La inclusión de un 25% de **P** en una mezcla con **M** o **L** disminuyó la **BH** del **18:2<sub>c9 t11</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** respectivamente, explicado por un efecto asociativo de las mezclas sobre las proporciones de dichos **AG**. La inclusión de **P** en una mezcla con **M** o **L** en la dieta de vacas lecheras podría incrementar los flujos duodenales de **18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** y la excreción de estos en leche. La inclusión de **L** produjo mayores cantidades de **18:2<sub>t10 c12</sub>** comparado con **M**, razón por la cual su inclusión debería limitarse, ya que dicho **AG** está vinculado a la disminución del porcentaje y producción de grasa en vacas lecheras.

### 3.6 Agradecimientos

A la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá por el apoyo económico para la elaboración de este trabajo. Al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia -UNAL Bogotá- y al Grupo de Investigación en Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia -UNAL Bogotá- por su apoyo en los análisis de laboratorio.

### 3.7 Referencias bibliográficas

ABUGHAZALEH, A.A. y JACOBSON, B.N. 2007. The effect of pH and polyunsaturated C18 fatty acid source on the production of vaccenic acid and conjugated linoleic acid in ruminal cultures incubated with docosahexaenoic acid. *Anim Feed Sci Tech.* 136(1-2):11-22.

AGAZZI, A.; BAYOURTHE, C.; NICOT, M.C.; TROEGELER-MEYNADIER, A.; MONCOULON, R. y ENJANBERT, F. 2004. *In situ* ruminal biohydrogenation of fatty acids from extruded soybeans: effects of dietary adaptation and of mixing with lecithin or wheat Straw. *Anim Feed Sci Tech.* 117(1-2):165-175.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 2006b. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18 ed. Chapter 4: Animal Feed. USA:WENDT THIEX NJ.

BAUMAN, D.E. y GRIINARI, J.M. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest Sci.* 70(1-2):15-29.

BAUMAN, D.E. y GRIINAI, J.M. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu Rev Nutr.* 23:203-227.

BEAM, T.M.; JENKINS, T.C.; MOATE, P.C.; KOHM, R.A. y PALMQUIST, D.L. 2000. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *J Dairy Sci.* 83(11):2564-2573.

BEAUCHEMIN, K.A.; KREUZER, M.; O'MARA, F. y McALLISTER, T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust J Exp Agri.* 48(2): 21-27.

BU, D. P.; WANG, J. Q.; DHIMAN, T. R. y LIU, S. J. 2007. Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *J Dairy Sci.* 90(2):998-1007.

CASTILLO, J.A. 2012. Cinética de biohidrogenación *in vitro* de ácidos grasos poliinsaturados en fluido ruminal. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia – FMVZ.

CASTRO, E.; MOJICA, J. E.; LEÓN, J. M.; PABÓN, M. L.; CARULLA, J. E. y CÁRDENAS, E. A. 2008. Productividad de pasturas y producción de leche bovina bajo pastoreo de gramínea y gramínea + Lotus uliginosus en Mosquera, Colombia. *Rev Med Vet Zoot.* 55:9-21.

CHOUINARD, P.Y.; CORNEAU, L.; BUTLER, W.R.; BAUMAN, D.E.; CHILLIARD, Y. y DRACKLEY, J.K. 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J Dairy Sci.* 84(3):680-690.

CHOW, T.T.; FIEVEZ, V.; MOLONEY, A.P.; RAES, K.; DEMEYER, D. y DE SMET, S. 2004. Effect of fish oil on *in vitro* rumen lipolysis, apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediates. *Anim Feed Sci Tech.* 117(1-2):1-12.

CHRISTIE, W. W. 1993. Advances in Lipid Methodology – Two. Ed. W.W. Christie, Oily Press, Dundee. Págs 69-111.

COLLOMB, M.; SIEBER, R. y BÜTIKOFER, U. 2004a. CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids.* 39(4):355–364.

COLLOMB, M.; SOLLBERGER, H.; BÜTIKOFER, U.; SIEBER, R.; STOLL, W. y SCHAEREN, W. 2004b. Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. *Int Dairy J.* 14(6):549–559.

COOK, C. W. 1964. Symposium on nutrition forages and pastures: Collecting forage samples representative of ingested material of grazing animals for nutritional studies. *J Anim Sci.* 23(1):265-270.

DE LA VEGA, E.A.; PARALES, J.E.; MENDOZA, C.A.; KNOWLES, M.M.; DÍAZ, G.J.; PABÓN, M.L. y CARULLA, J.E. 2012. Nutritional characterization of pastures used in Colombian dairies with emphasis on fatty acid profile (Abstract). ADSA-AMPA-ASAS-CSAS-WSASAS. *Joint Annual Meeting*, Phoenix – AR, USA.

DHIMAN, T.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W.; GALLI, M.P.; ALBRIGHT, K. y TOLOSA, M.X. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J Dairy Sci.* 83(5):1016–1027.

DOREAU, M. y FERLAY, A. 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Anim Feed Sci Tech.* 45(3-4):379-396.

DOREAU, M. y CHILLIARD, Y. 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *Brit J Nutr.* 78(S1):S15-S35.

GARCÉS, R. y MANCHA, M. 1993. One step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal Biochem.* 211(1):139-143.

HARFOOT, C. G. y HAZLEWOOD, G. P. 1997. Lipid metabolism in the rumen. En: The rumen microbial ecosystem. Springer Netherlands. Págs. 382-426.

HERMANSEN, J.E. 1995. Prediction of milk fatty acid profile in dairy cows fed dietary fat differing in fatty acid composition. *J Dairy Sci.* 78(4):872-879.

HRISTOV, A.N.; VANDER POL, M.; AGLE, M.; ZAMAN, S.; SCHNEIDER, C.; NDEGWA, P.; VADDELLA, V.K.; JOHNSON, K.; SHINGFIELD, K.J. y Karnati, S.K.R. 2009. Effect of lauric acid and coconut oil on ruminal fermentation, digestion, ammonia losses from manure, and milk fatty acid composition in lactating cows. *J Dairy Sci.* 92(11):5561-5582.

JENKINS, T.C.; WALLACE, R.J.; MOATE, P.J. y MOSLEY, E.E. 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J Anim Sci.* 86(2):397-412.

JENSEN, R.G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J Dairy Sci.* 85(2):295-350.

KELLY, M.L.; BERRY, J.R.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; CHOUINARD, P.Y.; VAN AMBURGH, M.E. y BAUMAN, D.E. 1998. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J Nutr.* 128(5): 881–885.

KEMP, P. y LANDER, D.J. 1984. Hydrogenation *in vitro* of  $\alpha$ -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *J Gen Microbiol.* 130:527-533.

LEE, Y.J. y JENKINS, C. 2011. Biohydrogenation of linolenic acid to stearic acid by the rumen microbial population yields multiple intermediate conjugated diene isomers. *J Nutr.* 141(8):1445-1450.

LOOR, J.J.; UEDA, K.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. y DOREAU, M. 2005. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *J Dairy Sci.* 87(8):2472-2485.

LOOR, J.J.; UEDA, K.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. y DOREAU, M. 2005. Intestinal flow and digestibility of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. *Anim Feed Sci Tech.* 119(3-4):203-225.

MARGARIDA, M.R.; CHAUDHARY, L.C.; FIQUERES, L. y WALLACE, R.J. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91(4):303-14.

MATSUSHITA, M.; TAZINAFO, N.; PADRE, R.; OLIVEIRA, C.; SOUZA, N.; VISENTAINER, J.; MACEDO, F. y RIBAS, N. 2007. Fatty acid profile of milk from Saanen goats fed a diet enriched with three vegetable oils. *Small Ruminant Res.* 72(2-3):127-143.

MOATE, P.J.; BOSTON, R.C.; JENKINS, T.C. y LEAN, I.J. 2008. Kinetics of ruminal lipolysis of triacylglycerol and biohydrogenation of long-chain fatty acids: new insights from old data. *J Dairy Sci.* 91(2):731-742.

PATRA, A.K. y YU, Z. 2013. Effects of coconut and fish oils on methane production, fermentation, abundance and diversity of rumen microbial populations *in vitro*. *J Dairy Sci.* 96(3):1782–1792.

RIBEIRO, C.V.; EASTRIDGE, M.L.; FIRKINS, J.L.; ST-PIERRE, N.R. y PALMQUIST, D.L. 2007. Kinetics of fatty acid biohydrogenation *in vitro*. *J Dairy Sci.* 90(3):1405-1416.

SAS. 1998. SAS User's Guide: Statistics (Version 8); Cary NC: the Institute.

STANTON, C.; MURPHY, J. MCGRATH, E. y DEVERY, R. 2003. Animal feeding strategies for conjugated linoleic acid enrichment of milk en: Sebedio, J.L. Christie, W.W. y Adlof, R (Eds) *Advances in conjugated linoleic acid research*, Vol. 2, Champaign, IL, USA, AOAC Press. Págs123–145.

STEEL, R. G. D. y TORRIE, J. H. 1980. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 2<sup>nd</sup> edition. McGraw-Hill Book Company, New York, NY, USA. Págs 633.

STOFFEL, C.M.; CRUMP, P.M. y ARMENTANO, L.E. 2015. Effect of dietary fatty acid supplements, varying in fatty acid composition, on milk fat secretion in dairy cattle fed diets supplemented to less than 3% total fatty acids. *J Dairy Sci.* 98(1):431-442.

STORRY, J.E.; ROOK, J.A.F. y HALL, A.J. 1967. The effect of the amount and type of dietary fat on milk fat secretion in the cow. *Br J Nutr* 21(2):425-438.

TILLEY, J. M. y TERRY, R. A. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J Brit Grasslan Soc.* 18(2):104-111.

TROEGELER-MEYNADIER, A.; NICOT, M.C.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R. y ENJALBERT, F. 2003. Effects of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation *in vitro*. *J Dairy Sci.* 86(12):4054-4063.

ULBRICHT, T. L. V. y SOUTHGATE, D. A. T. 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet.* 338(8773):985-992.

VAN SOEST, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2 edition. Cornell University Press. USA. Págs 253-316.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. y LEWIS, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 74(10):3583-3597.

VLAEMINCK, B.; MENGISTU, G.; FIEVEZ, V.; DE JONGE, L.; y DIJKSTRA, J. 2008. Effect of *in vitro* docosahexaenoic acid supplementation to marine algae-adapted and unadapted rumen inoculum on the biohydrogenation of unsaturated fatty acids in freeze-dried grass. *J Dairy Sci.* 91(3):1122-1132.

WU, Z. y PALMQUIST, D.L. 1991. Synthesis and biohydrogenation of fatty acids by ruminal microorganisms *in vitro*. *J Dairy Sci.* 74(9):3035-3046.

YAMASAKI, M.; KISHIHARA, K.; IKEDA, I.; SUGANO, M. y YAMADA, K. 1999. A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugated linoleic acid. *J Am Oil Chem Soc.* 76(8):933-938.

ZHANG, R.H.; MUSTAFA, A.F. y ZHAO, X. 2006. Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. *Anim Feed Sci Technol.* 127(3-4): 220–233.



## 4. Suplementación con aceites de maíz y su mezcla con aceite de palmiste a vacas en pastoreo: fermentación ruminal producción de leche y perfil de ácidos grasos

### Supplementation with corn oil and its mixture with palm kernel oil to grazing cows: ruminal fermentation, milk production, and fatty acids profile

J. Parales<sup>1,2</sup>, M. Pabón<sup>1</sup>, J. Carulla<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Nutrición Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. E-mail: [jecarullaf@unal.edu.co](mailto:jecarullaf@unal.edu.co)

<sup>2</sup>MSc(c) Salud y Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. E-mail [jeparalesg@unal.edu.co](mailto:jeparalesg@unal.edu.co)

<sup>3</sup>Profesor Titular. Departamento de Producción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. E-mail: [jecarullaf@unal.edu.co](mailto:jecarullaf@unal.edu.co)

## Resumen

Se determinó el efecto de suministrar aceite de maíz (**M**) y su mezcla con aceite de palmiste (**MP**) a vacas en pastoreo sobre la fermentación ruminal, la producción de leche y su perfil de ácidos grasos (**AG**). Se evaluaron tres tratamientos: un control (**C**) sin adición y dos con adición de aceites (**M** maíz puro o **MP** mezcla de maíz y palmiste en una relación 75:25). Los aceites se suministraron a razón de 720 g/vaca/día de **M** o **MP**. Se utilizaron 6 vacas Holstein múltiparas (597 ± 11.5 kg de peso, 160 ± 29 días en

lactancia y producción láctea de  $22.1 \pm 2.3$  kg/d) que fueron asignadas a un cuadrado latino doble (3 vacas, 3 tratamientos, 3 periodos y 2 cuadrados). Cada periodo experimental duró 21 días (14 de acostumbramiento y 7 de recolección de muestras). Las vacas pastaron una pradera de kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) con una oferta de 3 kg de **MS**/100 kg de peso vivo y recibieron diariamente 0.9 kg de **MS** de ensilaje de maíz, 4.2 kg de suplemento balanceado y 9 g de óxido de cromo. El suplemento en mezcla con los aceites se ofertó en dos raciones diarias al momento del ordeño (5:00 y 14:00). La concentración de **AG** y ácidos grasos volátiles (**AGV's**) se determinó por cromatografía de gases (**CG**); la concentración de cromo en heces y suplemento balanceado por espectroscopía fluorescente de rayos X. La producción de metano (**CH<sub>4</sub>**) se estimó teniendo en cuenta la concentración de **AGV's** en el fluido ruminal. El uso de aceites aumentó la producción de leche (kg/d) (**C**: 21.4 l vs **M**: 23.6 l y **MP**: 23.9 l;  $p < 0.01$ ) y la concentración de grasa en la leche (%) (**C**: 3.15% vs **M**: 3.40% y **MP**: 3.40%;  $p < 0.05$ ). Las concentraciones de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** (g/100 g de **AG**) fueron mayores para los tratamientos con aceite (**C**: 0.68 vs **M**: 1.56 y **MP**: 1.01), siendo superior para el tratamiento **M** ( $p < 0.01$ ). Los **AG** sintetizados *de novo* (g/100 g de **AG**) en leche fueron superiores para el tratamiento **C** (**C**: 68.5% vs. **M**: 52.2% y **MP**: 58.6%;  $p < 0.01$ ). El consumo voluntario y la digestibilidad de la dieta no fueron diferentes entre los tratamientos. Las proporciones molares de acetato, propionato y butirato no fueron diferentes entre los tratamientos pero la concentración molar fue inferior para los tratamientos con aceites ( $p < 0.001$ ) resultando en una menor producción de **CH<sub>4</sub>** estimada para estos ( $p < 0.01$ ). La suplementación con **M** o **MP** en dietas de vacas lecheras aumentó la producción de leche sin afectar el consumo voluntario o la digestibilidad de la dieta. La concentración de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** aumentó más para **M** que para **MP**.

**Palabras clave:** ácido linoleico conjugado (**ALC**), metano (**CH<sub>4</sub>**), producción y composición de la leche

## Abstract

The effect of supplementation with corn oil (**M**) and its mixture with palm kernel oil (**MP**) to grazing cows on ruminal fermentation, milk production and its fatty acid (**FA**) profile was determined. Three treatments were evaluated: a control (**C**) without oil addition and two with 720 g/cow/day of **M** or **MP** (75:25). Six multiparous Holstein cows were used ( $597 \pm$

11.5 kg of weight,  $160 \pm 29$  days in milk) and assigned to a double Latin square (3 cows, 3 treatments, 3 periods, 2 squares). Each experimental period lasted 21 d (14 for adaptation and 7 for sample collection). Kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) pasture was offered (3 kg **DM**/100 kg LW). Cows were supplemented with 0.9 kg **DM** of corn silage, 4.2 kg **DM** of concentrate and 9 g of chromium oxide. A mixture of the concentrate and the oils was offered twice a day (5:00 and 14:00). **FA** and volatile fatty acids (**VFA**) concentration were determined by gas chromatography (**GC**) and chromium concentration in feces and concentrate by fluorescence spectroscopy. Methane (**CH<sub>4</sub>**) production was estimated taking into account ruminal **VFA** concentration. Addition of oils increased milk production (kg/d) (**C**: 21.4 vs **M**: 23.6 and **MP**: 23.9;  $p < 0.01$ ) and milk fat concentration (%) (**C**: 3.15 vs **M**: 3.4 and **MP**: 3.4;  $p < 0.05$ ). Conjugated linoleic acid (**18:2<sub>c9 t11</sub> CLA**) concentration (g/100g **FA**) in milk was higher for the oil treatments (**C**: 0.68 vs **M**: 1.56 and **MP**: 1.01) being superior for **M** ( $p < 0.01$ ). *De novo* synthesized **FA** concentration (g/100g **FA**) in milk were higher for the control treatment (**C**: 68.5 vs. **M**: 52.2 **FA** and **MP**: 58.6;  $p < 0.01$ ). Voluntary intake and digestibility of the diet were not different among treatments. The molar ratio of acetate, propionate and butyrate were not different among treatments but the molar concentration was lower for the treatments with oils ( $p < 0.001$ ) resulting in lower estimated methane concentration (ml/100 mol **VFA**) for these treatments ( $p < 0.01$ ). Supplementation with **M** and **MP** in diets of grazing dairy cows increases milk production without affecting voluntary intake or the digestibility of the diet. **18:2<sub>c9 t11</sub> CLA** concentration increased more for **M** than for **MP**.

**Key words:** conjugated linoleic acid (**CLA**), methane (**CH<sub>4</sub>**), milk production, milk quality

### Abreviaturas

**AG:** ácido graso. **AGV:** ácidos grasos volátiles. **BH:** biohidrogenación. **C:** tratamiento control sin suplementación de aceite. **CG:** cromatografía de gases. **CNE:** carbohidratos no estructurales. **CVMS:** consumo voluntario de materia seca. **EE:** extracto etéreo. **EN<sub>L</sub>:** energía neta de lactancia. **FDN:** fibra en detergente neutro. **FDA:** fibra en detergente ácido. **FDA<sub>i</sub>:** fibra en detergente ácido indigerible. **LCE:** leche corregida por energía. **M:** tratamiento con suplementación de aceite puro de maíz. **MP:** tratamiento con suplementación de una mezcla de 75% de aceite de maíz y 25% de aceite de palmiste. **MS:** Materia seca. **PC:** proteína cruda. **TMR:** dietas totalmente mezcladas

## 4.1 Introducción

La inclusión de grasa en dietas de vacas lecheras y su composición de **AG** son un factor determinante en la composición de la leche y su perfil de **AG** (Khanal y Olson, 2004). Schroeder, *et al.* (2004) sugieren que la adición de grasas saturadas a la dieta de vacas en pastoreo aumenta la concentración de grasa en la leche mientras que las ricas en **AG** insaturados la disminuye. Los autores concluyen que independientemente de su grado de saturación, las grasas suplementarias aumentan la producción de leche. En los últimos años, se le ha dado especial énfasis al perfil de **AG** de la leche y la manera de modificarlo por medio de la suplementación con recursos ricos en lípidos con el propósito de aumentar los **AG** potencialmente benéficos para la salud humana (Benjamin y Friedrich, 2009; Fontecha, *et al.*, 2009). Las fuentes lipídicas (grasas, aceites u otros recursos alimenticios) con altos niveles de **AG** poliinsaturados de cadena larga aumentan los ácidos trans-vaccénico (**18:1<sub>t11</sub>**) y ácido linoleico conjugado (**18:2<sub>c9 t11</sub> ALC**) en leche (Kelly, *et al.*, 1998; Dhiman, *et al.*, 2000; Harvatine y Bauman, 2006; Collomb, *et al.*, 2004a; Collomb, *et al.*, 2006). Estos ácidos han sido catalogados como funcionales por tener efectos anticarcinogénicos, antidiabetogénicos, potenciadores del sistema inmune, cardiovascular, como mejoradores de la mineralización del sistema óseo y disminución de la obesidad (Banni y Martin, 1998; Belury, 1995; Houseknecht, *et al.*, 1998; Pariza, *et al.*, 1985; Parodi, 1997; Sebedio, *et al.*, 1999; Akahoshi, *et al.*, 2004; Rosberg-Cody, *et al.*, 2011; Druart, *et al.*, 2014; Lim, *et al.*, 2014; Yang, *et al.*, 2015).

En los capítulos anteriores de esta tesis, hemos reportado que en sistemas *in vitro* el aceite de maíz, rico en ácido linoleico (**18:2<sub>c9 c12</sub>**), produce mayores concentraciones de **18:1<sub>t11</sub>** que aceites ricos en ácido linolénico (**18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**) como el de linaza (Capítulo 3). Esta tendencia también ha sido observada con la utilización de **AG** puros (Castillo, *et al.*, 2012) o en aceites y recursos ricos en lípidos (Kelly, *et al.*, 1998; Dhiman, *et al.*, 2000; Stanton, *et al.*, 2003; Collomb, *et al.*, 2004a; Collomb, *et al.*, 2004b; Zheng, *et al.*, 2006; Matsushita *et al.*, 2007). En los experimento *in vivo*, mayores producciones de **18:1<sub>t11</sub>** en el rumen han sido relacionadas con mayores concentraciones de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** y **18:1<sub>t11</sub>** en la leche (Kelly, *et al.*, 1998; Dhiman, *et al.*, 2000; Harvatine y Bauman, 2006; Castaño, *et al.*, 2014; Stoffel, *et al.*, 2015).

Las grasas y aceites también han sido utilizadas para disminuir la producción de **CH<sub>4</sub>** en los rumiantes (Machmüller, *et al.*, 2000; Beauchemin, *et al.*, 2008, Martin, *et al.*, 2010; Patra y Yu, 2013) y algunos trabajos sugieren que la actividad antimetanogénica depende del perfil de **AG** de las mismos (Beauchemin, *et al.*, 2007; Beauchemin, *et al.*, 2008; Patra, 2013; Patra, 2014). En los trabajos *in vitro* de esta tesis hemos encontrado que el aceite de palmiste rico en ácido laúrico (**12:0**) tiene un mayor potencial para disminuir las emisiones de **CH<sub>4</sub>** *in vitro* que otros aceites (maíz y linaza). Sin embargo, este aceite también deprimió la digestibilidad de la materia seca (**MS**). Los efectos antimetanogénicos de los aceites que poseen mayor cantidad de **AG** de cadena media como el de coco y palmiste han sido ampliamente documentados, postulando a estos recursos como una alternativa interesante para la reducción de las emisiones de **CH<sub>4</sub>** entérico (Macmüller, *et al.*, 2003; Beauchemin, *et al.*, 2008; Martin, *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso de estos aceites incrementa la concentración de **AG** de cadena media particularmente **12:0**, mirístico (**14:0**) y palmítico (**16:0**) en la leche (Storry, *et al.*, 1971; Hermansen, 1995; Hristov, *et al.*, 2009), los cuales en altas cantidades pueden generar problemas circulatorios en humanos favoreciendo la aparición indicadores de riesgo o patologías cardiovasculares (Ulbricht y Southgate, 1991) como el aumento del colesterol en sangre (Grundy, 1994; Mensink, *et al.*, 2003), riesgo de infarto (Khromhout, *et al.*, 1995) e incremento de desordenes ateroscleróticos (Nicolosi, *et al.*, 1997). Una suplementación de mezcla de aceites ricos en **18:2<sub>c9 c12</sub>** (maíz) y **12:0** (palmiste) podría potenciar los efectos benéficos de cada uno. Nuestros trabajos *in vitro* sugerirían que una mezcla de 75% de aceite de maíz y 25% de aceite de palmiste potenciaría la producción de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub>** **ALC** y disminuiría la producción de **CH<sub>4</sub>** sin afectar la digestibilidad de la dieta. Por lo tanto, el objetivo de este experimento fue determinar el efecto de la inclusión de aceite de maíz y su mezcla con aceite de palmiste (75:25) sobre la fermentación ruminal, la producción, composición de la leche y su perfil de **AG** de vacas en pastoreo.

## 4.2 Metodología

Todos los procedimientos fueron avalados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá (Acta 04 del año 2012).

### 4.2.1 Localización

El experimento se realizó en la Unidad de Bovinos del Centro Agropecuario Marengo de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, localizado a 4° 40' 89" de latitud norte y 74° 13' 13" de longitud oeste y a una altitud de 2540 msnm. En esta locación se presentan las siguientes condiciones ambientales: temperatura promedio de 13° C (con variaciones de 0 a 20° C), la humedad relativa oscila entre el 80 al 85% y la precipitación promedio anual es 900 mm/año con dos épocas marcadas de invierno (abril-mayo y septiembre-noviembre). El experimento tuvo lugar entre los meses de diciembre del año 2013 y febrero del año 2014.

### 4.2.2 Periodo experimental y tratamientos

El experimento duró un total de 63 días (d), divididos en 3 periodos de 21 d cada uno (14 d de acostumbramiento a los tratamientos y 7 d para la recolección de muestras). El forraje base fue kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) fertilizado con el protocolo sugerido por Castro, *et ál.*, (2008), para gramíneas en Sabana de Bogotá a una oferta diaria de 3 kg de **MS** por 100 kg de peso vivo; se suministraron 3 kg/d de ensilaje (30% **MS**) de maíz a cada vaca. Los tratamientos fueron: una dieta control (**C**) a base de kikuyo, ensilaje de maíz y concentrado, **M** la dieta control con suplementación de 720 g de aceite de maíz puro y **MP** la dieta control con suplementación de 720 g de una mezcla de aceite de maíz y palmiste en una proporción 75:25.

**Tabla 4.1** Composición química de los forrajes y el concentrado

<i>Ítem</i>	<i>Kikuyo</i>	<i>Silo de maíz</i>	<i>Concentrado</i>
	<i>% de la MS</i>		
<i>Proteína Cruda (PC)</i>	16.17	7.27	20.23
<i>Fibra en detergente neutro (FDN)</i>	51.22	56.81	16.16
<i>Fibra en detergente ácido (FDA)</i>	22.30	30.93	4.69
<i>Carbohidratos no estructurales (CNE)</i>	17.43	26.30	55.77
<i>Extracto etéreo (EE)</i>	3.31	2.26	0.91
<i>Cenizas</i>	11.87	7.37	6.93
<i>EN<sub>L</sub> (Mcal/kg de MS)<sup>1</sup></i>	1.88	1.98	2.02

<sup>1</sup>Energía neta de lactancia a 1x el consumo de mantenimiento (NRC, 2001)

**Tabla 4.2** Composición de ingredientes del concentrado

<b>Ingrediente</b>	<b>% de la MS</b>
<b>Torta de soya</b>	38.10
<b>Maíz molido</b>	26.60
<b>Melaza</b>	10.00
<b>Harina de yuca</b>	19.00
<b>Mogolla de trigo</b>	2.30
<b>Carbonato de calcio</b>	3.96
<b>Premezcla mineral</b>	0.04

**Tabla 4.3** Perfil de **AG** de los forrajes, concentrado, aceite de maíz (**M**) y aceite de maíz y palmiste (75:25 **MP**) (g/100 g de **AG**)

<b>Ácido Graso</b>	<b>Kikuyo</b>	<b>Ensilaje de maíz</b>	<b>Concentrado</b>	<b>M</b>	<b>MP</b>
<b>8:0</b>	1.01	5.85	0.52	-	-
<b>10:0</b>	2.26	1.65	1.64	-	-
<b>12:0</b>	-	-	-	-	8.40
<b>14:0</b>	-	-	1.05	0.13	2.91
<b>14:1<sub>c9</sub></b>	-	3.06	-	0.03	0.03
<b>16:0</b>	28.91	23.04	14.91	11.80	10.67
<b>16:1<sub>c9</sub></b>	13.97	-	10.60	0.03	0.05
<b>16:1</b>	-	-	-	0.21	0.26
<b>18:0</b>	-	-	-	5.18	4.87
<b>18:1<sub>c9</sub></b>	-	13.75	15.60	20.66	19.65
<b>18:2<sub>t9 t12</sub></b>	-	-	-	0.41	0.50
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	23.41	27.50	40.45	53.99	41.91
<b>18:3<sub>c6 c9 c12</sub></b>	-	-	-	0.26	0.15
<b>18:3<sub>c9 c12 c15</sub></b>	24.06	17.16	12.36	5.51	3.61
<b>Otros</b>	6.37	7.99	2.86	1.80	6.99

### 4.2.3 Animales y manejo

Se utilizaron 6 vacas Holstein (6.3 +/- 1.8 años de edad, 597 +/- 11.5 kg de peso, 160 +/- 29 días en lactancia y una producción láctea de 22.1 +/- 2.3 kg/d) que fueron asignadas aleatoriamente a un cuadrado latino doble (3 periodos, 3 tratamientos, 3 vacas, 2 cuadrados). Las vacas se ordeñaron con ordeño mecánico dos veces al día (5:00 y 14:00) y pastaron una pradera de kikuyo con pastoreo en franjas con cerca eléctrica, la cual se corría dos veces por día (a.m. y p.m.). En cada ordeño recibían 60 g de sal

mineralizada, 2.15 kg de **MS** de suplemento, 360 g de aceites, 4.5 g de óxido de cromo y 1.5 kg de ensilaje de maíz al final de cada ordeño.

Para calcular la biomasa forrajera, se determinaron las proporciones de la pradera con producciones de forraje baja, media o alta; luego se cosecharon 3 cuadrantes de 0.5 m<sup>2</sup> representativos de cada estrato para ser pesados y determinar la producción de forraje promedio de cada uno. El promedio se multiplicó por la proporción de cada estrato en el potrero para estimar la biomasa total disponible y asegurar una oferta forrajera estable. Para determinar el área de cada potrero se utilizó un equipo de geo-posicionamiento GPSMAP ® 76CSX (Garmin Ltda., Kansas, USA).

#### 4.2.4. Mediciones, toma de muestras y análisis de laboratorio

##### 4.2.4.1 Recolección de muestras

- **Leche:** Para cada periodo se registró la producción de leche en cada ordeño (a.m. y p.m.) entre los días 15 y 21 en los tres periodos. Se recolectaron muestras individuales de leche en los dos ordeños los días 15, 18 y 21 de cada periodo experimental en un volumen de 100 ml, las cuales posteriormente fueron mezcladas para obtener una muestra compuesta por vaca en cada día de muestreo. La muestra total fue dividida en dos alícuotas de 100 ml cada una; a cada una de estas se agregó 3 ml de una solución de dicromato de potasio al 6% y se conservó a -20° C para su análisis de calidad.
- **Forraje, ensilaje y suplementos:** Los días 14, 16, 18 y 20 de cada periodo se recolectó una muestra de forraje previa al pastoreo (500 g aproximadamente) mediante la metodología “hand plucking” descrita por Cook, (1964). Las muestras de forraje de cada día se mezclaron para obtener una muestra de cada periodo, se secaron a 60° C durante 48 horas y se molieron en un molino Romer® con una criba de 2 mm. Se tomó una muestra de cada uno de los suplementos el día 14 de cada periodo (500 g aproximadamente) y de ensilaje de maíz en los días 14, 16, 18 y 20 que se procesó de la misma forma que el forraje.
- **Fluido ruminal:** El fluido ruminal (250 ml) se recolectó a las 16:30 horas del día 21 de cada periodo utilizando una sonda oro-ruminal, descartando los primeros 200 ml por su posible contaminación con saliva. Se midió el pH con un

potenciómetro Beckman®; el fluido se acidificó y se almacenó a -20° C para posteriores análisis.

- **Heces:** Se recolectó una muestra diaria de heces (300 g aproximadamente) por estimulación del ano evitando la contaminación con orina entre los días 15 y 21 después del ordeño de la mañana. Las muestras fueron secadas a 60° C durante 48 horas y molidas en un molino Romer® con una criba de 2 mm y mezcladas para obtener una muestra por periodo para cada animal.

#### 4.2.4.2 Extracción y metilación de las grasas

- **Leche:** La extracción de la grasa de la leche se realizó por el método descrito por Hurley, *et al.*, (1987) y Díaz-González, *et al.*, (2002). Se centrifugaron 100 ml de leche (15 min a 3000 rpm), retirando la fracción acuosa; el sobrenadante cremoso se mezcló con 15 ml de solución detergente (50 g de hexametáfosfato de sodio y 24 ml de Tritón X-100 disueltos en 1 l de agua), se agitó, se colocó en baño de María (10 min a 90° C); se retiró la grasa de la capa superficial con una pipeta Pasteur y se almacenó a -20° C. Para la metilación se utilizó el método modificado de McCreary, *et al.*, (1978). Se recolectaron 100 µl de grasa y se solubilizaron en 900 µl de diclorometano. Se tomó una alícuota la cual fue derivatizada con 20 µl del reactivo de methyl esterification Meth-Prep II® (0.2 M m-trifluorometilfenil-trimetilamonio hidróxido en metanol, Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA) y 160 µl de diclorometano.
- **Forraje, ensilaje y suplementos:** Los **AG** del forraje, ensilaje y suplemento se determinaron por el método sugerido de Garcés y Mancha, (1993) adaptado por Yamasaki, *et al.*, (1999). Se pesaron 50 mg de forraje seco, ensilaje o suplemento, se agregaron 2150 µl de metanol absoluto, 990 µl de tolueno, 1000 µl de N,N-dimetilformamida, 66 µl de ácido sulfúrico al 99.9%, y 2 ml de n-hexano; la mezcla se colocó en un baño de María (2 horas a 80° C) y se dejó en reposo (5-10 minutos). El sobrenadante se evaporó mediante corriente de N y la muestra seca se reconstituyó con 300 µl de diclorometano para su posterior análisis por **CG**.

#### 4.2.4.3 Cuantificación de **AG**

Los **AG** metilados del forraje, ensilaje, suplementos y leche fueron cuantificados por **CG** utilizando un cromatógrafo de gases marca Shimadzu® modelo GC-2014 con detector tipo FID y columna capilar de 100 m x 0.25 mm x 0.2 µm. Rt 2560 (Restek®) con las siguientes condiciones cromatográficas: las temperaturas del puerto de inyección y del puerto de detección fueron de 260°C y 270°C respectivamente. La rampa de temperatura se programó de la siguiente manera: inicial 140°C por 5 minutos con un incremento posterior de 4°C por minuto hasta llegar a 190°C y se mantuvo así hasta llegar a una duración total del programa de 60 minutos. Se utilizó helio como gas de arrastre con una presión de 40.4 psi y un Split ratio de 1:100.

#### 4.2.4.4 Determinación de ácidos grasos volátiles (**AGV**)

Se tomaron 800 µl del fluido, a los cuales se les adicionaron 500 µl de solución interna desproteinizante y acidificante (100 g de ácido metafosfórico y 0.6 g de ácido crotonico. por l, 4° C). Los **AGV** (acético, propiónico, butírico, valérico e isoalérico) se cuantificaron por **CG** con un cromatógrafo de gases marca Shimadzu® modelo GC-2014 con detector tipo FID y una columna capilar de polietilenglicol de 25m x 0.32 mm x 0.5 µm Agilent® HP-FFAP (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: temperatura de 260°C para el puerto de inyección, temperatura del puerto de detección de 280°C detector, helio como gas de arrastre, inyección automática, un Split ratio de 1:50 y una duración del programa de 10 minutos.

#### 4.2.4.5 Análisis químicos

- **Forraje, ensilaje y suplementos:** El forraje, el ensilaje y las suplementaciones utilizados fueron analizados para **MS**, extracto etereo (**EE**), cenizas, PC-Kjeldahl (AOAC, 2006b) fibra en detergente neutro (**FDM**), fibra en detergente ácido (**FDA**) (Van Soest, *et al.*, 1991), fibra en detergente ácido indigerible (**FDAI**) (Sunvold y Cochran, 1991) y cuantificación de **AG** de cadena larga por **CG**. Los **CNE** y **EN<sub>L</sub>** se estimaron según lo propuesto por el NRC, (2001).
- **Leche:** La calidad composicional de la leche fue evaluada por ultrasonografía (Priev y Barenholz, 2010) con un equipo Laktan® 1-4 220.

- **Fluido ruminal:** El pH del fluido ruminal se midió con un potenciómetro Beckman®.
- **Heces:** La concentración de **FDAi** se determinó mediante la metodología sugerida por Sunvold y Cochran (1991). El cromo fue determinado por espectroscopia fluorescente de rayos X (S2 PICOFOX® de BRUKER®).

#### 4.2.5 Cálculos

- **Concentración de CH<sub>4</sub>:** Se realizó mediante la ecuación 4-1 (Ramin y Huhtanen, 2012).

$$\text{CH}_4 \text{ (ml/100 mol AGV}_s\text{)} = 22.4 \times (0.5 \times C_2 - 0.25 \times C_3 + 0.50 \times C_4 - 0.25 \times AV) \quad (4-1)$$

Donde: C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y AV son las proporciones de ácidos acético, propiónico, butírico y valérico respectivamente.

- **Leche corregida por energía (LCE):** Se calculó mediante la ecuación 4-2 (Dairy Records Management Systems, 2011)

$$\text{LCE (kg/d)} = (0.327 \times \text{leche kg/d}) + (12.95 \times \text{grasa kg/d}) + (7.65 \times \text{proteína kg/d}) \quad (4-2)$$

- **Consumo de forraje:** Se empleó óxido de cromo (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) como marcador indigerible externo para determinar la producción de heces (Holden, *et ál.*, 1994) y **FDAi** como marcador indigerible interno (Sunvold y Cochran, 1991). La producción de heces (kg/d) se determinó usando la ecuación 4-3.

$$\text{PH} = \text{DME} \times [\text{MEH}]^{-1} \times 1000^{-1} \quad (4-3)$$

Donde: PH es la producción de heces (kg de MS/d); DME es la cantidad del marcador externo (g de Cromo/d); [MEH] es la concentración del marcador externo en las heces (g de Cromo/g de **MS** de heces).

El consumo de forraje se determinó por la ecuación 4-4 (Aguilar, *et al.*, 2009).

138 | Suplementación con aceites de maíz y su mezcla con aceite de palmiste vacas en pastoreo: fermentación ruminal, producción de leche y perfil de ácidos grasos

$$CF = (PH \times [FDAi]_H - CS \times [FDAi]_S) \times [FDAi]_F^{-1} \quad (4-4)$$

Donde: CF es el consumo de forraje (kg de **MS**/d); PH es la producción de heces (kg de MS/d);  $[FDAi]_H$ ,  $[FDAi]_S$  y  $[FDAi]_F$  son las concentraciones de **FDAi** en heces, suplemento y forraje respectivamente (g de **FDAi**/g de **MS** de heces, suplemento o forraje); CS es el consumo de suplemento (kg de **MS**/d).

- **Índice de aterogenicidad:** Se calculó con la ecuación 4-5, (Ulbricht y Southgate, 1991).

$$IA = (SC_{12} + 4SC_{14} + SC_{16}) \times AGI^{-1} \quad (4-5)$$

Donde: IA es el índice de aterogenicidad;  $SC_{12}$ ,  $SC_{14}$  y  $SC_{16}$  **AG** saturados de 12, 14 y 16 carbonos respectivamente; AGI es la sumatoria de los **AG** insaturados.

- **Índice de trombogenicidad:** Se calculó con la ecuación 4-6 (Ulbricht y Southgate, 1991).

$$IT = (SC_{14} + SC_{16} + SC_{18}) \times [0.5Ml + 0.5\omega6 + 3\omega3 + (\omega3/\omega6)]^{-1} \quad (4-6)$$

Donde: IT es el índice de trombogenicidad;  $SC_{14}$ ,  $SC_{16}$  y  $SC_{18}$  **AG** saturados de 14, 16 y 18 carbonos respectivamente; *Ml* sumatoria **AG** monoinsaturados;  $\omega3$  y  $\omega6$  **AG** de la serie omega 3 y 6 respectivamente.

#### 4.2.6 Diseño experimental

Se empleó un cuadrado latino doble con estimación del efecto residual 3 x 3 x 3 (3 periodos, 3 tratamientos, 3 vacas y 2 cuadrados) (Martínez, *et al.*, 2011). Se compararon los efectos de la suplementación sobre las variables de producción animal y parámetros de la fermentación ruminal. El análisis estadístico se realizó utilizando el procedimiento PROC GLM del sistema estadístico SAS, (1998).

$$Y_{ij(k)} = \mu + YI + \alpha(Y)_{il} + \lambda(Y)_{jl} + T(k) + e_{ij(k)} \text{ Donde:}$$

- $Y_{ij}$  = la lectura del  $i$ -ésimo periodo en el  $j$ -ésimo animal,  $k$ -ésimo tratamiento (efecto directo y residual) y  $l$ -ésimo cuadrado
- $\mu$  = el promedio poblacional de la variable respuesta.
- $Y_l$  = es el efecto del  $l$ -ésimo cuadrado ( $l=1, 2$ )
- $\alpha(Y)_{il}$  = es el efecto del  $i$ -ésimo periodo ( $i= 1,2,3$ ) dentro del  $l$ -ésimo cuadrado ( $l= 1, 2$ )
- $\lambda(Y)_{jl}$  = es el efecto del  $j$ -ésimo animal ( $j= 1, 2, 3$ ) dentro del  $l$ -ésimo cuadrado ( $l= 1, 2$ )
- $T_j$  = el efecto del  $k$ -ésimo tratamiento ( $k=1, 2, 3$ ) discriminado en efecto directo y residual
- $e_{ijk}$  = es el error asociado con la lectura del  $k$ -ésimo tratamiento en el  $j$ -ésimo animal y en el  $i$ -ésimo periodo

Se realizaron comparaciones de medias no planeadas (Tukey), con un nivel de significancia del 5%. El modelo cumplió con los supuestos de homogeneidad del material experimental, que el error experimental es una variable aleatoria, independiente, con distribución normal, media igual a 0 y varianzas homogéneas.

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Parámetros de fermentación ruminal

La digestibilidad de la **MS**, **MO**, **FDN** y **FDA** de la dieta y las proporciones molares de **AGV** no fueron diferentes entre los tres tratamientos. La adición de aceites disminuyó la concentración de **AGV**, aumentó el pH del rumen y no afectó la producción total de **CH<sub>4</sub>** pero disminuyó la cantidad de **CH<sub>4</sub>** producido por mol de **AGV** para estos tratamientos.

**Tabla 4.4** Efecto de la suplementación (720 g/d) de aceite de maíz (**M**) y su mezcla con aceite de palmiste (**MP**) sobre parámetros de fermentación ruminal

Variable	Tratamiento			ESM <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>
	C	M	MP		
<b>Digestibilidad (%)</b>					
<b>MS</b>	59.9	60.3	59.1	0.693	NS
<b>MO</b>	62.6	61.9	62.6	0.567	NS
<b>FDN</b>	57.2	56.8	54.1	0.898	NS
<b>FDA</b>	25.5	27.5	25.2	0.672	NS
<b>Fluido ruminal</b>					
pH	6.50 <sup>b</sup>	6.88 <sup>a</sup>	6.85 <sup>a</sup>	0.043	*
<b>AGV (mmol/l)</b>	94.7 <sup>a</sup>	79.2 <sup>b</sup>	74.0 <sup>b</sup>	3.060	***
Acético (%)	64.0	63.8	63.4	0.193	NS
Propiónico (%)	22.6	22.3	22.3	0.203	NS
Butírico (%)	12.8	13.2	13.7	0.228	NS
Valérico (%)	0.6	0.7	0.6	0.035	NS
Acético:Propiónico	2.8	2.9	2.8	0.030	NS
<b>CH<sub>4</sub> (ml/100 moles AGV)</b>	729.7	734.3	735.0	2.710	NS
<b>CH<sub>4</sub> corregido (ml/mol producidas)</b>	690.6 <sup>a</sup>	581.6 <sup>b</sup>	544.4 <sup>b</sup>	22.234	**

<sup>1</sup>Error estándar de la media de los tratamientos. <sup>2</sup>Significancia; NS: no significativa; letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas \*: p<0.05 \*\*: p<0.01 y \*\*\*: p<0.001

### 4.3.2 Consumo de MS

Los consumos de **MS** de forraje y totales no se vieron afectados por los tratamientos. Los consumos de ensilaje y suplemento fueron constantes entre los tres periodos y no se presentaron rechazos de estas fuentes alimenticias.

**Tabla 4.5** Consumo (kg/d) de kikuyo, concentrado, ensilaje y aceites de vacas lecheras en pastoreo

Variable	Tratamiento			ESM <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>
	C	M	MP		
Kikuyo	12.2	12.1	12.3	0.258	NS
Concentrado	4.2	4.2	4.2		
Ensilaje	0.9	0.9	0.9		
Aceite	0	0.72	0.72		
Total	17.3	17.9	18.1	0.270	NS

<sup>1</sup>Error estándar de la media de los tratamientos. <sup>2</sup>Significancia **C**: control sin aceite, **M**: aceite de maíz puro, **MP**: mezcla de aceites de maíz y palmiste (75:25)

### 4.3.3 Producción, composición de la leche

La producción diaria de leche y leche corregida por energía (**LCE**) fue menor para el tratamiento **C** sin aceites respecto a los tratamientos con la adición de estos. Comparado con el control, la concentración de sólidos totales y grasa en la leche fue superior para las vacas suplementadas con los aceites pero no se encontraron diferencias significativas entre los aceites y no hubo diferencias significativas en la concentración de proteína entre los tres tratamientos. Comparado con **C**, las producciones diarias de sólidos totales, grasa y proteína en leche fueron superiores para las vacas suplementadas con los aceites.

**Tabla 4.6** Producción y composición de la leche de vacas sin suplementar (**C**) y con suplementación de aceite de maíz (**M**) o su mezcla con aceite de palmiste (**MP**)

Variable	Tratamiento			ESM <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>
	C	M	MP		
<b>Leche</b>					
Producción (kg/d)	21.4 <sup>b</sup>	23.6 <sup>a</sup>	23.9 <sup>a</sup>	0.326	**
Producción <b>LCE</b> (kg/d)	19.5 <sup>b</sup>	23.2 <sup>a</sup>	23.5 <sup>a</sup>	0.480	**
<b>Sólidos totales</b>					
Concentración (%)	10.8 <sup>b</sup>	11.8 <sup>a</sup>	11.6 <sup>a</sup>	0.148	*
Producción (kg/d)	2.31 <sup>b</sup>	2.78 <sup>a</sup>	2.76 <sup>a</sup>	0.061	*
<b>Proteína</b>					
Concentración (%)	3.07	3.19	3.11	0.025	NS
Producción (kg/d)	0.66 <sup>b</sup>	0.75 <sup>a</sup>	0.74 <sup>a</sup>	0.022	**
<b>Grasa</b>					
Concentración (%)	3.15 <sup>b</sup>	3.40 <sup>a</sup>	3.43 <sup>a</sup>	0.038	*
Producción (kg/d)	0.67 <sup>b</sup>	0.80 <sup>a</sup>	0.82 <sup>a</sup>	0.017	**

<sup>1</sup>Error estándar de la media de los tratamientos. <sup>2</sup>Significancia; NS: no significativa; letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas \*: p<0.05 \*\*: p<0.01 y \*\*\*: p<0.001

### 4.3.4 Perfil de AG de la leche

Las concentraciones de los **AG 4:0, 6:0, 13:0, 15:0, 16:1<sub>t9</sub>, 16:1<sub>c9</sub>, 17:0, 17:1<sub>c9</sub>, 18:2<sub>c9 c12</sub>, 18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** en la leche no fueron diferentes al igual que en los **AG** sin identificar. Se presentaron mayores niveles de los **AG 8:0, 10:0, 11:0 y 18:2<sub>t10 c12</sub>** en la leche de vacas en el tratamiento **C** respecto a las suplementadas con aceites. La concentración del **AG**

**12:0**, **14:0** y **16:0** en la leche fue superior en **C** y **MP** en relación al tratamiento **M**. Para los **AG 14:1<sub>t9</sub>**, **16:1<sub>t9</sub>**, **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub>** se presentaron efectos residuales de los tratamientos. La adición de aceites aumentó las concentraciones de **18:0**, **18:1<sub>c9</sub>**, **18:1<sub>c11</sub>**, **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub>** **ALC** en la leche en relación al tratamiento **C** aunque estas fueran mayores para el tratamiento **M**.

**Tabla 4.7** Composición de **AG** de la leche (g/100 g de **AG**) de vacas en pastoreo suplementadas con aceite de maíz (**M**) o una mezcla de aceite de maíz y palmiste (**MP**)

AG	Tratamiento			ER <sup>1</sup>	ESM <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>
	C	M	MP			
<b>4:0</b>	2.31	2.44	2.54	NS	0.058	NS
<b>6:0</b>	1.93	1.64	1.76	NS	0.044	NS
<b>8:0</b>	1.24 <sup>a</sup>	0.95 <sup>b</sup>	1.03 <sup>b</sup>	NS	0.043	*
<b>10:0</b>	3.00 <sup>a</sup>	2.07 <sup>b</sup>	2.26 <sup>b</sup>	NS	0.130	**
<b>11:0</b>	0.40 <sup>a</sup>	0.23 <sup>b</sup>	0.28 <sup>b</sup>	NS	0.026	*
<b>12:0</b>	3.74 <sup>a</sup>	2.48 <sup>b</sup>	3.45 <sup>a</sup>	NS	0.173	*
<b>13:0</b>	0.09	0.05	0.07	NS	0.008	NS
<b>14:0</b>	12.55 <sup>a</sup>	9.99 <sup>c</sup>	11.28 <sup>b</sup>	NS	0.299	**
<b>14:1<sub>t9</sub></b>	0.29 <sup>a</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.22 <sup>b</sup>	*	0.010	**
<b>14:1<sub>c9</sub></b>	0.34 <sup>a</sup>	0.28 <sup>b</sup>	0.27 <sup>b</sup>	NS	0.011	*
<b>15:0</b>	1.42 <sup>a</sup>	1.06 <sup>b</sup>	1.15 <sup>b</sup>	NS	0.089	NS
<b>15:1</b>	1.31 <sup>a</sup>	0.94 <sup>b</sup>	0.97 <sup>b</sup>	NS	0.047	*
<b>16:0</b>	36.82 <sup>a</sup>	27.55 <sup>b</sup>	30.97 <sup>b</sup>	NS	1.046	*
<b>16:1<sub>t9</sub></b>	0.27	0.26	0.25	*	0.011	NS
<b>16:1<sub>c9</sub></b>	1.66	1.16	1.30	NS	0.079	NS
<b>17:0</b>	0.33	0.21	0.20	NS	0.021	NS
<b>17:1<sub>c9</sub></b>	0.81	0.68	0.58	NS	0.031	NS
<b>18:0</b>	9.15 <sup>b</sup>	13.65 <sup>a</sup>	12.46 <sup>a</sup>	NS	0.585	*
<b>18:1<sub>t9</sub></b>	1.27 <sup>c</sup>	3.32 <sup>a</sup>	1.93 <sup>b</sup>	**	0.217	**
<b>18:1<sub>c9</sub></b>	17.50 <sup>b</sup>	25.63 <sup>a</sup>	23.11 <sup>a</sup>	NS	1.007	*
<b>18:1<sub>t11</sub></b>	0.74 <sup>b</sup>	1.86 <sup>a</sup>	1.14 <sup>ab</sup>	NS	0.103	*
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	0.81	1.12	1.04	NS	0.047	NS
<b>18:3<sub>c9 c12 c15</sub></b>	0.32	0.26	0.23	NS	0.012	NS
<b>18:2<sub>c9 t11</sub> ALC<sup>4</sup></b>	0.68 <sup>c</sup>	1.56 <sup>a</sup>	1.01 <sup>b</sup>	*	0.045	**
<b>18:2<sub>t10 c12</sub> ALC</b>	0.11 <sup>a</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.06 <sup>b</sup>	NS	0.006	*
Otros	0.90	0.60	0.42	NS	0.043	NS

<sup>1</sup>Efecto residual. <sup>2</sup>Error estándar de la media de los tratamientos. <sup>3</sup>Significancia; NS: no significativa; letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas \*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$  y \*\*\*:  $p < 0.001$ . <sup>4</sup>Variable transformada por su raíz

La adición de aceites aumentó el nivel de **AG** monoinsaturados, poliinsaturados y preformados en la leche y disminuyó los índices de trombogenicidad y aterogenicidad.

**Tabla 4.8** Efecto de la suplementación de maíz (**M**) o una mezcla de aceite de maíz y palmiste (**MP**) sobre la composición de **AG** de la leche (g/100 g de **AG**)

Variable	Tratamiento			ESM <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>
	C	M	MP		
	(g/100 g de <b>AG</b> )				
Saturados	72.99 <sup>a</sup>	62.32 <sup>c</sup>	67.45 <sup>b</sup>	1.172	*
Insaturados	26.11 <sup>c</sup>	37.08 <sup>a</sup>	31.92 <sup>b</sup>	1.202	*
Monoinsaturados	24.19 <sup>c</sup>	34.04 <sup>a</sup>	29.58 <sup>b</sup>	1.092	*
Poliinsaturados	1.92 <sup>c</sup>	3.03 <sup>a</sup>	2.34 <sup>b</sup>	0.125	*
Impares	4.36 <sup>a</sup>	3.18 <sup>b</sup>	3.25 <sup>b</sup>	0.177	*
De novo (≤ 17 C)	68.51 <sup>a</sup>	52.22 <sup>c</sup>	58.58 <sup>b</sup>	1.742	**
Preformados (≥ 18C)	30.59 <sup>c</sup>	47.18 <sup>a</sup>	40.79 <sup>b</sup>	1.778	**
Saturados:Insaturados	2.81 <sup>a</sup>	1.69 <sup>b</sup>	2.13 <sup>b</sup>	0.127	*
ω3/ω6	0.35 <sup>a</sup>	0.22 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.024	*
Índice de aterogenicidad	2.05 <sup>a</sup>	1.08 <sup>c</sup>	1.44 <sup>b</sup>	0.106	*
Índice de trombogenicidad	3.87 <sup>a</sup>	2.16 <sup>c</sup>	2.84 <sup>b</sup>	0.186	*

<sup>1</sup>Error estándar de la media de los tratamientos. <sup>2</sup>Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas \*: p<0.05 \*\*: p<0.01 y \*\*\*: p<0.001

## 4.4 Discusión

En este trabajo se exploró el efecto de suplementar aceite de maíz o su mezcla con aceite de palmiste (75:25) sobre la fermentación ruminal, la producción y composición de la leche y su perfil de **AG** de vacas en pastoreo. Teniendo en cuenta los trabajos *in vitro* de esta tesis, se especuló que el aceite de maíz aumentaría las concentraciones de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub>** en la leche y que su combinación con aceite de palmiste reduciría más el **CH<sub>4</sub>** que el aceite de maíz solo.

### 4.4.1 Fermentación ruminal

Los lípidos presentan distintos mecanismos por los cuales pueden modificar la fermentación ruminal y reducir la producción de **CH<sub>4</sub>**, entre los que se destacan la

reducción de la digestibilidad de la dieta, cambios en las rutas fermentativas en el rumen, efectos tóxicos sobre ciertas poblaciones de microorganismos ruminales, biohidrogenación (**BH**) de **AG** insaturados, una disminución en el consumo voluntario o una modificación en la proporción de carbohidratos fermentables de la dieta como consecuencia del reemplazo de energía fermentable por lípidos (Johnson y Johnson, 1995; Giger-Riverdin, *et al.*, 2003; McGinn, *et al.*, 2004; Yabuuchi, *et al.*, 2006; Beauchemin, *et al.*, 2008; Martin, *et al.*, 2010; Patra, 2013; Patra, 2014).

Aunque en este trabajo no se midió directamente la producción de **CH<sub>4</sub>**, esta se estimó por medio de los productos finales de la fermentación (Rahmin y Huhtanen, 2012). Las inclusiones de aceites al 4% de la dieta disminuyeron la producción estimada de **CH<sub>4</sub>** en más de un 16% (Tabla 4.4). Autores como Giger-Riverdin, *et al.*, (2003), Eugène, *et al.*, (2008) y Beauchemin, *et al.*, (2008) reportan que la producción de **CH<sub>4</sub>** se reduce entre un 2.2% y un 5% por unidad de lípido suplementada. Patra, (2013) y Patra, (2014) en meta-análisis reporta disminuciones lineales en vacas y ovejas de 4.3% de las emisiones totales de **CH<sub>4</sub>** por unidad de lípido suplementada. En nuestro caso puede calcularse que por cada unidad de aceite adicionado se redujo la producción estimada de **CH<sub>4</sub>** en cerca de un 4%.

Varios autores han encontrado que la adición de aceites a dietas de los rumiantes reduce la relación acetato:propionato como consecuencia de una menor degradación de la fibra en el rumen (Mohamed, *et al.*, 1988; Machmüller, *et al.*, 2000; Boadi, *et al.*, 2003; Beauchemin, *et al.*, 2007; Beauchemin, *et al.*, 2008; Patra, 2013; Patra, 2014) lo que explica en parte las menores producciones de **CH<sub>4</sub>** en animales suplementados con aceites. Sin embargo, en el presente trabajo las proporciones molares de acetato no disminuyeron en relación a las de propionato debido a la adición de aceites. Las concentraciones de **AGV** totales si se redujeron, lo que explica las menores producciones estimadas de **CH<sub>4</sub>**. Las menores concentraciones de **AGV** resultan consistentes con el mayor pH ruminal en los tratamientos con aceites (Tabla 4.4). Salvo para el caso de la digestibilidad, los resultados *in vivo* son consistentes con los observados *in vitro* en esta tesis, en los cuales la adición de aceites redujo la producción de **AGV**, la producción de **CH<sub>4</sub>** y aumento el pH del inoculo. De la misma manera, Ueda, *et al.* (2003) reportan niveles de pH en fluido ruminal de 6.34 para un control sin adición de grasa y de 6.44 para dietas con inclusiones de hasta un 3% de aceite de linaza. Mayores valores de pH

en el rumen de animales que consumen dietas con adición de aceites pueden ser explicados por una reducción en la fermentación ruminal que trae como consecuencia una menor concentración de **AGV** (Machmüller, *et al.*, 2000; Machmüller, *et al.*, 2003; Machmüller, *et al.*, 2006).

Los efectos negativos de los aceites sobre la fermentación ruminal han sido ampliamente reportados (Machmüller, *et al.*, 2000; Giger-Riverdin, *et al.*, 2003; Machmüller, *et al.*, 2003; McGinn, *et al.*, 2004; Machmüller, *et al.*, 2006; Jordan, *et al.*, 2006; Beauchemin, *et al.*, 2007; Beauchemin, *et al.*, 2008; Eugène, *et al.*, 2008; Patra y Yu, 2013; Patra, 2013; Patra, 2014). Aunque la digestibilidad ruminal no fue medida en el presente estudio si se midió la digestibilidad total. Los coeficientes de digestibilidad total aparente de **MS**, **MO**, **FDN** y **FDA** en el tracto gastrointestinal no fueron diferentes debido a la adición de aceites. Varios autores tampoco han encontrado efectos negativos de los aceites en la digestibilidad de todo el tracto digestivo. Doreau, *et al.*, (1991) reportan degradabilidades de la **MO** similares entre un control sin grasa y la inclusión de aceite de colza hasta un 10% de la dieta. Hussein, *et al.*, (1995) suplementaron 10% de aceite de canola a la dieta de novillas de reemplazo y esto no afectó la digestibilidad de la fibra. Bateman y Jenkins, (1998) reportaron digestibilidades de **MS**, **MO** y **FDA** similares entre un tratamiento control (sin inclusión de grasa) e inclusiones de hasta un 8% de aceite de soya a dietas de vacas lecheras. Adicionalmente, Ueda, *et al.*, (2003) con inclusiones inferiores de aceite de linaza a dietas a las usadas en nuestro ensayo (3%) con diferentes relaciones forraje:concentrado tampoco reportan efectos negativos sobre la digestibilidad de **MS**, **MO**, **FDN**, **FDA** en vacas lecheras. Sin embargo, la ausencia de efecto de la adición de aceites sobre digestibilidades de todo el tracto gastrointestinal no implica que la fermentación ruminal no sea disminuida por la adición de aceites. Algunos trabajos han reportado que la menor digestibilidad en el rumen como consecuencia del uso de aceites en la dieta de rumiantes puede ser compensada por una mayor digestibilidad en el tracto posterior (Ikwuegbu y Sutton, 1982; Suttton, *et al.*, 1983; Faichney, *et al.*, 2002). El efecto neto de esta modificación en el sitio de digestión (rumen vs tracto posterior) sobre las producciones de **CH<sub>4</sub>** por el animal no se pueden predecir. No obstante, si la adición de lípidos disminuye la fermentación ruminal de los almidones y esta se compensa en el intestino delgado, esto resultaría en una menor producción de **CH<sub>4</sub>** como consecuencia de una menor fermentación total de carbohidratos. Ueda, *et al.*, (2003) reportan una interacción significativa entre la proporción forraje:concentrado y la adición de aceite de

linaza a un 3% en vacas lecheras, siendo que en una dieta compuesta de forraje y concentrado se afecta la degradación del almidón con la inclusión de aceite respecto a dietas de solo forraje, forraje con aceite y concentrado con aceite.

En este trabajo también se buscaba comparar el efecto del perfil de **AG** de los aceites sobre la fermentación ruminal y en particular el efecto de adicionar aceite de palmiste. Para esto se usó un aceite de maíz rico en **18:2<sub>c9 c12</sub>** y una mezcla de maíz con aceite de palmiste que es rico en **12:0** y **14:0**. La reducción en la producción de **CH<sub>4</sub>** debida a la sustitución de 25% del aceite de maíz por aceite de palmiste fue de 5.4% adicional. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa. Machmüller, *et al.*, (2000) tampoco encontraron diferencias en la producción de **CH<sub>4</sub>** entre el aceite de coco (perfil similar al aceite de palmiste) y la adición de semillas de girasol (ricas en **18:2<sub>c9 c12</sub>** como el de maíz) al ser adicionados a dietas para corderos. Sin embargo, en otro estudio el mismo grupo de investigación (Machmüller, *et al.*, 1998) reportó menores producciones de **CH<sub>4</sub>** para el aceite de coco en un sistema de fermentación continua (RUSITEC). Autores como Giger-Riverdin, *et al.*, (2003), Eugène, *et al.*, (2008), Beauchemin, *et al.*, (2008), Patra, (2013) y Patra, (2014) sugieren un mayor efecto antimetanogénico para lípidos ricos en **AG** saturados de cadena media (**12:0** y **14:0** principalmente). Es posible que para lograr estos efectos, se deban usar mayores concentraciones de aceites ricos en estos ácidos que las usadas en el presente ensayo. No obstante, mayores concentraciones a las usadas en este experimento pueden generar efectos negativos sobre la degradación de la **MS** y las fibras (Jordan, *et al.*, 2006) que resultarían indeseables, pues afectarían negativamente la productividad animal.

#### 4.4.2 Consumo de materia seca (**MS**)

La inclusión de grasas y aceites en la dieta de las vacas lecheras permite aumentar la densidad energética de la misma, al igual que el consumo de energía, siempre y cuando el consumo voluntario de **MS (CVMS)** no se vea afectado negativamente (Schroeder, *et al.*, 2004). La suplementación de energía mediante el uso de grasas y aceites ha sido ampliamente documentada en sistemas donde se emplean dietas totalmente mezcladas (**TMR** por sus siglas en inglés). En dichos sistemas de alimentación, la mayoría de autores concuerdan en que se presentan disminuciones del **CVMS** aún cuando se empleen grasas protegidas (Palmquist, 1984; Gagliostro y Chilliard, 1992; Schroeder, *et*

*al.*, 2004), siendo que los efectos son mayores cuando se superan concentraciones del 8 o 9% (Palmquist y Jenkins, 1980) y cuando aumenta la proporción de **AG** insaturados en las fuentes lipídicas (Firkins y Eastridge, 1994; Bremmer, *et al.*, 1998). En sus revisiones de trabajos realizados en vacas en pastoreo, Schroeder, *et al.*, (2004) y Bargo, *et al.*, (2003) no encontraron efecto de la suplementación con grasa sobre el **CVMS** al igual que lo reportado por Ueda, *et al.*, (2003) con la adición de aceite de linaza en cantidades crecientes a dietas con relaciones variables de forraje:concentrado, Zheng, *et al.*, (2005) con la inclusión de distintos aceites vegetales (0.5 kg de aceite de semilla de algodón, soya o maíz) en sistemas **TMR**, Benchaar, *et al.*, (2012) en sistemas similares con suplementaciones de hasta un 4% de aceite de linaza en vacas no lactantes y Dai, *et al.*, (2011), quienes reportan consumos similares entre un control sin grasa respecto a la suplementación con aceite de colza, maní o girasol. Sin embargo y en contradicción a lo anterior, Bateman y Jenkins, (1998) reportan una disminución en el **CVMS** cuando se suministran cantidades crecientes de aceite de soya al igual que Veira, *et al.*, (2001), quienes reportan disminución con niveles de hasta un 3% del total de la dieta. Teniendo en cuenta lo anterior, se puede afirmar que una mayor cantidad de grasa o aceite adicionada a la dieta, así como un mayor grado de insaturación de los lípidos suplementarios no siempre generan disminución en el **CVMS**. La suplementación de grasa en este ensayo fue de 720 g, representando un 4% del total de la dieta. Las fuentes lipídicas utilizadas presentaron niveles superiores al 70% de **AG** insaturados y cercanas al 4% recomendado por el NRC, (2001) para niveles de grasa proveniente del suplemento. La inclusión de lípidos se encontró muy por debajo de los niveles empleados por la mayoría de autores en la literatura (Schroeder, *et al.*, 2004). Las cantidades totales de grasa en cada uno de los tratamientos fueron de 2.69% para **C**, 5.97% para el tratamiento **M** y 5.93% para **MP**.

Sumado a lo anterior, cabe resaltar que en los sistemas **TMR** la oferta de alimento no suele ser una limitante, contrario a lo que sucede en los sistemas pastoriles en la Sabana de Bogotá, donde la oferta alimenticia es inferior al potencial **CVMS**. En este ensayo, el **CVMS** estuvo entre 2.9 y 3 kg de **MS**/100 kg del peso vivo si se cuantifican los consumos de forraje, ensilaje y suplemento. Habiendo establecido una oferta forrajera de 3 kg de **MS**/100 kg del peso vivo, se puede hipotetizar que existió una restricción al consumo potencial de la pastura, lo cual generó un efecto de adición donde los animales tendieron a consumir todo lo que les fuese ofrecido para satisfacer sus requerimientos nutricionales

con ausencia de fenómenos de sustitución en el consumo de forraje. Los niveles bajos de suplementación de aceite, de grasa total de los tratamientos y la restricción alimenticia explican el hecho de que no se hayan presentado diferencias en **CVMS**.

#### 4.4.3 Producción, calidad de la leche

De acuerdo a la revisión de la literatura, se esperaba que la adición de aceites ricos en **AG** poliinsaturados a la dieta de vacas en pastoreo aumentara el volumen de leche y disminuyera la concentración de la grasa láctea (Rabiee, *et al.*, 2012; Schroeder, *et al.*, 2004). Coincidiendo con otros reportes (Gagliostro y Chilliard, 1992; Wu y Huber, 1994; Schroeder, *et al.*, 2004; Van Knegsel, *et al.*, 2004; Rabiee, *et al.*, 2012), la producción de leche aumentó ante el aporte suplementario de los aceites cerca del 11%. Este aumento fue independiente de la fuente de aceite utilizada (**M** o **MP**). La mayor producción de leche asociada a la adición de aceites a la dieta ha sido generalmente atribuida a un aumento en el consumo en energía (Van Knegsel, *et al.*, 2004; Schroeder, *et al.*, 2004). En nuestro estudio, la adición de aceites a la dieta también incrementó la concentración de grasa en la leche independientemente de la fuente resultando en un aumento de cerca del 19% en la **LCE**. Algunos autores sugieren que las fuentes de **AG** poliinsaturados pueden disminuir la síntesis de la grasa láctea resultando en una menor producción de leche corregida por grasa o energía (Schroeder, *et al.*, 2004) lo cual no ocurrió en este estudio. Bargo, *et al.*, (2003) y Schroeder, *et al.*, (2004) sugieren que en animales en pastoreo la principal limitante para la producción es el consumo de energía restringidos y que la producción de leche aumenta proporcionalmente al mayor consumo de energía en la ración sin modificar su composición. En este estudio, la oferta de pastura (**MS**) fue ajustada al 3% del peso vivo, por lo cual se esperaría un aumento en la producción de leche con la adición de los aceites por un mayor consumo de energía en la dieta sin que se modificara la concentración de grasa. Sin embargo, la concentración de grasa aumentó reflejando que la captura de **AG** preformados en los tratamientos con aceites superó la disminución observada de los **AG** sintetizados *de novo* en la glándula mamaria (tabla 4.8). La menor producción y síntesis de grasa en el tratamiento control se explica también debido a una mayor concentración de **18:2<sub>t10 c12</sub> ALC** respecto a los tratamientos con adición de aceites (tabla 4.7). La inclusión de fuentes alimenticias o condiciones que favorezcan la síntesis de sus precursores en el rumen (bajo pH, tabla 4.4) o de otros **AG** (**18:2<sub>18 c10</sub> CLA**) inhiben la síntesis de grasa en la glándula mamaria,

reduciendo la actividad y/o expresión de genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos (Bauman y Griinari, 2001; Baumgard, *et al.*, 2002; Peterson, *et al.*, 2003).

Diversos autores indican que la suplementación de grasas con alto grado de insaturación como las usadas en este estudio (>60%) disminuye la concentración de grasa láctea (Garnsworthy, 1997; Bauman y Griinari, 2001; Chilliard, *et al.*, 2001). Se argumenta que la inclusión de dichas fuentes afecta la degradación de la fibra disminuyendo la proporción de los **AGV** acético y butírico, precursores de la síntesis *de novo* de **AG** de cadena media y corta en la glándula mamaria (Schroeder, *et al.*, 2004). En este ensayo la suplementación con aceites redujo la concentración de **AGV** en el rumen, lo cual sugeriría que los aceites disminuyeron el aporte neto de precursores (acetato y butirato) de la síntesis *de novo*. Sin embargo, la concentración de grasa láctea no se redujo con la adición de aceites y las cantidades de grasa producida (g/d) a partir de **AG** sintetizados *de novo* ( $\leq 17$  carbonos) fueron similares (459, 423, 474 g/d para **C**, **M** y **MP** respectivamente). La mayor concentración de grasa en la leche se explicó en parte por un aumento en las cantidades de grasa (g/d) que contenían **AG** de  $\geq 18$  carbonos (205, 387, 336 g/d para **C**, **M** y **MP**, respectivamente) probablemente de origen dietario. Storry, *et al.*, (1967) reportaron aumentos de 0.3 puntos porcentuales de grasa láctea con el uso de aceite de palma y coco respecto a un tratamiento control bajo en grasa (3.99, 3.97 y 3.63% respectivamente) en vacas en un sistema **TMR**. Estos investigadores concluyen que bajas cantidades de grasa en la dieta de vacas lecheras generan menores porcentajes y producciones de grasa en leche, y que la síntesis y producción de esta se incrementa cuando la grasa de la dieta aumenta como es el caso de nuestro estudio. Glasser, *et al.*, (2008) en un meta-análisis de la relación entre el flujo de **AG** al duodeno y la síntesis de grasa en leche encontró que cuando la concentración de **AG**  $\geq 18$  carbonos estaba por debajo de 52% en la grasa láctea la adición de grasas a la ración aumentaba las concentraciones de estos **AG** en la leche. En nuestro trabajo, la concentración de **AG** de  $\geq 18$  carbonos del total de la grasa láctea en el tratamiento control fue muy inferior a este valor (30.6%) y las concentraciones de  $\geq 18$  carbonos aumentaron en los tratamientos **M** (47.2%) y **MP** (40.2%).

Diversos trabajos sugieren que la suplementación con grasas reduce la concentración de la proteína láctea (Loor, *et al.*, 2002; Loor y Herbein, 2003; Zhang, *et al.*, 2006) con un

posible aumento en la producción de proteína (g/d) debido a un mayor volumen de leche producido (Fearon, *et al.*, 2004; Schroeder, *et al.*, 2004; Flowers, *et al.*, 2008). En nuestro trabajo, las concentraciones de proteína en la leche resultaron similares entre tratamientos independientemente de la adición o no de aceites a la dieta. Sin embargo, la proteína diaria excretada aumentó debido a un mayor volumen de leche producido en las vacas suplementadas con aceites. El mayor aumento en la producción de proteína alcanzó los 11 g/día, coincidiendo por lo reportado por Schroeder, *et al.*, (2004) los cuales afirman que la producción diaria de proteína se puede ver incrementada cerca de 22.8 g/día con inclusiones de hasta 1 kg diario de grasa en vacas en pastoreo, explicado en gran parte por el aumento en la producción de leche.

#### 4.4.4 Perfil de AG de la leche

Uno de los objetivos de este trabajo era el de aumentar la proporción de **AG** insaturados y de **18:1<sub>t11</sub> ATV** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la grasa de la leche a través del uso de un aceite rico en **18:2<sub>c9 c12</sub>** (maíz). Los trabajos *in vitro* de esta tesis mostraron que el aceite de maíz producía mayores concentraciones de **18:1<sub>t11</sub> ATV** precursor de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en el medio de cultivo que los aceites de linaza o palmiste. Esta estrategia de suplementación con aceite de maíz debía por lo tanto mejorar el perfil graso de la leche que se caracteriza por ser altamente saturado y con altas proporciones de **AG** de cadena media indeseables para la salud humana (Grundy, 1994; Khromhout, *et al.*, 1995; Nicolosi, *et al.*, 1997; Mensink, *et al.*, 2003). En este trabajo también se incluyó un tratamiento donde al aceite de maíz se le adicionó aceite de palmiste, debido a que este último mostró una mayor capacidad de reducir la producción de **CH<sub>4</sub>** en un sistema *in vitro* que otros aceites (maíz y linaza). Adicionalmente, nuestros trabajos *in vitro* sugerían que el aceite palmiste (rico en **12:0** y **14:0**) disminuía la lipólisis y/o la **BH** de los **AG** poliinsaturados, por lo cual se esperaba que la adición de este aumentara la proporción de estos **AG** en la grasa láctea. Sin embargo, su adición también podría aumentar las concentraciones de **12:0** y **14:0** que resultan ser hipercolesterolémicos cuando son consumidos en exceso.

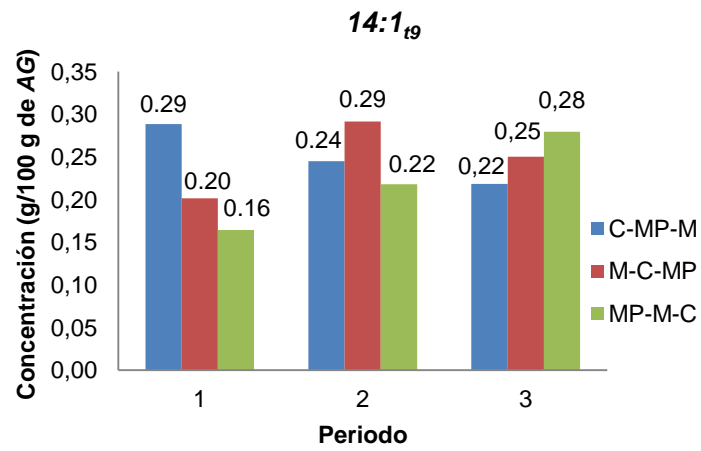
Como en otros trabajos (Hermansen, 1995; Fearon, *et al.*, 2004; Khanal, *et al.*, 2005; Rego, *et al.*, 2005; AbuGhazaleh y Holmes, 2007; AbuGhazaleh, 2008; Nicolae, *et al.*, 2008; Rego, *et al.*, 2009), la adición de fuentes ricas en **18:2<sub>c9 c12</sub>** a la dieta de vacas

lecheras en pastoreo aumentó la proporción de **AG** de cadena larga y de insaturados. La pequeña proporción de aceite de palmiste incorporada al aceite de maíz no modificó el perfil **AG** de la leche con excepción de las proporciones de **18:1**, **18:1<sub>t11</sub>** **ATV** y **18:2<sub>c9 t11</sub>** **ALC** que fueron ligeramente menores y de **12:0**, **14:0** y **16:0** que aumentaron. Estos últimos **AG** se encuentran relacionados a problemas de salud humana, específicamente a enfermedades del sistema circulatorio (Ulbricht y Southgate, 1991; Grundy, 1994; Khromhout, *et al.*, 1995; Nicolosi, *et al.*, 1995.; Mensink, *et al.*, 2003) y generaron una grasa láctea menos saludable de acuerdo a los índices de aterogenicidad y trombogenicidad (tabla 4.8).

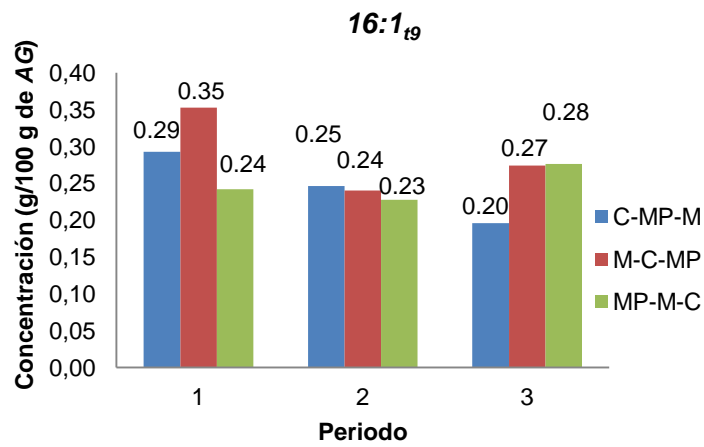
Ulbricht y Southgate, (1991) sugirieron que la relación de **AG** saturados:insaturados de los lípidos en la dieta de humanos era inadecuada como parámetro para evaluar la calidad de las grasas en la alimentación humana, ya que no todos los **AG** saturados pueden considerarse nocivos para la salud humana. Adicionalmente, señalaron que estos índices no reconocían las diferencias que tenían los diferentes **AG** sobre diferentes riesgos a la salud. Estos autores propusieron los índices de aterogenicidad y trombogenicidad, que consideran de manera particular la composición de **AG** de la grasa de la dieta. En los dos casos, cuanto más bajo sea el valor absoluto de ambos índices menor será el riesgo para la salud humana por el consumo de este tipo de grasa. El primer índice (aterogenicidad) estaría asociado al riesgo de formar ateromas y el segundo al de la formación de trombos. En nuestro trabajo, la grasa láctea con valores más altos de índices de aterogenicidad y trombogenicidad se presentó en la dieta sin adición de aceites debido a una mayor proporción de **AG** saturados (**12:0**, **14:0**, **16:0**). Estos índices fueron reducidos en más de un 50% ante la suplementación de aceite de maíz, lo que constituye una estrategia válida para disminuir el riesgo de aterogenicidad y trombogenicidad asociado al consumo de grasa láctea. La mejora en estos índices se produjo como consecuencia a un incremento en la proporción de **AG** insaturados y particularmente del **18:1<sub>c9</sub>**, que aumentó más de 8%. El índice de aterogenicidad está relacionado con la proporción de **12:0**, **14:0** y **16:0** y el de trombogenicidad adicionalmente incluye el **18:0**. La suplementación con aceite de maíz y su mezcla con palmiste aumentaron la proporción de **18:0** en la grasa láctea. Sin embargo, su índice de trombogenicidad disminuyó, sugiriendo que este aumento es compensado por una mayor proporción de **AG** insaturados, lo cual se asocia a efectos positivos en salud humana (Williams, 2000; Lock y Bauman, 2004; Fontecha, *et al.*, 2009).

La adición de aceite de palmiste al aceite de maíz aumentó los índices como consecuencia de mayores niveles de los **AG 12:0, 14:0 y 16:0**. Por lo tanto, la inclusión de este aceite se consideraría negativa, aún cuando el tratamiento control generó mayores niveles respecto a la mezclas de aceites. Distintos autores reportan que raciones de vacas lecheras que contienen aceite de coco incrementan el porcentaje de **12:0, 14:0 y 16:0** en leche, sugiriendo que la transferencia de estos **AG** desde la dieta al producto es alta y su incremento está positivamente relacionado con el aumento de los niveles de inclusión (Storry, *et al.*, 1967; Storry, *et al.*, 1971; Hermahansen, 1995; Hristov, *et al.*, 2009). En nuestro trabajo, la transferencia de estos **AG** no siguió una relación lineal o proporcional a lo suplementado, ya que la mezcla de aceites contenía mayores proporciones de **12:0** que de **14:0**. Sin embargo, el aumento de **12:0** y **14:0** en la grasa láctea fueron similares. El mayor incremento se presentó en el **16:0**, que solo fue ligeramente superior en el tratamiento que contenía aceite de palmiste. Estos resultados sugerirían que no se pueden predecir las modificaciones que ocurrirán en la grasa láctea a partir de la grasa suministrada, y que las proporciones de estos **AG** en el suplemento no generan modificaciones proporcionales en la leche. En el caso de los **AG** de cadena media, la ausencia de proporcionalidad entre la dieta y la leche podría explicarse por la síntesis *de novo* microbial o mamaria, por los procesos de elongación de estos en la glándula mamaria y/o metabolismo hepático de estos compuestos (Baumgard, *et al.*, 2001; Baumgard, *et al.*, 2002; Bauman, *et al.*, 2011; Rico y Harvatine, 2013). En el caso de los **AG** de cadena larga, su presencia en la leche está relacionada con el aporte de la dieta y los procesos de **BH** ruminal (Kelly, *et al.*, 1998; Harvatine y Bauman, 2006; Harvatine y Bauman, 2011).

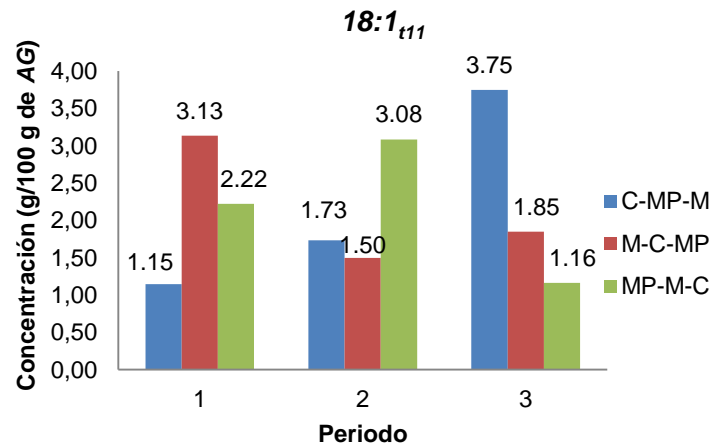
Adicionalmente, se presentaron efectos residuales debido al cambio de dietas experimentales entre periodos para los **AG 14:1<sub>o</sub>, 16:1<sub>o</sub>, 18:1<sub>t11</sub> ATV y 18:2<sub>c9 t11</sub> ALC**. Este fenómeno se manifestó en la magnitud de la respuesta al cambio de dieta pero no en la dirección u orden de la respuesta (figuras 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4). Consideramos que es posible hacer una discusión de los efectos principales. Sin embargo, algunos autores reportan que la recuperación de las condiciones ruminales en animales que han sido sometidos a retos nutricionales importantes puede llegar hasta los 21 días, afectando los niveles de **AG** en leche en periodos subsecuentes (Rico y Harvatine, 2013). Es probable que para evitar estos efectos residuales los periodos experimentales deberían haber sido mayores a los usados en este estudio.



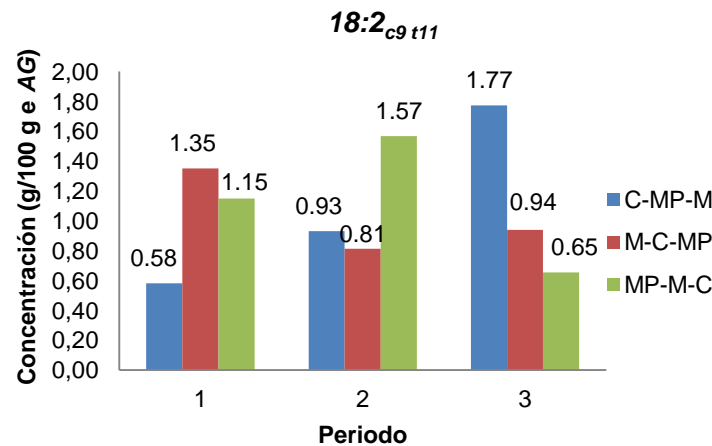
**Figura 4.1** Efecto de la secuencia de los tratamientos sobre el contenido de **14:1<sub>19</sub>** en leche



**Figura 4.2** Efecto de la secuencia de los tratamientos sobre el contenido de **16:1<sub>19</sub>** en leche



**Figura 4.3** Efecto de la secuencia de los tratamientos sobre el contenido de **18:1<sub>t11</sub> ATV** en leche



**Figura 4.4** Efecto de la secuencia de los tratamientos sobre el contenido de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en leche

Uno de los propósitos de este trabajo era aumentar las proporciones de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la grasa láctea, ya que este **AG** ha sido asociado con efectos benéficos para la salud humana (Sebedio, 1999; Munday, *et al.*, 1999; Belury, 2002; Yang y Cook, 2003; Akahoshi, *et al.*, 2004; Rosberg-Cody, *et al.*, 2011; Druart, *et al.*, 2014; El Roz, *et al.*, 2013; Yang, *et al.*, 2015). Es conocido que la adición de aceites vegetales ricos en **AG** poliinsaturados (**18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**) incrementan las proporciones de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la grasa de la leche (Kelly, *et al.*, 1998; Dhiman, *et al.*, 2000; Harvatine y Bauman, 2006), siendo que aceites con mayores cantidades de **18:2<sub>c9 c12</sub>** como el maíz son los

que generan un mayor efecto (Kelly, *et al.*, 1998; Dhiman, *et al.*, 2000; Stanton, *et al.*, 2003; Collomb, *et al.*, 2004a; Collomb *et al.*, 2004b; Zhang, *et al.*, 2006; Matsushita *et al.*, 2007; Stoffel, *et al.*, 2015). En nuestro trabajo, el aumento de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la grasa láctea fue de 129% con la adición del aceite de maíz a la dieta alcanzando concentraciones finales de 1.6 g/100 g **AG**. Con la proporción encontrada, una persona tendría que consumir entre 2 y 4 kg de leche para alcanzar la recomendación diaria de consumo de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** (1 a 4 g/d) (Dilzer y Park, 2012). Los consumos de leche per cápita en Colombia son bajos (0.45 kg/d) (IDF, 2013) por lo cual alcanzar los valores recomendados de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** como terapéuticos y/o preventivos es difícil.

Utilizando alimentos convencionales, la ingestión diaria de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** y **18:1<sub>t11</sub> ATV** resultaría insuficiente en el humano para alcanzar sus efectos bioquímicos, moleculares y fisiológicos positivos contra el cáncer, la aterosclerosis y la obesidad (Watkins y Li, 2003). Es importante conocer la cantidad efectiva mínima de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** y **18:1<sub>t11</sub> ATV** a consumir diariamente por un ser humano para obtener un efecto terapéutico o protector sobre la salud. En animales de laboratorio (ratas) se demostró que con concentraciones muy bajas de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la ración total (0.1%) se lograba disminuir significativamente el número de tumores mamarios (Ip, *et al.*, 1994). Para una rata de unos 350 g de peso vivo, el consumo diario preventivo de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** sería del orden de 0.015 g. Una ingestión equivalente en el ser humano, utilizando el peso metabólico como ajuste en el cálculo, permite estimar que un efecto antitumoral en una persona de unos 70 kg de peso vivo podría lograrse con un consumo de 0.8 g/día de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** (Watkins y Li, 2003). Cabe comentar que el consumo juzgado como preventivo de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** sería unas 10 veces menor (Gagliostro, 2004a). Por otra parte, los efectos saludables del consumo de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** sobre la aterosclerosis se alcanzarían a partir de niveles cercanos a los 0.25 g/d (cálculo por extrapolación de los efectos observados en experimentos con animales de laboratorio ajustados al ser humano en función del peso metabólico).

A pesar de que se ha afirmado que en los sistemas de pastoreo los niveles de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la leche son superiores a los de dietas **TMR** (Dewhurst, *et al.*, 2006; Elgersma, *et al.*, 2006a; Elgersma, *et al.*, 2006b; Khanal, *et al.*, 2008; Stypinski, 2011), lograr concentraciones suficientemente altas para asegurar los efectos benéficos no parecería fácil aún con este tipo de alimentación. En condiciones pastoriles similares a las de este

estudio, se han encontrado valores similares de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la grasa láctea (1.41 g/100 g **AG**) con la suplementación de salvado de arroz rico en grasa (Castaño, *et al.*, 2014) que son similares a la media nacional (1.44 g/100 g **AG**) (De La Vega, *et al.*, 2011) o muy superiores (2.5 g/100 g **AG**) en vacas suplementadas con un alimento balanceado que suplementó el 6.5% del consumo de **MS** en grasa (León, *et al.*, 2011). Se ha reportado que las proporciones de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la leche están asociadas al flujo de **18:1<sub>t11</sub> ATV** al duodeno más que al duodeno a glándula mamaria (Kucuk, *et al.*, 2001; Yañez-Ruiz, *et al.*, 2006; Shen, *et al.*, 2007; Liu, *et al.*, 2011) y a su vez este a la **BH** de **AG** poliinsaturados en el rumen (Chin, *et al.*, 1992; Griinari, *et al.*, 2000). Por lo cual, mayores concentraciones de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** podrían esperarse con mayores niveles de grasa adicionada a la ración a las usadas en este estudio (4%). La respuesta en la concentración de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en leche es lineal hasta representar un 4% del **CVMS** total (Chilliard, *et ál.*, 2000).

Comparado con la adición de aceite de maíz, la adición de la mezcla de aceite de maíz y aceite de palmiste a la dieta de vacas lecheras, redujo la proporción de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** y **18:1<sub>t11</sub> ATV** en la grasa láctea. De acuerdo a Glasser, *et al.*, (2008), la concentración de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la leche se explica por el flujo de **18:1<sub>t11</sub> ATV** (94.7%) que es desaturado en la glándula mamaria y el 5.3% a la síntesis de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en el rumen, que se asocia a la **BH** ruminal de **AG** poliinsaturados. Por lo tanto, los resultados sugerirían que en la dieta con la mezcla de aceites se redujo el flujo de **18:1<sub>t11</sub> ATV** y/o **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** al intestino. Esto podría explicarse por un menor aporte de precursores (fundamentalmente el **18:2<sub>c9 c12</sub>** y en menor medida el **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**) en la mezcla de aceites que en el maíz puro. Sin embargo, la reducción en la concentración de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** o **18:1<sub>t11</sub> ATV** en la leche no fue proporcional a la disminución en los precursores (23.5%) en la mezcla sino mucho mayor tanto para **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** (35.3%) como para **18:1<sub>t11</sub> ATV** (38.7%). Mayores reducciones de estos **AG** en la leche que las disminuciones asociadas a sus precursores en la dieta sugerirían una mayor tasa de **BH** en la mezcla que en el aceite puro. En este ensayo no fueron determinadas las variaciones en la tasas de **BH** ruminal, no obstante, los ensayos *in vitro* sugerirían menores tasas en la mezcla (capítulo 2). Adicionalmente, las proporciones de **18:0** y **18:1<sub>c9</sub>** en la grasa láctea fueron similares entre los dos tratamientos con aceites y las pequeñas diferencias entre ellos pueden explicarse por la disminución en las concentraciones de **AG** de 18 carbonos en los suplementos.

Yañez-Ruiz, *et al.*, (2006) encontraron que los protozoarios contribuían de manera importante al flujo de **18:1<sub>t11</sub> ATV** (40%) y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** (30 a 43%) al duodeno por lo cual su disminución podría explicar su disminución en la leche. Machmüller, *et al.*, (1998), Machmüller, *et al.*, (2000), Machmüller, *et al.*, (2003), Machmüller, *et al.*, (2006), Reveneau, *et al.*, (2012a) y Faciola y Broderick, (2014) demostraron que el aceite de coco con perfil similar al del palmiste era particularmente tóxico para los protozoarios. Revenue, *et al.*, (2012b) encontraron menores flujos de **18:1<sub>t11</sub> ATV** al duodeno y menores concentraciones de este **AG** en la leche cuando el aceite de coco sustituyó a una mezcla de grasa vegetal y animal al 5% de la dieta de vacas lecheras. En este estudio, el flujo de **18:1<sub>t11</sub> ATV** y de este **AG** en la leche no fue diferente entre el aceite de coco y la mezcla contrario a lo observado en nuestro estudio donde las reducciones se presentaron en ambos **AG**. De los hallazgos de Yañez-Ruiz, *et al.*, (2006) se podría argumentar que la reducción del flujo de protozoarios al duodeno debería disminuir ambos **AG** y no solamente en uno de ellos.

Respecto al **AG 18:2<sub>t10 c12</sub> ALC**, su concentración fue superior en el tratamiento **C** comparado con la adición de aceites. Este isómero es el predominante en los suplementos comerciales de **ALC** y aumenta en los productos provenientes de sistemas donde la alimentación de los rumiantes es alta en granos (Bauman y Griinari, 2000; Bauman y Griinari, 2001), los cuales se caracterizan por generar pH bajo en el rumen. Si bien, en este ensayo en los tres tratamientos se proporcionó la misma cantidad de grano en el concentrado, el tratamiento **C** fue el que generó un menor pH (tabla 4.4, diferencias numéricas), lo cual se relaciona directamente con la síntesis de precursores de **18:2<sub>t10 c12</sub> ALC** en rumen y su síntesis en glándula mamaria (Bauman y Griinari, 2000; Bauman y Griinari, 2001; Peterson *et al.*, 2003).

## 4.5 Conclusiones

La adición de 720 g de aceite de maíz o una mezcla de aceite de maíz y aceite de palmiste (75:25) a vacas en pastoreo de kikuyo no modificó la digestibilidad total de la ración ni redujo el consumo voluntario. La adición de aceites redujo la concentración de **AGV's** en el rumen por lo que podrían inferirse menores producciones de **CH<sub>4</sub>** en el rumen. La adición de aceites aumentó producción y la concentración de grasa en la

leche. El perfil de **AG** en la leche se mejoró con la adición de aceites al incrementar la proporción de **AG** insaturados y las concentraciones de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** y **18:1<sub>t11</sub>**. Estos cambios resultaron en leches con menores índices de aterogenicidad y trombogenicidad. La sustitución de un 25% de aceite de maíz por aceite de palmiste en la suplementación con aceites redujo la calidad de la leche pues aumento los índices de aterogenicidad, trombogenicidad y redujo las proporciones de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la leche. La adición de aceites a dietas de vacas en pastoreo es una opción para aumentar el volumen de leche y modificar su composición de **AG**, sin embargo para lograr niveles adecuados (terapéuticos y/o preventivos) de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la leche se debe aumentar la inclusión de aceites en la ración, con posibles efectos sobre la productividad animal.

## 4.6 Agradecimientos

A la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá por el apoyo económico para la elaboración de este trabajo. Al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia -UNAL Bogotá-, al Laboratorio de Biotecnología Ruminal -UNAL Medellín-, al Centro Agropecuario Marengo -UNAL Bogotá- y al Grupo de Investigación en Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia -UNAL Bogotá- por su apoyo en la fase de campo y laboratorio.

## 4.7 Referencias bibliográficas

ABUGHAZALEH, A. A. Y HOLMES, L. D. 2007. Diet supplementation with fish oil and sunflower oil to increase conjugated linoleic acid levels in milk fat of partially grazing dairy cows. *J Dairy Sci.* 90(6):2897-2904.

ABUGHAZALEH, A. A. 2008. Effect of fish oil and sunflower oil supplementation on milk conjugated linoleic acid content for grazing dairy cows. *Anim Feed Sci Technol.* 141(3-4):220-232.

AGUILAR, O. X.; MORENO, B. M.; PABÓN, M. L. y CARULLA, J. E. 2009. Efecto del consumo de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) o raigrás (*Lolium hybridum*) sobre la concentración de ácido linoléico conjugado y el perfil de ácidos grasos de la grasa láctea. *Livest Res Rural Dev.* 21(49).

- AKAHOSHI, A.; GOTO, Y.; MURAO, K.; MIYAZAKI, T.; YAMASAKI, M.; NONAKA, M.; YAMADA, K. y SUGANO, M. 2004. Conjugated linoleic acid reduces body fats and cytokine levels of mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66(4):916-920.
- BANNI, S. y MARTIN, J.C. 1998. Conjugated linoleic acid and metabolites en: Trans fatty acids in human nutrition, editado por Sebedio J.J y Christie. Oily Press, Dundee, Scotland. Págs 261-302.
- BARGO, F.; MULLER, L. D.; KOLVER, E. S. y DELAHOY, J. E. 2003. Invited review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *J Dairy Sci.* 86(1):1-42.
- BATEMAN, H.G. y JENKINS, J.C. 1998. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to nonlactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. *J Dairy Sci.* 81(9):2451-2458.
- BAUMAN, D.E. y GRINARI, J.M. 2000. Regulation and nutritional manipulation of milk fat. Low-fat milk syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 480:209-216.
- BAUMAN, D.E. y GRINARI, J.M. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest Prod Sci.* 70(1-2):15-29.
- BAUMAN, D.E.; HARVATINE, K.J. y LOCK, A.L. 2011. Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. *Annu Rev Nutr.* 31:299-319.
- BAUMGARD, L.H.; SANGSTER, J.K. y BAUMAN, D.E. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J Nutr.* 131(6):1764-1769.
- BAUMGARD, L.H.; MATITASHVILI, E.; CORL, B.A.; DWYER, D.A. y BAUMAN, D.E. 2002. trans-10, cis-12 Conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 85(9):2155– 2163.
- BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M. y PETIT, H. 2007. Methane abatement strategies for cattle: lipid supplementation of diets. *Can J Anim Sci* 87(3):431–440
- BEAUCHEMIN, K.A.; KREUZER, M.; O'MARA, F. y McALLISTER, T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust J Exp Agri.* 48(2): 21-27.
- BELURY, M.A. 1995. Conjugated dienoic linoleate: A polyunsaturated fatty acid with unique chemoprotective properties. *Nutr Rev.* 53(4 pt 1):83-89.
- BELURY, M. A. 2002. Dietary conjugated linoleic acid and health: Physiological effects and mechanisms of action. *Ann. Rev. Nutr.* 22(1):505-531.
- BENCHAAR, C.; ROMERO-PÉREZ, G.A.; CHOUINARD, P.Y.; HASSANAT, F.; EUGENE, M.; PETIT, H.V. y CÔRTEZ, C. 2012. Supplementation of increasing amounts of linseed oil to dairy cows fed total mixed rations: effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, protozoal populations, and milk fatty acid composition. *J Dairy Sci.* 95(8):4578-4590.

- BENJAMIN, S. y FRIEDRICH, S. 2009. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutr Metab.* 6:36.
- BOADI, D.; BENCHAAAR, C.; CHIQUETTE, J. y MASSÉ, D. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows : Update review. *Can J Anim Sci.* 84(3): 319-335.
- BREMMER, D. R.; RUPPERT, L. D.; CLARK, J. H. y DRACKLEY, J. K. 1998. Effects of chain length and unsaturation of fatty acid mixtures infused into the abomasum of lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 81(1):176-188.
- BU, D. P.; WANG, J. Q.; DHIMAN, T. R. y LIU, S. J. 2007. Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *J Dairy Sci.* 90(2):998-1007.
- CASTAÑO, G.A.; PABÓN, M.L. y CARULLA, J.E. 2014. Concentration of trans-vaccenic and rumenic acids in the milk from grazing cows supplemented with palm oil, rice bran or whole cottonseed. *R. Bras. Zootec.* 43(6):315-326.
- CASTILLO, J.A.; OLIVERA, M.; PABÓN, M.L. y CARULLA, J.E. 2012. Reducción de la biohidrogenación del ácido linoleico y alfa linoléico por la adición de diferentes proporciones de ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico. *Rev Colomb Quim.* 41(3):395-408.
- CASTRO, E.; MOJICA, J. E.; LEÓN, J. M.; PABÓN, M. L.; CARULLA, J. E. y CÁRDENAS, E. A. 2008. Productividad de pasturas y producción de leche bovina bajo pastoreo de gramínea y gramínea + *Lotus uliginosus* en Mosquera, Colombia. *Rev Med Vet Zoot.* 55:9-21.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, R.M. y DOREAU, M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann Zootech.* 49:181-205.
- COLLOMB, M.; SIEBER, R. y BÜTIKOFER, U. 2004a. CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids* 39(4):355–364.
- COLLOMB, M.; SOLLBERGER, H.; BÜTIKOFER, U.; SIEBER, R.; STOLL, W. y SCHAEREN, W. 2004b. Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. *Int Dairy J* 14(6):549–559.
- COLLOMB, M.; SCHMID, A.; SIEBER, R.; WECHSLER, D. y RYHSNEN, E.L. 2006. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *Int Dairy J.* 16:1347-1361.
- COOK, C. W. 1964. Symposium on nutrition forages and pastures: Collecting forage samples representative of ingested material of grazing animals for nutritional studies. *J Anim Sci.* 23(1):265-270.

- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A. y DOREAU, M. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci.* 70:31–48.
- CHIN, S.F.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; HA, Y.L. y PARIZA, M.W. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Compos Anal.* 5(3):185–197.
- DAI, X.J; WANG, C. y ZHU, Q. 2011. Milk performance of dairy cows supplemented with rapeseed oil, peanut oil and sunflower seed oil. *Czech J Anim Sci.* 56(4):181-191.
- DHIMAN, T.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W.; GALLI, M.P.; ALBRIGHT, K. y TOLOSA M.X. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J Dairy Sci.* 83(5):1016–1027.
- DE LA VEGA, E.; LEÓN, J.M; PARALES, J.E.; DIAZ, G.J.; PABÓN, M.L. y CARULLA, J.E. 2011. Identification of regions that produce milk rich in conjugated linoleic acid (CLA) a bioactive compound beneficial to human health in Colombia. 48a Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Belém – PA, 18 a 21 de Julio.
- DEWHURST, R.J.; SHINGFIELD, K.J.; LEE, M.R.F. y SCOLLAN, N.D. 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim Feed Sci Technol.* 131(3-4):168-206.
- DÍAZ-GONZÁLEZ, G.; GUTIÉRREZ, R.; PÉREZ, N.; VEGA, S.; LEÓN, S.; GONZÁLEZ, M.; PRADO, G.; URBÁN, G.; RAMÍREZ, A. y PINTO, M. 2002. Detección de adulteraciones en la grasa de leche pasteurizada mexicana. *Rev Salud Anim.* 24(1):54-59.
- DILZER, A. y PARK, Y. 2012. Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 52(6):488-513.
- DOREAU, M.; LEGAY, F. y BAUCHART, D. 1991. Effect of source and level of supplemental fat on total and ruminal organic matter and nitrogen digestion in dairy cows. *J Dairy Sci.* 74(7):2233-2242.
- DRUART, C.; DEWULF, E.; CANI, P.; NEYRINCK, A.; THISSEN, J.P. y DELZENNE, N. 2014. Gut microbial metabolites of polyunsaturated fatty acids correlate with specific fecal bacteria and serum markers of metabolic syndrome in obese women. *Lipids.* 49(4):397-402
- ELGERSMA, A.; TAMMINGA, S. y ELLEN, G. 2006a. Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Sci Tech.* 131(3-4):207–225.
- ELGERSMA, A.; WEVER, A.C. y NALECZ-TARWACKA, T. 2006b. Grazing versus indoor feeding: effect on milk quality. *Grassland Sci Eur.* 11:419–427.
- EL ROZ, A.; BARD, J.M.; HUVELIN, J.M. y NAZIH, H. 2013. The anti-proliferative and pro-apoptotic effects of the trans9, trans11 conjugated linoleic acid isomer on MCF-7

breast cancer cells are associated with LXR activation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 88(4):265-272.

EUGENE, M. ; MASSE, D.; CHIQUETTE, J. y BENCHAAAR, C. 2008. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Can J Anim Sci* 88(2):331-334.

FAICHNEY, G. J.; GORDON, G.L.R.; WELCH, R.J. y RINTOUL, A.J. 2002. Effect of dietary free lipid on anaerobic fungi and digestion in the rumen of sheep. *Crop Pasture Sci*. 53(5):519–527.

FACIOLA, A.P. y BRODERICK, G.A. 2014. Effects of feeding lauric acid or coconut oil on ruminal protozoa numbers, fermentation pattern, digestion, omasal nutrient flow, and milk production in dairy cows. *J Dairy Sci*. 97(8):5088-5100.

FEARON, A.M.; MAYNE, C.S., BEATTIE, J.A.M. y BRUCE, D.W. Effect of level of oil inclusion in the diet of dairy cows at pasture on animal performance and milk composition and properties. *J Sci Food Agr*. 84(6):497-504.

FIRKINS, J. L. y EASTRIDGE, M. L. 1994. Assessment of the effects of iodine value on fatty acid digestibility, feed intake, and milk production. *J. Dairy Sci*. 77(8):2357-2366.

FLOWERS, G.; IBRAHIM, S.A. y ABUGHAZALEH, A.A. 2008. Milk fatty acid composition of grazing dairy cows when supplemented with linseed oil. *J Dairy Sci*. 91(2):722-730.

FONTECHA, J.; RECIO, M. y PILOSOFF, M.A. 2009. Componentes bioactivos de la grasa láctea en Funcionalidad de los componentes lácteos. Juárez M y Fontecha J (Eds.) CEE Limencop, S.L. España. Págs 251-273.

GAGLIOSTRO, G.A. y CHILLIARD, Y.1992. Utilización de lípidos protegidos en la nutrición de vacas lecheras. I. Efectos sobre la producción y la composición de la leche, y sobre la ingestión de materia seca y energía. *Rev Arg Prod Anim*. 12 (1):1-15.

GAGLIOSTRO, G. 2004a. Control nutricional del contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche y su presencia en alimentos naturales funcionales. 1. efectos en salud humana. *Rev Arg Prod Anim*. 24(3-4): 113-136.

GARCÉS, R. y MANCHA, M. 1993. One step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal Biochem*. 211(1):139-143.

GARNSWORTHY, P.C. 1990. Feeding calcium salts of fatty acids in high-starch or high-fiber compound supplements to lactating cows at grass. *Anim Prod Sci*. 51(3):441– 447.

GIGER-REVERDIN S.; MORAND-FEHR, P. y TRAN, G. 2003. Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. *Livest Prod Sci* 82(1):73–79.

GLASSER, F.; FERLAY, A.; DOREAU, M.; SCHMIDELY, P.; SAUVANT, D. y CHILLIARD, Y. 2008. Long-chain fatty acid metabolism in dairy cows: a meta-analysis of

milk fatty acid yield in relation to duodenal flows and *de novo* synthesis. *J Dairy Sci.* 91(7):2771-2785.

GRIINARI, J.M.; CORL, B.A.; LACY, S.H.; CHOUINARD, P.Y.; NURMELA, K.V. y BAUMAN, D.E. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta^9$ -desaturase. *J Nutr.* 130(9):2285–2291.

GRUNDY, S.M. 1994. Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 60 (Suppl):986S-990S.

HARVATINE K.J. y BAUMAN, D.E. 2006. SREBP1 and thyroid hormone response spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. *J Nutr.* 136(10):2468-2474.

HARVATINE, K.J. y BAUMAN, D.E. 2011. Characterization of the acute lactational response to *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid. *J Dairy Sci.* 94(12):6047-6056.

HERMANSEN, J.E. 1995. Prediction of milk fatty acid profile in dairy cows fed dietary fat differing in fatty acid composition. *J Dairy Sci.* 78(4):872-879.

HOLDEN, L. A.; MULLER, L. D. y FALES, S. L. 1994. Estimation of intake in high producing Holstein cows grazing grass pasture. *J Dairy Sci.* 77(8):2332-2340.

HOUSEKNECHT, K.L.; HEUVEL, J.P.V.; MOYA-CAMARENA. S.Y.; PORTOCARRERO, C.P.; PECK, L.W.; NICKEL, K.P. y BELURY M. A. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty *fa/fa* rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 244(3):678-682.

HRISTOV, A.N.; VANDER POL, M.; AGLE, M.; ZAMAN, S.; SCHNEIDER, C.; NDEGWA, P.; VADDELLA, V.K.; JOHNSON, K.; SHINGFIELD, K.J. y KARNATI, S.K.R. 2009. Effect of lauric acid and coconut oil on ruminal fermentation, digestion, ammonia losses from manure, and milk fatty acid composition in lactating cows. *J Dairy Sci.* 92(11):5561-5582.

HURLEY, W. L.; WARNER, G. J. y GRUMMER, R. R. 1987. Changes in triglyceride fatty acid composition of mammary secretions during involution. *J Dairy Sci.* 70(11):2406-2410.

HUSSEIN, H. S.; MERCHEN, N.R y FAHEY, G.C. 1995. Effects of forage level and canola seed supplementation on site and extent of digestion of organic matter, carbohydrate, and energy by steers. *J Anim Sci.* 73(8):2458–2468.

IKWUEGBU, O. A. y SUTTON, J.D. 1982. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. *Br J Nutr.* 48(2):365–375.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). 2013. The world dairy situation 2013. Bulletin of the IDF 470/2013. IDF, Brussels, Belgium. Págs 24-30.

JACOBS, A. A. A.; VAN BAAL, J.; SMITS, M. A.; TAWHEEL, H. Z. H.; HENDRIKS, W. H.; VAN VUUREN, A. M. y DIJKSTRA, J. 2011. Effects of feeding rapeseed oil, soybean oil, or linseed oil on stearoyl-CoA desaturase expression in the mammary gland of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94(2):874-887.

- JOHNSON, K.A. y JOHNSON D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci.* 73(8): 2483-2492.
- KELLY, M.L.; BERRY, J.R.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; CHOUINARD, P.Y.; VAN AMBURGH, M.E. y BAUMAN, D.E. 1998. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J Nutr.* 128(5): 881–885.
- KHANAL, R.C. y OLSON, K.C. 2004. Factors Affecting Conjugated Linoleic Acid (CLA) Content in Milk, Meat and egg- A review. *Pakistan J of Nut.* 3(2): 82-98.
- KHANAL, R. C.; DHIMAN, T. R.; URE, A. L.; BRENNAND, C. P.; BOMAN, R. L. y MCMAHON, D. J. 2005. Consumer acceptability of conjugated linoleic acid-enriched milk and cheddar cheese from cows grazing on pasture. *J Dairy Sci* 88(5):1837-1847.
- KHANAL, R.C.; DHIMAN, T.R. y BOMAN, R.L. 2007. Changes in fatty acid composition of milk from lactating dairy cows during transition to and from pasture. *Livest Sci.* 114(2-3):164-175.
- KROMHOUT, D.; MENOTTI, A.; BLOEMBERG, B.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; DONTAS, A.S.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; KARVONEN, M.; KATAN, M.; NISSINEN, S.; NEDELJKOVIC, J.; PEKKANEN, M.; PEKKARINEN, S.; PUNSAR, S.; RASANEN, L.; SIMIC, B. y TOSHIMA, H. 1995. Dietary saturated and trans-fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med.* 24(3): 308-315.
- KUCUK, O.; HESS, B.W.; LUDDEN, P.A. y RULE, D.C. 2001. Effect of forage:concentrate ratio on ruminal digestion and duodenal flow of fatty acids in ewes. *J Anim Sci.* 79(8):2233-2240.
- LEON, J.M.; PABÓN, M.L. y CARULLA, J.E. 2011. Pasture traits and conjugated linoleic acid (CLA) content in milk. *Rev Colomb Cienc Pec.* 24(1):63-73.
- LIM, J.N.; OH, J.J. WANG, T.; LEE, S.J.; KIM, S.; KIM, Y.J. y LEE, H.G. 2014. trans-11 18:1 Vaccenic Acid (TVA) Has a Direct Anti-Carcinogenic Effect on MCF-7 Human Mammary Adenocarcinoma Cells. *Nutrients.* 6(2):627-636.
- LIU, S.J.; BU, D.; WANG, J.; SUN, P.; WEI, H.; ZHOU, L. y YU, Z. 2011. Effect of ruminal pulse dose of polyunsaturated fatty acids on ruminal microbial populations and duodenal flow and milk profiles of fatty acids. *J Dairy Sci.* 94(6):2977-2985.
- LOCK, A.L. y BAUMAN, D.E. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids.* 39(12):1197-1206.
- LOOR, J.J.; HERBEIN, J.H. y JENKINS, T.C. 2002. Nutrient digestion, biohydrogenation, and fatty acid profiles in blood plasma and milk fat from lactating Holstein cows fed canola oil and canolamide. *Anim Feed Sci Technol.* 97(1-2):65-82.

- LOOR, J.J. y HERBEIN, J.H. 2003. Dietary canola or soybean oil with two levels of conjugated linoleic acid (CLA) alter profilers of C 18:1 and C 18:2 isomers in blood plasma and milk fat from dairy cows. *Anim Feed Sci Technol.* 103(1):63-83.
- LÓPEZ, S. y NEWBOLD, C.J. 2007. Measuring methane emission of ruminants by in vitro and in vivo techniques en *Measuring Methane Production from Ruminants*, editado por Harinder P.S.; Vercoe Makkar, Philip E. Vienna, Austria: Springer. Págs 1-13.
- MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A.; WANNER, M. y KREUZER, M. 1998. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec). *Anim Feed Sci Technol.* 71(1-2):117-130.
- MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A. y KREUZER, M. 2000. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. *Anim Feed Sci Technol.* 85(1-2):41-60.
- MACHMÜLLER, A.; SOLIVA, C. R. y KREUZER, M. 2003. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reprod Nutr Dev.* 43(1): 41-55.
- MACHMÜLLER, A. 2006. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Agric Ecos Envir.* 112(2-3):107-114.
- MARTIN, C. ; MORGAVI, D.P. y DOREAU, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4(3):351-365.
- MARTÍNEZ, R.; MARTÍNEZ, N. y MARTÍNEZ M.V. 2011. Diseño de Experimentos en Ciencias Agropecuarias y Biológicas con SAS, SPSS, R y Statistix. Fondo Nacional Universitario. Bogotá, D.C. Colombia.
- MATSUSHITA, M.; TAZINAFO, N.; PADRE, R.; OLIVEIRA, C.; SOUZA, N.; VISENTAINER, J.; MACEDO, F. y RIBAS, N. 2007. Fatty acid profile of milk from Saanen goats fed a diet enriched with three vegetable oils. *Small Ruminant Res.* 72(2-3):127-143
- McCREARY, D. K.; KOSSA, W. C.; RAMACHANDRAN, S. y KURTZ, R. R. 1978. A novel and rapid method for the preparation of methyl esters for gas chromatography: application to the determination of the fatty acids of edible fats and oils. *J Chromat Sci.* 16(8):329-331.
- McGINN, S.M.; BEAUCHEMIN K.A.; COATES, T. y COLOMBATO, D. 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast and fumaric acid. *J Anim Sci.* 82(11): 3346-3356.
- MENSINK, R.P; ZOCK, P .L.; KESTER, A.D.M and KATAN, M.B. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 77(5): 1146-1155.
- MOHAMED, O.E.; SATTER, L.D.; GRUMMER, R.R. y EHLE, F.R. 1988. Influence of dietary cottonseed and soybean on milk production and composition. *J Dairy Sci.* 71(10):2677-2688.

- MUNDAY, J.S. THOMPSON, K.G. y JAMES, K.A.C. 1999. Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br J Nutr.* 81(3):251-255.
- NICOLAE, M.; POP, S. y DRAGOMIR, S. 2008. Effect of including canola oil in dairy cows diets on the milk yield and milk fatty acids profile. *Archiva Zootechnica.* 11(4):64-72.
- NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7a ed. National Academy Press, Washington DC.
- NICOLOSI, R.J.; ROGERS, E.J.; KRITCHEVSKY, D.; SCIMECA, J.A. y HUTH, P.J. 1997. Dietary conjugate linoleic acid reduces plasma lipoprotein and early aortic atherosclerosis in hypercholesteremic hamster. *Artery* 22(5):266-277.
- PALMQUIST, D. L. y JENKINS, T. C. 1980. Fat in lactation rations: Review. *J Dairy Sci.* 63(1):1-14.
- PALMQUIST, D.L., 1984. Use of fats in diets for lactating dairy cow en Fat in Animal Nutrition. Editions Bultersworkts. London, UK. Págs 357-381.
- PARIZA, M.W.; ASHOOR, S.H.; CHU, F.S. y LUND, D.B. 1979. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Lett.* 7(2-3):63-69.
- PARODI, P.W. 1977. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J Dairy Sci.* 60(10):1550-1553.
- PATRA, A.K. 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. *Livest Sci.* 155(2-3):244-254.
- PATRA, A.K. 2014. A meta-analysis of the effect of dietary fat on enteric methane production, digestibility and rumen fermentation in sheep, and a comparison of these responses between cattle and sheep. *Livest Sci.* 167:97-103.
- PATRA, A.K. y YU, Z. 2013. Effects of coconut and fish oils on methane production, fermentation, abundance and diversity of rumen microbial populations in vitro. *J Dairy Sci.* 96 (3):1782-1792.
- PETERSON, D.G.; MATITASHVILI, E.A. y BAUMAN, D.E. 2003. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk Fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J Nutr.* 133(10):3098-3102.
- PRIEV, A. y BARENHOLZ Y. 2010. Ultrasonic food quality analyzer based on cylindrical standing waves. En: Proceedings of 20th International Congress on Acoustics. Sydney, Australia, Págs 173-176.
- RABBIE, A.R.; BREINHILD, K.; SCOTT, W.; GOLDBERGER, H.M.; BLOCK, E. y LEAN, I.J. 2012. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. *J Dairy Sci.* 95(6):3225-3247.

- RAMIN, M. y HUHTANEN, P. 2012. Development of an in vitro method for determination of methane production kinetics using a fully automated in vitro gas system - A modelling approach. *Anim Feed Sci Tech.* 174(3-4):190-200.
- REGO, O.A.; ROSA, H.J.; PORTUGAL, P.V.; FRANCO, T.; VOUZELA, C.M.; BORBA, A.E. y BESSA, R.J. 2005. The effects of supplementation with sunflower and soybean oils on the fatty acid profile of milk fat from grazing dairy cows. *Anim Res.* 54(1):17-24.
- REGO, O. A.; REGALO, S. M.; ROSA, H. J.; ALVES, S. P.; BORBA, A. E.; BESSA, R. J.; CABRITA, A. R. y FONSECA, A. J. 2008. Effects of grass silage and soybean meal supplementation on milk production and milk fatty acid profiles of grazing dairy cows. *J Dairy Sci.* 91(7):2736-2743.
- REGO, O.A.; ALVES, S.P.; ANTUNES, L.M.; ROSA, H.J.; ALFAIA, C.F.; PRATES, J.A.; CABRITA, A.R.; FONSECA, A.J. y BESSA, R.J. 2009. Rumen biohydrogenation-derived fatty acids in milk fat from grazing dairy cows supplemented with rapeseed, sunflower, or linseed oils. *J Dairy Sci.* 92(9):4530-4540.
- REVENEAU, C.; KARNATI, S.K.; OELKER, E.R. y FIRKINS, J.L. 2012a. Interaction of unsaturated fat or coconut oil with monensin in lactating dairy cows fed 12 times daily. I. Protozoal abundance, nutrient digestibility, and microbial protein flow to the omasum. *J Dairy Sci.* 95(4):2046-2060.
- REVENEAU, C.; RIBEIRO, C.V.; EASTRIDGE, M.L. y FIRKINS, J.L. 2012b. Interaction of unsaturated fat or coconut oil with monensin in lactating dairy cows fed 12 times daily. II. Fatty acid flow to the omasum and milk fatty acid profile. *J Dairy Sci.* 95(4):2061-2069.
- RICO, D.E. y HARVATINE, K.J. 2013. Induction of and recovery from milk fat depression occurs progressively in dairy cows switched between diets that differ in fiber and oil concentration. *J Dairy Sci.* 96(10):6621-6630.
- ROSBERG-CODY, E.; STANTON, C.; O'MAHONY, L.; WALL, R.; SHANAHAN, F.; QUIGLEY, E.M.; FITZGERALD, G.F. y ROSS, R.P. 2011. Recombinant lactobacilli expressing linoleic acid isomerase can modulate the fatty acid composition of host adipose tissue in mice. *Microbiology.* 157(Pt 2):609-615.
- SAS. 1998. SAS User's Guide: Statistics (Version 8); Cary NC: the Institute.
- SCHROEDER, G.F.; GAGLIOSTRO, G.A.; BARGO, F.; DELAHOY, J.E. y MULLER, L.D. 2004. Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. *Livest Prod Sci.* 86(1):1-18.
- SCHMIDELY, P.; GLASSER, F.; DOREAU, M. y SAUVANT, D. 2008. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors. 1. Total fatty acids. *Animal.* 2(5):677-690.
- SEBADIO, J.L.; GNAEDIG, S. y CHARDIGNY, J.M. 1999. Recent advances in conjugated linoleic acid research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2(6):499-506.

SHEN, X.; NUERNBERG, K.; NUERNBERG, G.; ZHAO, R.; SCOLLAN, N.; ENDER, K. y DANNENBERGER, D. 2007. Vaccenic Acid and cis-9,trans-11 CLA in the Rumen and Different Tissues of Pasture- and Concentrate-Fed Beef Cattle. *Lipids*. 42(12):1093-1103.

STANTON, C.; MURPHY, J.; MCGRATH, E. y DEVERY, R. 2003. Animal feeding strategies for conjugated linoleic acid enrichment of milk. en *Advances in conjugated linoleic acid research*. Sebedio JL, Christie WW y Adolf R eds, Vol. 2. Champaign, IL, USA: AOAC Press. Págs 123–145.

STYPINSKI, P. 2011. The effect of grassland-based forages on milk quality and quantity. *Agron Res*. 9(Special issue II):479-488.

STOFFEL, C.M.; CRUMP, P.M. y ARMENTANO, L.E. Effect of dietary fatty acid supplements, varying in fatty acid composition, on milk fat secretion in dairy cattle fed diets supplemented to less than 3% total fatty acids. *J Dairy Sci*. 98(1):431-442.

STORRY, J.E.; ROOK, J.A.F. y HALL, A.J. 1967. The effect of the amount and type of dietary fat on milk fat secretion in the cow. *Br J Nutr* 21(2):425-438.

STORRY, J.E.; HALL, A.J. y JOHNSON, V.W. 1971. The effects of increasing amounts of dietary coconut oil on milk-fat secretion in the cow. *J Dairy Res*. 38(1):73-77.

SUNVOLD, G. D. y COCHRAN, R. C. 1991. Technical note: evaluation of acid detergent lignin, alkaline peroxide lignin, acid insoluble ash, and indigestible acid detergent fiber as internal markers for prediction of alfalfa, bromegrass, and prairie hay digestibility by beef steers. *J Anim Sci*. 69(12):4951-4955.

SUTTON, J. D.; KNIGHT, R.; MCALLAN, A.B. y SMITH, R.H. 1983. Digestion and synthesis in the rumen of sheep given diets supplemented with free and protected oils. *Br J Nutr*. 49(3):419–432.

UEDA, K.; FERLAY, A.; CHABROT, J.; LOOR J.J.; CHILLIARD, Y. y DOREAU, M. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. *J Anim Sci*. 86(12):3999-4007.

ULBRICHT, T. L. V. y SOUTHGATE, D. A. T. 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*. 338(8773):985-992.

VAN KNEGSEL, A. T. M.; VAN DEN BRAND, H.; DIJKSTRA, J.; VAN STRAALLEN, W. M.; HEETKAMP, M. J. W.; TAMMINGA, S. y KEMP, B. 2007. Dietary energy source in dairy cows in early lactation: energy partitioning and milk composition. *J Dairy Sci*. 90(3):1467-1476.

VÁRADYOVÁ, Z.; KIŠIDAYOVÁ, S.; SIROKA, P. y JALC, D. 2008. Comparison of fatty acid composition of bacterial and protozoal fractions in rumen fluid of sheep fed diet supplemented with sunflower, rapeseed and linseed oils. *Anim Feed Sci and Technol* 144(1-2):44-54.

- VEIRA, D.M; CHARMLEY, L.L; CHARMLEY, E. y LEE, A.J. 2001. The effect of feeding soybean oil to mid-lactation dairy cows on milk production and composition and on diet digestion. *Can J Anim Sci.* 81(3):425-428.
- WATKINS, B.A. y LI, Y. 2003. CLA in functional food: enrichment of animal products. In: *Advances in Conjugated Linoleic Acid in Food. Volume 2.* J.L Sébédio, W.W. Christie, R. Adloff (Eds.). AOCS Press, Champaign, Illinois. pp 174-188.
- WILLIAMS, C.M. 2000. Dietary fatty acids and human health. *Ann Zootech.* 49(3):165-180.
- WU, Z. y HUBER, J.T. 1994. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. *Livest Prod. Sci.* 39(2):141– 155.
- YABUUCHI, Y.; MATSUSHITA, Y.; OTSUKA, H.; FUKAMACHI, K. y KOBAYASHI, Y. 2006. Effects of supplemental lauric acid-rich oils in high-grain diet on *in vitro* rumen fermentation. *Anim Sci J* 77(3):300-307.
- YAMASAKI, M.; KISHIHARA, K.; IKEDA, I.; SUGANO, M. y YAMADA, K. 1999. A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugated linoleic acid. *J Am Oil Chem Soc.* 76(8):933-938.
- YANG, M. y COOK, M.E. 2003. Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor-alpha production, and modifies splenocyte cytokines production. *Exp Biol Med* 228(1):51-58.
- YANG, B.; CHEN, H.; STANTON, C.; ROSS, R.P.; ZHANG, H.; CHEN, Y.Q. y CHEN, W. 2015. Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *J Funct Foods.* 15:314-325.
- YAÑEZ-RUIZ, D.R.; SCOLLAN, M.D.; MERRY, R.J. y NEWBOLD, C.J. 2006. Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their water-soluble carbohydrate content. *Br J Nutr.* 96(5):861-869.
- ZHANG, R.H.; MUSTAFA, A.F. y ZHAO, X. 2006. Effects of feeding oilseed rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. *Anim Feed Sci Technol.* 127(3-4):220-233.
- ZHENG, H.C.; LIU, J.X.; YAO, J.H.; YUAN, Q.; YE, H.W.; YE, J.A. y WU, Y.M. 2005. Effects of dietary sources of vegetable oils on performance of high-yielding lactating cows and conjugated linoleic acids in milk. *J Dairy Sci.* 88(6):2037-42.



## 5. Discusión, conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Discusión general

Los resultados de los trabajos realizados con inclusión de aceites tanto en sistemas *in vitro* como en la ración de vacas lecheras confirman que estos recursos son una herramienta importante en la disminución de la producción de metano ( $CH_4$ ), y que mediante estrategias de alimentación se permite la modificación del perfil de ácidos grasos (**AG**) de la leche en un sentido favorable a la salud humana. Resulta importante destacar que tanto el perfil de **AG** de la fuente lipídica suplementada, así como su nivel de inclusión en la ración son factores determinantes en el logro de estos objetivos. La hipótesis original de los ensayos *in vitro* del presente trabajo de tesis fue la existencia de un comportamiento diferencial de las mezclas de aceites respecto a las formas puras de los mismos, generando efectos asociativos (negativos o positivos) sobre los parámetros de fermentación y proporciones de algunos **AG** de interés biológico.

En los ensayos *in vitro* se trabajó con tres aceites vegetales con perfiles de **AG** diferentes, donde se tuvo al aceite de maíz (rico en ácido linoleico - $18:2_{c9\ c12}$ ), linaza (rico en ácido linolénico - $18:3_{c9\ c12\ c15}$ ) y palmiste (rico en ácido láurico - $12:0$ ). Estos aceites fueron seleccionados por sus efectos positivos sobre la producción de los ácidos transvaccénico ( $18:1_{t11}$ ) y ácido linoleico conjugado *cis* 9 *trans* 11 ( $18:2_{c9\ t11}$  **ALC**) (aceites poliinsaturados) y por sus propiedades en la disminución de la producción de  $CH_4$  (aceite de palmiste).

En el primer ensayo *in vitro*, las mezclas utilizadas no generaron efectos diferentes sobre los parámetros de fermentación con excepción de la degradación de la fibra en detergente neutro. Esto indicaría que no hubo efectos aditivos sobre los parámetros de fermentación (sumatoria de efectos parciales de los aceites puros). Sin embargo cabe resaltar que el tipo de sistema *in vitro* empleado en el presente trabajo de tesis tiene ciertas limitantes, al ser un sistema cerrado que no reproduce las condiciones propias (reales) del tracto gastro intestinal de los rumiantes. Sumado a lo anterior, los niveles de inclusión del total de aceite fueron del orden de 3%, los que si bien resultan cercanos a los comúnmente utilizados en raciones de vacas en sistemas de lechería especializada en la Sabana de Bogotá; son bajos cuando se les compara con los empleados por otros investigadores.

En el segundo ensayo *in vitro* las mezclas utilizadas si generaron efectos diferentes sobre las proporciones de **AG** en el medio de cultivo respecto a los aceites puros. Este resultado indicaría cierto potencial al utilizar mezclas de aceites en la alimentación de vacas lecheras para potenciar o reducir el flujo de algunos **AG** específicos al duodeno y su posterior excreción en glándula mamaria. Las mayores proporciones de aceite de maíz en mezcla con palmiste o linaza generaron mayores niveles de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub>** **ALC**. El aceite de linaza favoreció la síntesis de **18:2<sub>t10 c12</sub>**, el cual se encuentra asociado al síndrome de baja grasa en leche y por tal razón su inclusión puede generar efectos adversos sobre la productividad animal en un contexto del pago de leche por su tenor graso. Por último el aceite de palmiste atenuó la biohidrogenación (**BH**) del **18:2<sub>c9 c12</sub>** y del **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**, lo que sugería que su inclusión en una mezcla para alimentación de vacas lecheras podría favorecer la aparición de los **AG** previamente mencionados en la leche.

En virtud de estos resultados, para el ensayo *in vivo* se decidió trabajar con un aceite de maíz puro (por su efecto sobre la producción de ácido transvaccénico y linoleico conjugado) y una mezcla de aceite de maíz y aceite de palmiste en una proporción 75:25. La sustitución de aceite de maíz por aceite de palmiste en la mezcla definida no modificó el consumo voluntario, lo cual podría explicarse por una relativamente baja inclusión de aceites (4%) en la ración, por una restricción alimenticia característica de los sistemas de lechería especializada en la Sabana de Bogotá que generó un efecto de adición. La adición de aceites no redujo la digestibilidad de la dieta, lo cual se podría explicar por una digestibilidad compensatoria en el tracto gastro intestinal posterior y al ya mencionado bajo nivel de inclusión de aceites en la ración. Se detectó una reducción en la

concentración de **AGV's** se redujo en el rumen, lo cual sugiere una menor producción de **CH<sub>4</sub>**. La inclusión de aceites en la ración aumentó la producción y la concentración de grasa en la leche gracias a un mayor aporte energético y a una alta transferencia de los **AG** dietarios respecto a la dieta control. El perfil de **AG** en la leche resultó mejorado de forma más saludable con la adición de aceites debido al incremento en la proporción de **AG** insaturados y las concentraciones de **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** y **18:1<sub>t11</sub>**. Estos cambios resultaron en leches con menores índices de aterogenicidad y trombogenicidad, lo cual se logró en gran parte a la inclusión del aceite de maíz. La sustitución de un 25% de aceite de maíz por aceite de palmiste en la suplementación con aceites redujo la calidad de la leche, pues incrementó los índices de aterogenicidad, trombogenicidad y redujo las proporciones de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub> ALC** en la leche lo que se explicaría por el aporte de **12:0** contenido en el aceite de palmiste. Si bien la mezcla de aceite de maíz y palmiste generó una leche de mayor calidad que la producida con la dieta control, cabe resaltar que inclusiones de aceite de palmiste superiores a las empleadas en nuestro ensayo pueden reducir la calidad de la grasa láctea.

## 5.2 Conclusiones

La inclusión de aceites en la ración de vacas lecheras permite disminuir la producción de **CH<sub>4</sub>** entérico y modificar la composición láctea de los **AG** constitutivos. El nivel de impacto sobre estas variables depende del perfil de **AG** del aceite suplementado. La utilización de aceites ricos en **AG** poliinsaturados (maíz, soya, girasol y linaza) disminuyen la producción de **CH<sub>4</sub>** en una menor proporción comparados con aceites ricos en **AG** de cadena media (coco y palmiste). La inclusión de aceites ricos en **AG** poliinsaturados en la dieta aumenta las proporciones de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub>**. Recursos vegetales ricos en **18:2<sub>c9 c12</sub>** generan mayores proporciones de **18:1<sub>t11</sub>** y **18:2<sub>c9 t11</sub>** en leche y en sistemas *in vitro* comparados con recursos ricos en **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>**. La inclusión de recursos ricos en **AG** de cadena media (**12:0**, **14:0**) aumenta la excreción de estos en leche.

La inclusión de aceites vegetales con diferentes perfiles de **AG** al 3% en un sistema *in vitro* disminuyó la degradación del sustrato y la producción de gas total y **CH<sub>4</sub>**. Las mayores reducciones de la degradación de la **MS**, la fibra y la producción de **CH<sub>4</sub>** se presentaron con la adición de aceite de palmiste comparado con los aceites de maíz y

linaza. Las mezclas de aceites vegetales tuvieron un efecto asociativo positivo sobre la degradación de la fibra. La inclusión de aceite de palmiste aún en bajas cantidades en una mezcla con aceite de linaza o aceite de maíz reduce la producción de **CH<sub>4</sub>**. Esta disminución se asocia a una reducción de la digestibilidad de la **MS**, lo cual podría llevar a una disminución de la productividad animal si dichas mezclas se emplean en vacas lecheras de alto o medio mérito genético.

La adición de aceites vegetales y sus mezclas en un sistema *in vitro* al 3% de la **MS** modificó el perfil de **AG** en el fluido ruminal. Estos cambios diferenciales fueron generados por la composición de los **AG** de los aceites, los cuales influenciaron los procesos de **BH**. Los aceites ricos en **AG** poliinsaturados generaron las mayores proporciones de **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>** y **18:2<sub>t10 c12</sub>** comparado con **P**, que incrementó las proporciones de **AG** de cadena media. Entre los aceites insaturados, **M** generó mayores proporciones de **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>** comparado con **L**, que aumentó los niveles de **18:2<sub>t10 c12</sub>**. Las mezclas de aceites tuvieron efectos diferentes a los aceites puros, generando efectos asociativos sobre las proporciones de **AG**. La sustitución de un 25% de aceite de **M** o **L** disminuyó la **BH** del **18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** respectivamente, lo cual podría generar un aumento en los flujos duodenales de estos **AG** y la excreción de estos en leche si se incluyen en la dieta de vacas lecheras. Sin embargo, La inclusión de **L**, debería limitarse, ya que produjo mayores cantidades de **18:2<sub>t10 c12</sub>** comparado con **M**, y este **AG** está relacionado a la disminución del porcentaje y producción de grasa en vacas lecheras.

La suplementación de aceite de maíz o una mezcla de aceite de maíz y aceite de palmiste (75:25) cercana al 4% de la **MS** a vacas lecheras en pastoreo no disminuyó la digestibilidad de la dieta, el consumo voluntario de la dieta y aumentó la producción de leche y leche corregida por energía (**LCE**). La adición de aceites disminuyó las concentraciones molares de ácidos grasos volátiles (**AGV**) en el rumen lo cual se podría relacionar con la menor producción ruminal de **CH<sub>4</sub>**. El perfil de **AG** de la leche fue modificado por la adición de los aceites y lo mejoró significativamente al aumentar los niveles de **18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>** y otros **AG** insaturados. Los índices de trombogenicidad y aterogenicidad disminuyeron debido al cambio en las proporciones de **AG** generado por la suplementación de aceites. Al sustituir un 25% de aceite de maíz por aceite de palmiste en la suplementación se reduce la calidad de la leche debido al aumento de los **AG** de

cadena media, de los índices de aterogenicidad y trombogenicidad y a la disminución de **AG** de interés biológico (**18:1<sub>t11</sub>**, **18:2<sub>c9 t11</sub>**).

## 5.2 Recomendaciones

- Este trabajo busco establecer si existían diferencias en los efectos de las mezclas de aceites contrastantes en su perfil de **AG** comparado con los aceites puros. Los efectos asociativos que se presentaron con la adición de las mezclas sobre el perfil de **AG** indicarían que se presentaron efectos sobre poblaciones microbianas. Sería importante determinar los cambios en los conteos de microorganismos que participan en la **BH** ruminal de los **AG** para entender mejor los efectos asociativos.
- La determinación de otras variables como el nivel de amonio, poblaciones ruminales totales, conteo de protozoarios, organismos fibrolíticos y archaeas permitiría explicar de una mejor manera el efecto de los aceites puros y sus mezclas sobre la fermentación ruminal.
- Se deben desarrollar estudios que permitan determinar los efectos reales de recursos ricos en **18:2<sub>c9 c12</sub>** y **18:3<sub>c9 c12 c15</sub>** en sistemas de fermentación ruminal *in vitro* con sustratos acordes a condiciones pastoriles.
- Prolongar los periodos de adaptación a los tratamientos en ensayos *in vivo* que permitan evitar los efectos residuales sobre las proporciones de ciertos **AG**.
- Se debe restringir el uso de los de aceite de palmiste y linaza en la dieta de vacas lecheras, ya que estos pueden generar efectos deletéreos sobre la productividad animal.
- Es importante dar a conocer a los productores el impacto de la inclusión de aceites sobre la productividad animal y el medio ambiente.



## 6. Anexos

Anexo 1. Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 2: fermentación *in vitro*

Variable	Parámetro				
	S	S <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	Pr<W
<b>Degradación (%)</b>					
<b>MS</b>	2.16	4.67	***	0.88	0.5622
<b>FDN</b>	4.28	18.29	***	0.92	0.9327
<b>Producción de gas</b>					
<b>MI</b>	9.01	81.14	***	0.83	0.9127
<b>g/MSd</b>	21.05	443.2	***	0.67	0.6372
<b>g/FDNd</b>	69.80	4872.52	*	0.51	0.1585
<b>Producción de CH<sub>4</sub></b>					
<b>%</b>	1.82	3.33	*	0.42	0.8937
<b>MI</b>	3.83	14.70	***	0.72	0.2587
<b>g/MSd</b>	9.93	98.62	***	0.60	0.2016
<b>g/FDNd</b>	25.98	675.18	NS	0.38	0.1604
<b>Fluido ruminal</b>					
<b>pH</b>	0.034	0.001	NS	0.52	0.2846
<b>AGV's (mmol/l)</b>	2.49	6.2	*	0.63	0.1388
<b>Acético (%)</b>	0.84	0.70	NS	0.25	0.6609
<b>Propiónico (%)</b>	0.79	0.62	NS	0.36	0.7697
<b>Butírico (%)</b>	0.45	0.20	NS	0.57	0.1721
<b>Valérico (%)</b>	0.082	0.0066	*	0.90	0.1879
<b>Acético:Propiónico</b>	0.18	0.032	NS	0.18	0.2578

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

**Anexo 2.** Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 3: perfil de **AG** del fluido ruminal (g/100 g de **AG**)

AG	Parámetro				
	S	S <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	Pr<W
<b>6:0</b> <sup>*a</sup>	0.03	0.08	***	0.81	0.0521
<b>8:0</b> <sup>*b</sup>	0.04	0.001	***	0.78	0.3434
<b>10:0</b> <sup>†</sup>	0.32	0.10	*	0.34	<0.0001
<b>12:0</b> <sup>*c</sup>	2.41	5.79	***	0.99	0.0980
<b>14:0</b> <sup>*c</sup>	1.47	2.16	***	0.99	0.3141
<b>14:1</b> <sub>t9</sub>	0.07	0.004	***	0.70	0.5038
<b>15:0</b> <sup>*d</sup>	0.21	0.04	***	0.61	0.0796
<b>15:1</b> <sub>t10</sub>	0.05	0.002	***	0.64	0.2503
<b>16:0</b>	1.28	1.65	***	0.92	0.3429
<b>16:1</b> <sub>t9</sub>	0.02	0.0003	**	0.42	0.5984
<b>16:1</b> <sub>c9</sub>	0.04	0.001	***	0.70	0.0574
<b>17:0</b>	0.05	0.002	***	0.67	0.8059
<b>17:1</b> <sub>t10</sub> <sup>*c,+</sup>	0.02	0.0002	**	0.48	0.0491
<b>18:0</b> <sup>†</sup>	3.33	11.08	***	0.73	0.0048
<b>18:1</b> <sub>t6</sub>	0.10	0.01	***	0.62	0.1300
<b>18:1</b> <sub>t9</sub> <sup>*b</sup>	0.08	0.006	***	0.59	0.0655
<b>18:1</b> <sub>t11</sub>	3.33	11.10	***	0.94	0.2340
<b>18:1</b> <sub>c6</sub> <sup>*c</sup>	0.28	0.08	**	0.49	0.4662
<b>18:1</b> <sub>c9</sub>	1.90	3.60	***	0.91	0.3776
<b>18:1</b> <sub>c11</sub> <sup>*d</sup>	0.14	0.02	***	0.63	0.4139
<b>18:2</b> <sub>t9 t12</sub>	0.59	0.35	***	0.98	0.7980
<b>18:2</b> <sub>c9 c12</sub>	1.47	2.16	***	0.77	0.0627
<b>18:3</b> <sub>c9 c12 c15</sub> <sup>*c</sup>	1.23	1.52	***	0.79	0.0520
<b>18:2</b> <sub>c9 t11</sub> <sup>*a</sup>	0.89	0.79	***	0.95	0.0810
<b>18:2</b> <sub>t10 c12</sub> <sup>*c</sup>	0.81	0.66	***	0.98	0.0501
<b>19:0</b>	0.16	0.02	***	0.93	0.1183
<b>Otros</b>	1.08	1.17	***	0.69	0.1430

<sup>†</sup>Variables sin distribución normal del error. \* Variables transformadas, <sup>a</sup>Logaritmo, <sup>b</sup>1/y, <sup>c</sup>Raíz, <sup>d</sup>Cuadrado. Significancia; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001.

**Anexo 3.** Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 3: sumatorias de **AG** del fluido ruminal (g/100 g de **AG**)

<i>Variable</i>	<i>Parámetro</i>				
	<i>S</i>	<i>S<sup>2</sup></i>	<i>p</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>Pr&lt;W</i>
<b>Saturados</b>	5.67	32.16	***	0.92	0.1202
<b>Insaturados</b>	6.38	40.77	***	0.92	0.0571
<b>Monoinsaturados</b>	4.58	21.01	***	0.94	0.4969
<b>Poliinsaturados<sup>ab</sup></b>	2.21	4.89	***	0.70	0.1094
<b>≤ 10 C<sup>b</sup></b>	0.22	0.05	*	0.36	0.1465
<b>Impares<sup>ce</sup></b>	0.63	0.39	***	0.67	0.2298
<b>De novo (≤ 17 C)</b>	4.94	24.40	***	0.99	0.0818
<b>Preform (≥18 C)</b>	5.55	30.77	***	0.98	0.0579

\*Variables transformadas, <sup>b</sup>1/y, <sup>e</sup>1/y<sup>2</sup>. Significancia; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001.

**Anexo 4.** Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 4: fermentación ruminal

<i>Variable</i>	<i>Parámetro</i>				
	<i>S</i>	<i>S<sup>2</sup></i>	<i>p</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>Pr&lt;W</i>
<b>Digestibilidad (%)</b>					
<i>MS</i>	2.94	8.66	NS	0.93	0.8194
<i>MO</i>	2.40	5.78	NS	0.97	0.8599
<i>FDN</i>	3.81	14.51	NS	0.92	0.9318
<i>FDA</i>	2.85	8.13	NS	0.95	0.8929
<b>Fluido ruminal</b>					
<i>pH</i>	0.18	0.033	*	0.97	0.3935
<b>AGV (mol/l)</b>	12.98	168.51	***	0.99	0.9824
<i>Acético (%)</i>	0.82	0.67	NS	0.85	0.9611
<i>Propiónico (%)</i>	0.86	0.74	NS	0.73	0.7024
<i>Butírico (%)</i>	0.97	0.93	NS	0.94	0.9314
<i>Valérico (%)</i>	0.15	0.02	NS	0.75	0.2441
<i>Acético:Propiónico</i>	0.13	0.02	NS	0.69	0.7413
<i>CH<sub>4</sub> (ml/100 moles AGV's)</i>	11.50	132.21	NS	0.60	0.5560
<i>CH<sub>4</sub> corregido (ml/mol prod)</i>	94.32	8897.95	**	0.99	0.5888

Significancia; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001.

**Anexo 5.** Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 4: consumo de **MS** (kg/d)

<i>Variable</i>	<i>Parámetro</i>				
	<i>S</i>	<i>S<sup>2</sup></i>	<i>p</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>Pr&lt;W</i>
<i>Kikuyo</i>	1.09	1.20	NS	0.70	0.2816
<i>Concentrado</i>	-	-	-	-	-
<i>Ensilaje</i>	-	-	-	-	-
<i>Aceite</i>	-	-	-	-	-
<i>Total</i>	1.15	1.31	NS	0.73	0.2816

**Anexo 6.** Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 4: Producción y calidad de leche

<i>Variable</i>	<i>Parámetro</i>				
	<i>S</i>	<i>S<sup>2</sup></i>	<i>p</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>Pr&lt;W</i>
<b>Leche</b>					
Producción (kg/d)	1.38	1.91	**	0.99	0.3904
Producción <b>LCE</b> (kg/d)	1.32	1.85	**	0.98	0.3899
<b>Sólidos totales</b>					
Concentración (%)	0.63	0.40	*	0.96	0.4034
Producción (kg/d)	0.26	0.07	*	0.97	0.9610
<b>Proteína</b>					
Concentración (%)	0.10	0.01	NS	0.85	0.8887
Producción (kg/d)	0.09	0.008	*	0.98	0.9655
<b>Grasa</b>					
Concentración (%)	0.16	0.03	*	0.96	0.9304
Producción (kg/d)	0.07	0.005	**	0.98	0.3722

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

**Anexo 7.** Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 4: composición de **AG** de la leche (g/100 g de **AG**)

<b>AG</b>	<b>Parámetro</b>				
	<b>S</b>	<b>S<sup>2</sup></b>	<b>p</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Pr&lt;W</b>
<b>4:0</b>	0.25	0.06	NS	0.91	0.6883
<b>6:0</b>	0.19	0.03	NS	0.91	0.4246
<b>8:0</b>	0.18	0.03	*	0.97	0.9399
<b>10:0</b>	0.55	0.30	**	0.99	0.1663
<b>11:0</b>	0.11	0.01	*	0.98	0.1581
<b>12:0</b>	0.73	0.54	*	0.97	0.6061
<b>13:0</b>	0.001	0.03	NS	0.95	0.9878
<b>14:0</b>	1.27	1.61	**	0.98	0.6751
<b>14:1<sub>t9</sub></b>	0.043	0.002	**	0.98	0.8388
<b>14:1<sub>c9</sub></b>	0.048	0.002	*	0.93	0.1726
<b>15:0</b>	0.38	0.14	NS	0.97	0.6956
<b>15:1</b>	0.20	0.04	*	0.98	0.9068
<b>16:0</b>	4.45	19.80	*	0.98	0.9565
<b>16:1<sub>t9</sub></b>	0.05	0.002	NS	0.92	0.0941
<b>16:1<sub>c9</sub></b>	0.33	0.11	NS	0.91	0.5351
<b>17:0</b>	0.09	0.007	NS	0.85	0.9945
<b>17:1<sub>c9</sub></b>	0.13	0.017	NS	0.80	0.7448
<b>18:0</b>	2.49	6.19	*	0.94	0.7325
<b>18:1<sub>t9</sub></b>	0.44	0.19	**	0.97	0.9724
<b>18:1<sub>c9</sub></b>	18.31	4.28	*	0.96	0.9886
<b>18:1<sub>t11</sub></b>	0.92	0.85	*	0.99	0.4556
<b>18:2<sub>c9 c12</sub></b>	0.04	0.20	NS	0.91	0.9153
<b>18:3<sub>c9 c12 c15</sub></b>	0.05	0.002	NS	0.92	0.2287
<b>18:2<sub>c9 t11</sub> ALC<sup>1</sup></b>	0.006	0.08	**	0.99	0.6926
<b>18:2<sub>t10 c12</sub> ALC</b>	0.03	0.0009	NS	0.95	0.3583
<b>Otros</b>	0.18	0.033	NS	0.94	0.8731

<sup>1</sup> Variable transformada por su raíz. Significancia; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

**Anexo 8.** Parámetros estadísticos variables evaluadas capítulo 4: sumatorias y relaciones **AG** de la leche (g/100 g de **AG**)

<i>Variable</i>	<i>Parámetro</i>				
	<i>S</i>	<i>S<sup>2</sup></i>	<i>p</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>Pr&lt;W</i>
<i>Saturados</i>	4.99	24.87	*	0.96	0.6499
<i>Insaturados</i>	5.10	26.01	*	0.96	0.7584
<i>Monoinsaturados</i>	4.64	21.54	*	0.96	0.7991
<i>Poliinsaturados</i>	0.52	0.27	*	0.98	0.4503
<i>Impares</i>	0.75	0.56	*	0.96	0.4887
<i>De novo (≤ 17 C)</i>	7.40	56.90	**	0.98	0.5560
<i>Preformados (≥ 18C)</i>	7.54	56.90	**	0.98	0.6205
<i>Saturados:Insaturados</i>	0.54	0.29	*	0.96	0.8299
<i>ω3:ω6</i>	0.10	0.01	*	0.97	0.9166
<i>Índice de aterogenicidad</i>	0.45	0.20	*	0.97	0.8765
<i>Índice de trombogenicidad</i>	0.79	0.62	*	0.96	0.9574

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