

**EFFECTO DE LA INCLUSION DE ACEITE DE LINO Y PESCADO EN
RACIONES CONCENTRADAS**

Ing. Agr. Ingrid Patricia Mónaco

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al
Título de
MAGISTER SCIENTIAE en Producción Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

FACULTAD de CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL de MAR DEL PLATA

Unidad Integrada Balcarce: Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP -Estación
Experimental Agropecuaria Balcarce – INTA

Balcarce, Argentina

Diciembre de 2011

EFFECTO DE LA INCLUSION DE ACEITE DE LINO Y PESCADO EN RACIONES CONCENTRADAS

Ing. Agr. Ingrid Patricia Mónaco

Director de Tesis
Francisco José Santini, Ing. Agr., Ph. D.

Asesor
Gustavo Jesús Depetris, Med. Vet., M. Sc.

**EFFECTO DE LA INCLUSION DE ACEITE DE LINO Y PESCADO EN
RACIONES CONCENTRADAS**

Ing. Agr. Ingrid Patricia Mónaco

Aprobada por:

Néstor Strizler, Ing. Agr., Ph. D.
(Evaluador Externo)

Aprobada por:

Gerardo Gagliostro, Ing. Agr., Ph. D.
(Evaluador Externo)

Aprobada por:

Grigera Naón, Ing. Agr., Ph. D.
(Evaluador Externo)

“A mi esposo Pablo, por toda su comprensión y amor, y a mi hijo Augusto por todos los momentos de felicidad que me brinda..y a los dos regalitos que me dio la vida.. mis mellizas Lourdes y Camila...

A mis padres Alicia y Roberto a quienes les debo gran parte de lo que soy y a mis hermanos Diego, Fernando y Naiara por todo su apoyo...

Y a mis suegros Norma y Carlos por hacerme sentir como una hija. “

AGRADECIMIENTOS

A Gustavo Depetris por la ayuda brindada en la realización del ensayo y por todos los consejos para el desarrollo de la tesis

A Francisco Santini y Enrique Paván por los aportes realizados

Adriana Cano por la ayuda ofrecida en el mundo de los análisis estadísticos

A todas mis hijas...en especial a Lorena Iacopini, por su amistad, cariño y aguante...a María Inés Pachecoy, Roxana Ávila, María Agostini, Mariel Lago y Natalia Carrasco por la ayuda brindada, las horas de estudio compartidas, y porque nuestra amistad perdura a pesar de que ya no estamos juntas..

A Pablo Vispo, Carlitos Maglieti, Seba Zuil, Diego Ortiz, Pablo Barbera, José Geraci y Sebastián Vittone

A vos Graciela ...nuestra querida mamá del casino, por todo el cariño y contención que brindas a todos los que pasamos por ahí, gracias por todas las veces que nos escuchaste renegar, llorar o simplemente compartir nuestras alegrías

A José Méndez y a todas las chicas del laboratorio de nutrición, Dorita del laboratorio de suelo, Patricio Fey, Susana Guaita, Gustavo Eyherabide, Gerardo Gagliostro y la Dra. María Elena Cossu por la colaboración, consejos y análisis de mis muestras

Y a todos los del casino con los que compartimos momentos gratos... desde una comida hasta una charla, porque a los que nos toco estar ahí, supimos sobrellevar nuestra estadía en Balcarce con el cariño de las personas que teníamos al lado.

Gracias!!!

INDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE	vi
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCION	1
1.1. Hipótesis del trabajo	4
1.2. Objetivos del trabajo	5
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	6
2.1. Uso de lípidos en las dietas de los rumiantes	6
2.1.1 Hidrólisis	7
2.1.2. Biohidrogenación	7
2.1.2.1. Biohidrogenación del ácido linoleico	8
2.1.2.2. Biohidrogenación del ácido linolénico	9
2.2. Formación e importancia del ácido linoleico conjugado (CLA)	9
2.3. Modo de acción del aceite	10
2.3.1. Efectos generados por los aceites	12
2.4. Aceite de lino	14
2.5. Aceite de pescado	15
2.6. Efecto sobre el consumo	17
2.7. Efecto sobre el ambiente ruminal	19
2.7.1. pH ruminal	19
2.7.2. AGV totales y la relación acético: propiónico (A:P)	20
2.7.3. Nitrógeno amoniacal	22
2.8. Perfil de ácidos grasos en la leche y carne	23
2.9. Perfil de ácidos grasos en sangre	25
3. MATERIALES Y METODOS	27
3.1. Experimento	27

3.1.1. Sitio y período experimental	27
3.1.2. Tratamientos	27
3.1.3. Animales	28
3.1.4. Manejo de los animales	28
3.1.5. Mediciones	29
3.1.6. Diseño Experimental y Análisis Estadístico	34
4. RESULTADOS	36
4.1. Características químico-biológicas de los alimentos	36
4.2. Consumo de MS	40
4.3. Digestibilidad en vivo	40
4.4. Ambiente ruminal	41
4.5. Perfil de los ácidos grasos del rumen	49
4.6. Perfil de los ácidos grasos en sangre	52
4.7. Comportamiento ingestivo	54
5. DISCUSION	59
5.1. Características químico-biológicas	59
5.2. Consumo	61
5.3. Digestibilidad	63
5.4. pH	64
5.5. AGV	65
5.6. Protozoos	66
5.7. N-NH ₃	67
5.8. Perfil de ácidos grasos en rumen	68
5.9. Perfil de ácidos grasos en sangre	70
5.10. Implicancias	71
6. CONCLUSIONES	73
7. BIBLIOGRAFIA	74
8. ANEXO	90
8.1. Anexo1	90
8.2. Anexo 2	95

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química de las dietas.	28
Cuadro 2. Horarios de muestreo de materia fecal.	31
Cuadro 3. Características químico-biológicas de los componentes de la dieta.	36
Cuadro 4. Porcentaje de materia seca, composición química estimada y concentración energética de las raciones experimentales.	37
Cuadro 5. Perfil de ácidos grasos de los aceites de lino, pescado y silaje de maíz.	39
Cuadro 6. Consumo de MS, lípidos y energía metabolizable de los novillos fistulados alimentados con C, L y L+P.	40
Cuadro 7. Digestibilidad del almidón, FDN, MO y PB de las dietas C, L y L+P.	41
Cuadro 8. Valores del ambiente ruminal de los novillos fistulados alimentados con C, L y L+P.	42
Cuadro 9. Perfil de ácidos grasos en rumen de los novillos fistulados alimentados con C, L y L+P.	50
Cuadro 10. Perfil de ácidos grasos de la sangre de los novillos fistulados alimentados con C, L y L+P.	53
Cuadro 11. Comportamiento ingestivo de los novillos fistulados alimentados con las dieta C, L y L+P.	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la concentración promedio de los AGV totales para los tratamientos C, L y L+P.	43
Figura 2. Evolución de la concentración del ácido acético promedio para los tratamientos C, L y L+P.	44
Figura 3. Evolución de la concentración del ácido propiónico promedio para los tratamientos C, L y L+P a través de los horarios de muestreo.	45
Figura 4. Evolución de la relación A: P promedio para los tratamientos C, L y L+P.	46
Figura 5. Evolución del pH promedio para los tratamientos C, L y L+P.	47
Figura 6. Evolución del N-NH ₃ promedio para los tratamientos C, L y L+P.	47
Figura 7. Promedio del número de protozoos (N° protozoos x10 ⁴ /ml) promedio para los tratamientos C, L y L+P.	48
Figura 8. Número de protozoos (N° protozoos x10 ⁴ /ml) promedio para los tratamientos C, L y L+P para los tres períodos de medición.	49
Figura 9. Tiempo total de consumo diario de los novillos alimentados con las dietas C, L y L+P.	56
Figura 10. Evolución del tiempo dedicado al consumo de los novillos alimentados con las dietas C, L y L+P.	56
Figura 11. Tiempo total de rumia diaria de los novillos alimentados con las dietas C, L y L+P.	57
Figura 12. Evolución del tiempo dedicado a la rumia en los novillos alimentados con las dietas C, L y L+P.	58

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue conocer el efecto de la inclusión del aceite de lino y pescado en raciones con alto nivel de grano sobre el consumo, los perfiles de ácidos grasos en el licor ruminal y en sangre, el ambiente ruminal (pH, N-NH₃, AGV, recuento de protozoos), la digestibilidad de la dieta y el comportamiento ingestivo. Se utilizaron 3 novillos entre 280 ± 5Kg y 340 ± 35kg de peso al inicio y final del ensayo respectivamente, canulados en rumen con aproximadamente 18 meses de edad. Los animales fueron alojados al azar, en corrales individuales para cada tratamiento. Se establecieron 3 tratamientos: **C**: dieta sin aceite, **L**: dieta con un 5% aceite de lino y **L+P**: dieta con un 5% aceite de lino + 1% aceite de pescado. Los % de aceites se calcularon mediante el reemplazo de los componentes de la dieta base. La misma se formuló con grano de maíz entero (64,4; 61 y 60 %), ensilaje de planta entera de maíz (20,6; 20 y 20%) y expeller de girasol como suplemento proteico (15; 14 y 14 % para C, L y L+P respectivamente). Las dietas fueron isoproteicas pero no isoenergéticas debido a la adición de los lípidos. Las dietas se suministraron en dos entregas diarias (8:00 y 20:00 hs). El consumo, los perfiles de ácidos grasos en sangre, protozoos y la digestibilidad de la dieta se analizaron mediante el procedimiento PROC GLM de SAS dentro de un diseño de cuadrado latino 3x3. Mientras que los perfiles de ácidos grasos en el licor ruminal, el ambiente ruminal (pH, N-NH₃, AGV) el comportamiento ingestivo (rumia y consumo) generados por las dietas se analizaron como medidas repetidas en el tiempo mediante el procedimiento PROC MIXED de SAS dentro de un diseño de cuadrado latino 3x3.

El aceite de lino presentó un 51,5% de C18:3, mientras que el aceite de pescado alcanzó los valores de 8,2 y 15,5% para el EPA y DHA respectivamente. En cuanto al ensilaje de planta entera de maíz exhibió un 15,6% de C18:2 y valores de 34,9 y 18% para el C18:0 y C16:0 respectivamente. No se detectaron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos para la digestibilidad del almidón, FDN, MO y PB de la dietas. Se detectaron diferencias en el consumo de MS ($p=0,03$) debido a que el mayor consumo promedio de MS lo presentó el tratamiento C (7,62 KgMS/an/día) mientras que para L y L+P se registró una disminución del 28,6 y 24,3 % respectivamente. Esta disminución en el consumo generó el tratamiento C consumiera mayor energía metabolizable a pesar de que el consumo de lípidos se incrementó en un 66 y 100% para el tratamiento L y L+P con respecto a C. No se detectaron diferencias significativas para el valor promedio de la concentración total de ácidos grasos volátiles (AGV), como así tampoco para las concentraciones de los ácidos grasos en forma individual. La relación A:P, el pH y la concentración de N-NH₃ no fueron afectados ($p>0,05$) por los tratamientos. Estos resultados permiten reafirmar que los niveles de aceites usados no afectaron la digestibilidad de la dieta mientras que uno de los resultados inesperados fue el recuento de protozoos debido a que el tratamiento L fue un 246 y 255 % mayor con respecto a C y L+P respectivamente, mientras que se esperaba una reducción de los mismos en las raciones con inclusiones de aceites. En cuanto al comportamiento ingestivo se detectaron diferencias para el consumo ($p=0,03$) lográndose mayor tiempo dedicado al consumo a medida que se incrementaba la cantidad de aceite en la ración. Con la inclusión de aceites se pretendía cambiar los perfiles de ácidos grasos generados en rumen y en sangre lo cual no se consiguió debido a que solamente se encontró una mejoría en el ácido vaccénico a nivel ruminal (t_{11} C18:1 $p=0,02$) en el tratamiento L pero esto no fue trasladado en

sangre por lo tanto se estipula que los niveles de aceites debieron ser más altos en este tipo de raciones para alcanzar los objetivos planteados.

Palabras claves: aceite de lino, aceite de pescado, perfil ácidos grasos rumen, ambiente ruminal, digestibilidad.

ABSTRACT

The objective of this experiment was to evaluate the effect of linseed oil and fish oil on concentrate diets on intake, intake behavior, digestibility, ruminal volatile fatty acids, ruminal pH, ruminal ammonia and ruminal and blood fatty acids profile. Three rumen-cannulated 18 month old steers were used. Average initial and final body weight was 280 ± 5 and 340 ± 35 kg. Steers were randomly allocated to individual pen in a 3x3 Latin Square design. Treatments were: diet without oil (C), diet with 5% linseed oil (L) and L plus 1% fish oil (L+P). Oil percentages were calculated by replacing the components of the basal diet. The basal diet was formulated with whole corn(64.4; 61 and 60%), corn silage (20.6; 20 and 20%) and sunflower meal (15; 14 and 14% for C, L and L+P). Diets were iso proteic but energy density varied with oil inclusion. Steers were fed at 8:00 am and 8:00 pm. Statistical analysis was conducted using the PROC GLM of SAS program for intake, blood fatty acids profile, digestibility and PROC MIXED of SAS program for ruminal fatty acids profile ruminal, volatile fatty acids, ruminal pH, ruminal ammonia and intake behavior. Linseed oil had 51.5% of C18:3 while fish oil had 8.2 and 15.5% for EPA and DHA, respectively. Corn silage had 15.6; 34.9 and 18 % of C18:2, C18:0 and C16:0, respectively. Treatments had no effect on OM, starch, NDF and CP apparent digestibility. Steers fed C diet had higher DM intake ($p=0.03$) than those given L or L+P (28.6 and 24.3% of intake depression, respectively). This decrease in consumption generated C treatment increased metabolizable energy consumed although lipid consumption increased by 66 and 100% for treatment L and L+P with respect to C. Treatments did not affect ruminal VFA mean concentration, individual VFA concentration, acetate: propionate ratios, ruminal pH and ruminal ammonia N

($p > 0.05$). Protozoa counts were 246 to 255% greater for L than C and L+P, respectively. With regard to ingestive behavior differences were found for consumption ($p = 0.03$) more time spent achieving consumption as it increased the amount of oil in the ration. With the inclusion of oils are intended to change the fatty acid profiles generated in rumen and blood which was not achieved because only found an improvement in the level ruminal vaccenic acid (t11 C18: 1 $p = 0.02$) in the L treatment but this was not transferred in the blood therefore stipulates that oil levels should be higher in this type of ration to achieve the objectives.

Key Words: linseed oil, fish oil, ruminal fatty acid profile, ruminal environment, digestibility

1. INTRODUCCION

La composición de los ácidos grasos de la carne ha cobrado importancia debido a los efectos ocasionados sobre la salud humana principalmente por la cantidad total de grasa, la relación ácidos grasos poliinsaturados: ácidos grasos saturados (AGPI: AGS) y la relación entre los ácidos grasos omega 6: omega 3 ($\Omega 6$: $\Omega 3$) (Enser *et al.*, 1998). Con respecto al primer parámetro, se considera que los alimentos que poseen 5 g de grasa por cada 100 g son considerados bajos en grasas (Food Advisory Committee, 1990 citado por Enser *et al.*, 1998). Se define como AGPI a aquellos que poseen al menos una doble ligadura en su estructura, mientras que los AGS no las poseen. Se considera que la relación AGPI: AGS debe mantenerse en valores mayores a 0,7 (Raes *et al.*, 2004) pero la misma puede verse afectada por varios motivos, entre los cuales puede mencionarse al sistema de biohidrogenación ruminal, que provoca que los depósitos grasos de los rumiantes presenten mayor contenido de AGS respecto a los monogástricos (Geay *et al.*, 2001). Otro parámetro a tener en cuenta dentro de los AGPI, es la relación $\Omega 6$: $\Omega 3$. Los llamados ácidos grasos omega 6 y 3 son ácidos grasos que poseen la primera doble ligadura comenzando a contar desde el carbono omega en la posición 6 y 3 respectivamente. Entre los ácidos grasos $\Omega 6$ podemos citar, entre los más representativos, al ácido linoleico (C18:2) y el araquidónico (C20:4) y entre los ácidos grasos $\Omega 3$ el ácido α -linolénico (C18:3), eicosapentanoico (C20:5) y docosahexanoico (C22:6), estos dos últimos se encuentran presentes en el aceite de pescado (AP) (Williams, 2000 citado por Wood *et al.*, 2003). La relación $\Omega 6$: $\Omega 3$ está considerada como un factor de riesgo asociado a la producción de cáncer y de enfermedades coronarias (Enser, 2001). Si bien la recomendación es que esta relación sea menor a 4, algunas carnes poseen valores

más altos los cuales podrían manipularse para lograr relaciones más favorables (Wood *et al.*, 2003).

Además, en los últimos años se ha encontrado un componente dentro de las grasas que tiene efectos benéficos para la salud humana denominado ácido linoleico conjugado (CLA) (McGuire; McGuire, 2000). El CLA es un término usado para denominar a los isómeros de diferentes posiciones y geometrías del ácido linoleico (*cis* 9, *cis* 12 ácido octadecaenoico) (Chin *et al.*, 1992). Actualmente, a los CLAs, se le atribuyen propiedades favorables sobre el cáncer (Scimeca *et al.*, 1994 citado por McGuire; McGuire, 2000), la aterosclerosis (Garnsworthy, 1997), las enfermedades cardiovasculares (Roche *et al.*, 2001), la diabetes (Khanal, 2004 citado por Schmid *et al.*, 2006), el sistema inmunológico (O'Shea *et al.*, 2004 citado por Schmid *et al.*, 2006), entre otros. La carne y la leche provenientes de los rumiantes poseen mayor cantidad de CLA que la de los monogástricos (Chin *et al.*, 1992) y el isómero predominante (aproximadamente el 80%) es el *cis* 9, *trans* 11 CLA (Fritsche; Steinhardt, 1998 citado por Schmid *et al.*, 2006), por lo tanto incrementar su concentración en estos alimentos beneficiaría la salud humana (AbuGhazaleh *et al.*, 2002).

La composición de los ácidos grasos en la carne y la leche de los rumiantes esta influenciada por factores genéticos y ambientales, dentro de los cuales, la dieta, es considerado el factor más importante (De Smet *et al.*, 2003 citado por Raes *et al.*, 2004). Por esto, las carnes de los sistemas pastoriles poseen mayores concentraciones de CLAs, una menor relación $\Omega 6$: $\Omega 3$ como también un incremento en la relación AGPI: AGS (Realini *et al.*, 2004 citado por Schmid *et al.*, 2006) mientras que, en las carnes provenientes de los sistemas de engorde a corral generalmente ocurre lo contrario (Latimori *et al.*, 2005). Estas diferencias son generadas por el tipo de alimentación, debido a que las pasturas poseen gran cantidad de ácidos grasos $\Omega 3$

(α -linolénico C18:3) mientras que el grano de maíz posee principalmente ácidos grasos Ω 6 (linoleico C18:2) (Marmor *et al.*, 1984 citado por Enser *et al.*, 1998). Estos lípidos dietarios al ingresar al rumen sufren un extensivo metabolismo (lipólisis y biohidrogenación) que influye sobre el perfil de ácidos grasos que quedan disponibles para la absorción y utilización en los tejidos. Para mejorar en los sistemas de engorde a corral los tres parámetros anteriormente mencionados, varios ensayos se condujeron con el objetivo de modificar la composición de los ácidos grasos del tejido animal. Este objetivo fue logrado por medio nutricional adicionando a las dietas aceites de semillas, productos marinos o forrajes (Raes *et al.*, 2004). La suplementación con AP incrementa la proporción de ácidos grasos Ω 3 de la dieta (Mansbridge; Blake, 1997), principalmente por el aumento de la concentración de dos componentes del aceite de pescado, el EPA y el DHA (Raes *et al.*, 2004). El AP aparentemente inhibe el último paso de la biohidrogenación ruminal de los ácidos linoleico y linolénico debido a que se observa un incremento en la producción del ácido vaccénico (*trans* 11 C18:1; VA) y una disminución en el contenido del ácido esteárico (C18:0) (Wachira *et al.*, 2000). El incremento de VA permitiría aumentar la síntesis de *cis* 9, *trans* 11 CLA por medio de la síntesis endógena que ocurre en los tejidos de los mamíferos (Harfoot; Hazlewood, 1988). La causa de esta incompleta biohidrogenación puede deberse a que el AP altera el ecosistema microbiano del rumen (AbuGhazaleh *et al.*, 2002). El aceite de lino también contiene altas concentraciones de ácidos grasos Ω 3 ya que alrededor del 53% del total de ácidos grasos está constituido por ácido linolénico (Raes *et al.*, 2004). Loo *et al.* (2005) evaluaron el fluido ruminal en animales a los que se les adicionó tres tipos de aceites (girasol, lino y pescado). Si bien el C18:0 disminuyó en todas las dietas, la menor concentración se logró con el aceite de pescado. Donovan *et al.* (2000) suplementando vacas lecheras con aceite de pescado demostró que se incrementaron las concentraciones de CLA, VA y ácidos grasos Ω 3

en la grasa de la leche. Ofreciendo aceite de lino a vacas lecheras se incrementó sustancialmente el contenido de CLA y ácidos grasos $\Omega 3$ en la grasa de la leche comparada con aquellos animales no suplementados con aceite (Dhiman *et al.*, 2000).

La adición de lípidos en la dieta de los rumiantes puede interferir con la fermentación ruminal, generando una menor proporción de ácidos grasos volátiles (AGV) y modificaciones en la relación acético: propiónico (A:P). Además, puede afectarse el metabolismo de la proteína, como así también el consumo y las poblaciones microbianas. Estos efectos son variables de acuerdo al tipo y cantidad de lípido presente en las dietas (Jenkins, 1993), a lo que debe sumarse, las condiciones generadas en el ambiente ruminal que pueden hacer variar las vías de biohidrogenación alterando los productos formados (Bauman *et al.*, 2003).

En el presente trabajo se realizara una verificación de si la inclusión de aceite de lino al 5% de la ración y de la acción conjunta del aceite de lino al 5% y del aceite de pescado al 1% de la ración es condición necesaria para incrementar la concentración de *trans*- 11 C18:1 en rumen y en sangre. Además se evaluarán los efectos sobre el consumo, el ambiente ruminal (pH, N-NH₃, AGV, protozoos), la digestibilidad de la dieta y el comportamiento ingestivo.

1.1. Hipótesis del trabajo

Las raciones suplementadas con aceites con respecto a la ración sin adición de aceites:

- Debido a que la adición de aceites pueden influir sobre la fermentación ruminal, la liberación de hormonas, la motilidad del intestino, aceptabilidad de la dieta y la oxidación de las grasas en el hígado se podría esperar una disminución del consumo de materia seca

- El empleo de aceites con altas proporciones de ácidos grasos $\Omega 3$ permitiría un incremento de los mismos en rumen y sangre. A su vez, un aumento de la concentración de CLA y sus precursores en rumen y sangre debido a la acción del aceite de pescado sobre el aceite de lino.
- El efecto toxico de los aceites sobre los protozoos provocaría una disminución de su presencia en el liquido ruminal lo cual disminuye la proteólisis de la proteína bacteriana provocando una menor concentración de $N-NH_3$
- Debido a que los aceites empleados se encuentran dentro de los porcentajes recomendados no se afectaría la digestibilidad de la dietas

1.2. Objetivos del trabajo

- Incrementar la concentración de ácidos grasos $\Omega 3$ mediante la inclusión de 2 aceites ricos en estos componentes mejorando la relación $\Omega 6$: $\Omega 3$ de las raciones ofrecidas.
- Verificar si el porcentaje de aceite de pescado utilizado permite incrementar la concentración de trans 11 C18:1 debido a su efecto inhibitorio sobre el último paso de la biohidrogenación del ácido linolénico.
- Caracterizar el ambiente ruminal generado por la inclusión de los aceite de lino y lino+pescado.
- Evaluar la digestibilidad de las dietas, el consumo y el comportamiento ingestivo.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Uso de lípidos en las dietas de los rumiantes

Debido a la creciente demanda de los consumidores por alimentos cada vez más sanos, se han realizado estudios para manipular la composición de los ácidos grasos de la carne y la leche, permitiendo incrementar la concentración de los ácidos grasos poliinsaturados, particularmente los $\Omega 3$ (mejorando la relación $\Omega 6: \Omega 3$) como así también el ácido linoleico conjugado (CLA). Ambos son afectados a medida que los sistemas de producción se intensifican. En estos sistemas dichos parámetros pueden revertirse, incorporando en las dietas aceite de pescado (rico en EPA y DHA), aceite de lino y /o forrajes (Raes *et al.*, 2004).

Los rumiantes en terminación sobre pasturas presentan una relación $\Omega 6: \Omega 3$ con valores de 2 o menores, mientras los que son alimentados a base de concentrados la relación ronda entre 6-10 (Yang *et al.*, 2002).

Las fuentes de lípidos en la dieta de los rumiantes provienen de los forrajes y los concentrados, los primeros contienen de 4 a 6% de extracto etéreo en la materia seca (MS) de los tejidos de las hojas y en general se encuentran en forma de glicolípidos (Harfoot, 1981). Los alimentos concentrados (granos) poseen mayor cantidad de lípidos y la mayoría se presenta en forma de triacilglicéridos (Bauman *et al.*, 2003). Los forrajes contienen altas concentraciones de ácido linolénico (18:3; *cis* 9, *cis* 12, *cis* 15), mientras que el ácido linoleico (18:2; *cis* 9, *cis* 12) es el ácido graso predominante en los granos de cereales y semillas. Una excepción es la semilla de lino donde el ácido graso principal es el linolénico.

Los lípidos que ingresan al rumen sufren un extensivo metabolismo que impacta sobre el perfil de los ácidos grasos que quedan disponibles para la absorción y utilización de los tejidos. Los principales procesos que ocurren en el rumen son la hidrólisis de las uniones ésteres de los lípidos y la biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados.

2.1.1. Hidrólisis

El paso inicial en el metabolismo de los lípidos es la hidrólisis de las uniones ésteres que se encuentran en los triacilglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos por medio de la acción principalmente de las bacterias ruminales y con poca evidencia del rol de los protozoarios, hongos y la saliva o las lipasas de las plantas. La hidrólisis de los lípidos es extracelular, y el glicerol y los azúcares liberados son rápidamente metabolizados por las bacterias ruminales que son convertidos en AGV (principalmente propiónico y butírico) (Doreau; Ferlay, 1994). *Anaerovibrio lipolytica* es la responsable de hidrolizar los triacilglicéridos y *Butyrivibrio fibrisolvens* los fosfolípidos y los glicolípidos (Harfoot; Hazlewood, 1997).

Aunque la extensión de la hidrólisis es alta (>85%), se han identificado un gran número de factores que afectan su tasa y extensión. La misma se reduce a medida que aumenta el nivel de grasa en la dieta (Beam *et al.*, 2000); también se ve afectada por el uso de ionóforos y la disminución del pH ruminal debido a que inhiben la actividad y el crecimiento de las bacterias (Demeyer; Doreau, 1999).

2.1.2. Biohidrogenación

Los ácidos grasos son rápidamente hidrogenados por los microorganismos del rumen a productos finales más saturados (Jenkins, 1993).

Las bacterias del rumen involucradas en la biohidrogenación han sido clasificadas en dos grupos, A y B, basadas en su vías metabólicas (Kemp; Lander, 1984). Para la completa biohidrogenación de los AGPI, las bacterias de ambos grupos generalmente son requeridas. A pesar de que el grupo A contiene varias bacterias que pueden hidrogenar los AGPI hacia los ácidos grasos *trans* C18:1, sólo unas pocas especies caracterizadas como grupo B pueden hidrogenar ácidos grasos *trans* C18:1 hasta el ácido esteárico (Harfoot; Hazlewood, 1997). Esta característica de la biohidrogenación explica porque al incrementar los AGPI en el alimento, simultáneamente causa un incremento de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y una disminución de la concentración de los AGS (Fellner *et al.*, 1995).

Todos los factores que afectan la hidrólisis también impactan sobre la biohidrogenación. Los principales sustratos son los ácidos linoleico y linolénico y su tasa de hidrogenación es del 70 al 95% y del 85 al 100% respectivamente. Esta tasa se incrementa a medida que aumenta el grado de insaturación (Doreau; Ferlay, 1994; Beam *et al.*, 2000).

2.1.2.1. Biohidrogenación del ácido linoleico

El ácido linoleico (*cis* 9, *cis* 12 C18:2) es primero isomerizado hacia *cis* 9, *trans* 11 CLA por medio *cis* 12, *trans* 11 isomerasa y luego hidrogenado por *Butyrivibrio fibrisolvens* hacia VA (*trans* 11 C18:1) en el rumen (Kepler; Tove, 1967). Este paso inicial ocurre rápidamente. La hidrogenación de VA hacia ácido esteárico involucra a diferentes grupos de organismo (grupo B) y ocurre a una tasa lenta (Griinari *et al.*, 1997; Harfoot; Hazlewood, 1997) provocando que el VA normalmente se acumule en el rumen.

2.1.2.2 Biohidrogenación del ácido linolénico

El ácido α linolénico (*cis* 9,*cis* 12, *cis* 15 C18:3) en el rumen sufre una isomerización inicial hacia un trieno conjugado (*cis* 9,*trans* 11, *cis* 15 C18:3) seguido por una reducción de las doble ligaduras en los carbonos 9, 15 y 11 para producir los ácidos grasos *trans* 11, *cis* 15 C18:2, *trans* 11 C18:1 y C18:0 respectivamente, pero no el *cis* 9, *trans* 11 CLA, como intermediario (Wilde; Dawson, 1966). Kraft *et al.* (2003) hipotetizaron que el ácido α linolénico es el precursor indirecto de otro CLA (*trans* 11, *cis* 13). La vía de *trans* 11, *cis* 15 hacia *trans* 11, *cis* 13 todavía es desconocida.

Durante la biohidrogenación de los AGPI se producen varios compuestos intermedios que son absorbidos e incorporados en los tejidos de los rumiantes. Las diferentes fuentes de lípidos que se incorporan en las dietas además de las condiciones generadas en el ambiente ruminal (el más importante el pH) pueden alterar las vías de biohidrogenación cambiando la producción de los ácidos grasos intermedios y los productos finales formados (Bauman *et al.*, 2003).

2.2. Formación e importancia del ácido linoleico conjugado (CLA)

Pariza *et al.* (1979) reportaron la presencia de sustancias antimutagénicas en la carne bovina cocida, siendo el CLA el ácido graso responsable de tales efectos (Ha *et al.*, 1987). El término CLA incluye un total de 28 isómeros (Collomb *et al.*, 2006), todos poseen dobles ligaduras con un átomo de carbono entre medio, en vez de la usual separación *metil-éster*. Estas dobles ligaduras pueden ser de configuración *trans* (*t*), *cis* (*c*) o puede existir un amplio espectro de isómeros con variaciones en las posiciones espaciales (7,9; 8,10; 9,11; 10,12 o 11,13) o geométricas (*c/c;c/t; t/t* o *t/c*) (Martin; Valeille, 2002).

La presencia de CLA en la grasa de la leche y en la carne de los rumiantes se debe a la isomerización y biohidrogenación, de los ácidos grasos insaturados y de la actividad de la delta nueve desaturasa ($\Delta 9$) de los tejidos (Bauman *et al.*, 2003). En un principio se consideraba que el CLA producido en el rumen era la fuente más importante de CLA, pero estudios recientes sugieren que la síntesis endógena del *cis* 9, *trans* 11 CLA en la glándula mamaria (Griinari *et al.*, 2000) o en la grasa subcutánea o intramuscular (Raes *et al.*, 2003) es la vía de producción primaria. La síntesis endógena del *cis* 9, *trans* 11 CLA involucra la acción de la $\Delta 9$ sobre el VA proveniente del rumen. Esta última sería la principal vía de acumulación de CLA en la leche bovina explicando entre un 64% a un 78% del CLA presente en la grasa de la leche (Griinari *et al.*, 2000). Del mismo modo, Knight *et al.* (2003) citado por Schmid *et al.* (2006) dedujeron que la desaturación del VA es la principal fuente de CLA en los lípidos de la carne basados en la alta correlación existente entre el CLA y VA.

Existen otros isómeros de CLA además del *cis* 9, *trans* 11 CLA que se encuentran en la grasa de los rumiantes y que constituyen una pequeña proporción del CLA total. Estos isómeros, cuando se presentan, abarcan <0,5% del total del CLA en la grasa de los rumiantes (Bauman *et al.*, 2003).

2.3. Modo de acción del aceite

El gran interés en los suplementos lipídicos como fuente de energía ha estimulado a testear una amplia variedad de fuentes (grasas y aceites) que permiten modificar el perfil de ácidos grasos generados en el rumen. Altos niveles de lípidos pueden afectar negativamente la fermentación microbiana ruminal, por lo tanto, la recomendación general es que la inclusión de lípidos no superen el 6 al 7% de la MS de la dieta (Jenkins, 1993).

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar cómo los lípidos interfieren con la fermentación ruminal. La teoría de la “capa de lípido” es la que mayor atención ha recibido, la cual al formar una película sobre las partículas de los alimentos reduce la fermentación al inhibir la digestión de la celulosa. El efecto detrimental de esta cubierta se debe a que impide el contacto entre las enzimas hidrolíticas de las bacterias con las partículas de alimentos (Cheng *et al.*, 1991). Además, los ácidos grasos agregados a cultivos puros de bacterias, inhiben el crecimiento microbiano y su metabolismo, demostrando el efecto antimicrobiano directo de los lípidos (Galbraith *et al.*, 1971; Henderson, 1973; Maczulak *et al.*, 1981).

Otras teorías se basan en que los lípidos modifican la población ruminal relacionada con la digestión de la celulosa o que reducen la disponibilidad de calcio necesario para la actividad microbiana.

Las fuentes de lípidos empleadas en ensayos incluyen a las semillas enteras y extrusadas, grasa amarilla, aceites, grasa animal y sales cálcicas de ácidos grasos entre otras. Los efectos que provocan la inclusión de estos componentes son variables y dependen, entre otros aspectos, a diferencias en su estructura lipídica. El grado de insaturación es un aspecto a tener en cuenta debido a que los ácidos grasos insaturados inhiben la fermentación de los hidratos de carbono en mayor medida que los ácidos grasos saturados (Chalupa *et al.*, 1984; Palmquist; Jenkins, 1980). Del mismo modo, mientras más larga sea la cadena del ácido graso, el mismo tiende a comportarse como un material inerte.

Además, debe considerarse la concentración de ácidos grasos insaturados libres en el rumen debido a que esta fracción es la que determina probablemente los efectos negativos sobre la fermentación más que otras fracciones (ácidos grasos saturados libres y triacilglicéridos). Altas concentraciones de lípidos en las dietas,

incrementa el contenido total de estos en el rumen (Jenkins, 1993). La concentración de ácidos grasos insaturados libres es regulada por la cantidad y tipo de lípido suministrado y también por las tasas de hidrólisis, biohidrogenación y formación de sales de Ca. El grado de formación de sales de Ca depende de la solubilidad del Ca dietario, del contenido de lípido en la dieta, del pH ruminal, del largo de la cadena y del grado de saturación de los ácidos grasos (Jenkins; Palmquist, 1982; Palmquist *et al.*, 1986). La composición de la dieta basal también influye sobre la manera en que la fuente de lípido afecta la fermentación ruminal. El consumo de dietas con altos niveles de concentrados (almidón) comparadas con dietas altas en forrajes, a menudo reducen la hidrólisis y biohidrogenación, debido a una disminución en el pH ruminal (Kucuk *et al.*, 2001).

2.3.1. Efectos generados por los aceites

La inclusión de aceite en las dietas puede provocar varios efectos entre los cuales se incluyen:

- Disminución de los protozoos ciliados del ecosistema ruminal. La presencia de los protozoos ciliados en el ecosistema del rumen está asociado con un incremento en el reciclaje del nitrógeno microbiano (Jouany, 1996) reduciendo el suministro de aminoácidos hacia el intestino (Veira *et al.*, 1984). Además, los protozoos ciliados contribuyen significativamente en la producción de metano (Hegarty, 1999) y la pérdida asociada de energía (Blaxter; Claperton, 1965). Actualmente, no hay agentes anti-protozoos comercialmente disponibles, pero los aceites agregados a las dietas de los rumiantes son tóxicos para los protozoos (Newbold; Chamberlain, 1988). La defaunación también está asociada con un bajo y más variable pH (Veira *et al.*, 1983), debido a que ejercen un efecto estabilizante del

pH. Este hecho se debe a la rápida ingestión y almacenado del almidón por parte de los protozoos, evitando la fermentación bacteriana (Williams; Dinusson, 1973 citado por Ivan *et al.*, 2001).

- La digestión de los carbohidratos estructurales puede reducirse un 50% o más al agregar menos del 10% de lípido en la dieta (Ikwuegbu; Sutton, 1982; Jenkins; Palmquist 1984), acompañada de una menor producción de metano, hidrógeno, ácidos grasos volátiles y una disminución en la relación A:P (Chalupa *et al.*, 1984).

- Los carbohidratos no estructurales son menos afectados en su digestibilidad por los lípidos dietarios. Brooks *et al.* (1954) reportaron una normal digestión del almidón en el rumen del ganado que fue alimentado con grasa adicional aún cuando el consumo o la digestibilidad de la fibra fue disminuida.

- El metabolismo de la proteína también es afectado cuando la suplementación lipídica interfiere con la fermentación ruminal. La infusión con aceite de lino en el rumen de ovejas provocó una disminución de la digestión de la proteína, provocando una menor concentración N-NH₃ y un incremento en el flujo de N hacia el duodeno. La defaunación está asociada con una disminución de la concentración de amonio en el rumen y un incremento en el flujo de aminoácidos hacia el intestino para su absorción y utilización por parte del hospedante (Kayouli *et al.*, 1986 citado por Ivan *et al.*, 2001). La eficiencia de la síntesis microbiana se incrementa debido a la reducción del número de protozoos, generando cambios en la digestión de la proteína (Jenkins, 1993).

2.4. Aceite de lino

El aceite de lino contiene altas concentraciones de ácido linolénico (más del 50% del total de ácidos grasos), le siguen en importancia la semilla de colza y canola que contienen alrededor de un 7 y 11% de linolénico respectivamente, mientras que el aceite de soja y el de germen de trigo alrededor de un 7%. Aunque el aceite de semilla de colza y soja contienen sustanciales cantidades de linolénico, la relación $\Omega 6:\Omega 3$ de estos aceites es alta debido a la presencia de grandes cantidades de ácido linoleico por lo que su inclusión en las dietas tendrían un bajo impacto para incrementar el contenido de $\Omega 3$ en la grasa de la carne o leche (Raes *et al.*, 2004). La relación $\Omega 6:\Omega 3$ de la semilla de colza es de 2,5 mientras que la del aceite de lino es de 0,30.

Tanto el contenido de CLA como el de los ácidos grasos $\Omega 3$ fueron incrementados en la grasa de la leche cuando se suplementó con aceite de lino a vacas lecheras comparada con aquellos animales no suplementados con aceite (Dhiman *et al.*, 2000). La suplementación con aceite de lino disminuyó la digestión ruminal en ovejas, acompañada por una disminución en el número de protozoos (Ikwuegbu; Sutton, 1982; Sutton *et al.*, 1983).

La hidrogenación de los ácidos linoleico y linolénico en el rumen ronda los 85 y 90% y su extensión puede disminuir por el consumo de dietas ricas en concentrados (Doreau; Ferlay, 1994). Bajo estas circunstancias, el incremento de disponibilidad del aceite de lino podría causar una carga adicional sobre la normal digestión ruminal. Ueda *et al.* (2003) demostraron que con dietas ricas en concentrados había un incremento en vez de una disminución en la digestibilidad del tracto total a pesar de la disminución en la digestibilidad ruminal de la fibra. Lo cual implica que la digestión en el intestino delgado compensa la disminución de la digestión de la fibra en el rumen cuando a dietas altas en concentrados se le adicionó aceite de lino. El mismo autor

observó que la compensación fue total a un nivel de 3%. Varios autores (Ikuwuegbu; Sutton, 1982; Sutton *et al.*, 1983) mostraron la digestión “compensatoria” de la MO y de la fibra en el intestino cuando la digestibilidad ruminal disminuyó por el agregado del aceite de lino. Faichney *et al.* (2002) también demostraron que la digestión del intestino parcialmente compensó el efecto negativo de los lípidos insaturados sobre la digestión ruminal. Ikuwuegbu y Sutton (1982) observaron que la compensación del intestino fue total a un nivel de 2,2% de aceite de lino pero no al 6,6%.

2.5. Aceite de pescado

La alimentación con aceite de pescado incrementa el contenido total de $\Omega 3$ de la grasa intramuscular por el alto suministro dietario de AG $\Omega 3$ debido a la presencia de EPA y DHA. Para lograr estos incrementos en los tejidos de los bovinos se requiere que considerables cantidades de estos ácidos grasos alcancen el intestino delgado lo cual es cierto en los animales monogástricos. En los rumiantes, la biohidrogenación del EPA y DHA parece estar limitada, aún cuando el aceite de pescado no esté protegido por intervenciones tecnológicas.

En general, los estudios han demostrado que cantidades equivalentes de aceite de pescado es más efectivo que los aceites vegetales para incrementar el contenido de CLA en la grasa de la leche (Chilliard *et al.*, 2001 citado por Collomb *et al.*, 2006).

El aceite de pescado es rico en AG de tipo C20-C22 incluyendo a los AG $\Omega 3$ como el eicosapentanoico (EPA, C20:5 $\Omega 3$) y docosahecanoico (DHA, C22:6 $\Omega 3$) (Gagliostro y otros, 2006). El grado en que ambos son biohidrogenados en el rumen todavía no ha sido dilucidado (Bauman *et al.*, 2003). Estudios *in vitro* sugieren que

estos ácidos sufren una pequeña biohidrogenación (Ashes *et al.*, 1992; Gulati *et al.*, 1999). Los estudios *in vivo*, indican que estos ácidos son biohidrogenados aunque en menor extensión que los ácidos linoleico y linolénico (Chilliard *et al.*, 2000; Wachira *et al.*, 2000; Scollan *et al.*, 2001).

El aceite de pescado parece causar una incompleta biohidrogenación de los ácidos grasos presentes en el rumen posiblemente por alterar el ecosistema de los microorganismos (grupo B) del rumen (AbuGhazaleh *et al.*, 2002). Estudios *in vitro* sugieren que el DHA sería el principal compuesto activo presente en el aceite de pescado que favorece la acumulación del *trans* C18:1 en el rumen, aunque el efecto del EPA es de menor magnitud con respecto al DHA, no debe descartarse (Abughazaleh; Jenkins, 2004).

En conclusión, la biohidrogenación limitada de ambos permite que se encuentren disponibles para la incorporación en los tejidos (Raes *et al.*, 2004) Se han conducido numerosos ensayos para demostrar el efecto del aceite de pescado, dentro de los cuales AbuGhazaleh *et al.* (2001) evaluó el efecto del reemplazo de la soja por aceite de pescado (0, 25, 50 y 100%) sobre los perfiles de ácidos grasos en leche, especialmente CLA, VA y Ω 3 y determinó que todos aumentaron a medida que se incrementaba la concentración de aceite de pescado

Varios autores (Chouinard *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 1998; Dhiman *et al.*, 2000; Donovan *et al.*, 2000) usaron aceite de soja, girasol, lino, maní y pescado para incrementar la producción ruminal de VA y posteriormente el contenido de *cis* 9 *trans* 11 CLA en leche. El aceite de pescado fue más eficiente que los otros aceites vegetales poliinsaturados en incrementar la concentración del ácido vaccénico en leche, aún cuando el aceite de pescado posee pequeñas cantidades de los

precursores primarios (ácido linoleico y linolénico) del ácido vaccénico (Offer *et al.*, 1999; Whitlock *et al.*, 2002).

Posteriormente, AbuGhazaleh *et al.* (2002) experimentaron con aceite de pescado con y sin el agregado de soja extrusada (fuente de ácido linoleico) en dietas de vacas lecheras y observaron que la mezcla de ambos permitió un mayor incremento del *cis* 9 *trans* 11 CLA y VA en leche que agregando cada uno de los componentes por separado, por lo tanto, la presencia de esta fuente de ácido linoleico amplificaría el efecto del aceite de pescado (AbuGhazaleh; Jenkins, 2004).

La máxima concentración de *trans* 11 C18:1 y de CLA en leche se obtendría con aportes de aceite de pescado del orden del 2% del consumo total de materia seca de la vaca (Baer *et al.*, 2001). La cantidad de aceite de pescado puede incluso reducirse al 1% en caso de efectuar suplementaciones combinadas con otros aceites o semillas oleaginosas que aporten ácido linoleico (Ramaswamy *et al.*, 2001).

2.6. Efecto sobre el consumo

Generalmente el consumo de MS disminuye cuando las fuentes lipídicas reemplazan a los carbohidratos como fuente de energía en las dietas (Gagliostro; Chilliard, 1991)

La mayoría de los lípidos suplementados frecuentemente disminuyen la digestibilidad de la dieta basal cuando ellos no se encuentran protegidos en el rumen (Chilliard, 1993). Los mecanismos por los cuales los lípidos producen depresión en el consumo no están claros, pero involucran efectos de estos sobre la fermentación ruminal, la liberación de hormonas, la motilidad del intestino, aceptabilidad de la dieta y la oxidación de las grasas en el hígado. La respuesta sobre el consumo a la adición

de ácidos grasos depende del contenido de ácidos grasos de la dieta basal y del tipo de ácidos grasos adicionado (Allem, 2000). La capa lipídica que se produce por el agregado de los lípidos provoca una disminución en la fermentación de la fibra. Este efecto genera una disminución en la tasa de pasaje, incrementando el llenado y la distensión ruminal, los cuales afectan la estimulación de los receptores de tensión en el retículo-rumen reduciendo el consumo de MS (Allen, 2000).

Las fuentes de grasa empleadas en los experimentos incluyen a los aceites, semilla extrusada y enteras, grasa amarilla, grasa amarilla hidrogenada, grasa animal, grasa animal parcialmente hidrogenada y sales cálcicas de AG. Éstas varían en sus características físicas y químicas afectando su digestibilidad así como también los efectos asociativos sobre la digestibilidad de la MS de la dieta y posiblemente en el consumo (Choi; Palmquist, 1996).

El grado de instauración es probablemente la característica más importante que afecta la digestión. Los ácidos grasos saturados son menos digestibles que los insaturados, además a medida que se incrementa el largo de la cadena se incrementa la digestibilidad, aunque este efecto es menos importante que el grado de instauración (Grummer, 1995). A medida que se incrementa la proporción de ácidos grasos insaturados en la fuente lipídica, generalmente el consumo de MS disminuye (Allem, 2000).

Mientras que la mayoría de los estudios remarcan una reducción en el consumo de MS cuando se suplementa con fuentes lipídicas (Allem, 2000; Jenkins; Jenny, 1989), Pantoja *et al.* (1996) reportaron un incremento en el consumo de MS, lo cual podría deberse a que la adición de lípidos produce un menor incremento calórico en los períodos de stress calórico y/o una disminución de la inhibición del propiónico

sobre el consumo de MS cuando el grano es sustituido por una fuente lipídica (Allem, 2000).

Se encontraron disminuciones en el consumo cuando se agregaron cantidades crecientes de aceites de soja (0, 2, 4, 6 y 8% de la MS) (Bateman; Jenkins, 1998) mientras que Loo *et al.* (2004) adicionando 5% de aceite de girasol, 5% de aceite de lino o 2,5% de aceite de pescado no encontró diferencias en el consumo de MS. Del mismo modo, Donovan *et al.* (2000) suplementando con aceite de pescado no encontraron diferencias en el consumo de MS entre el testigo y con el nivel del 1% de aceite de pescado, mientras que con los niveles del 2 y 3% de aceite de pescado disminuyó el consumo de MS.

2.7. Efecto sobre el ambiente ruminal

2.7.1. pH ruminal

El pH del rumen es el balance entre la capacidad buffer y la acidez o alcalinidad de los productos de la fermentación. La capacidad buffer alcalina no es tan grande como la capacidad buffer ácida (Church, 1993). Los problemas pueden estar dados cuando los animales no pueden regular el pH. Si la acidez se incrementa debido a dietas altas en granos pueden producir alteraciones ruminales acompañadas por disfunciones tales como acidosis y depresión en la grasa de la leche (Schwartz; Gilchrist, 1975; Davis; Brown, 1970). El incremento en la degradación del almidón genera un aumento en la concentración de AGV y por consiguiente una disminución en el pH ruminal (McCarthy *et al.*, 1989). Cuando la tasa de fermentación del almidón es superior a la tasa de absorción de los AGV producidos, la concentración de estos aumenta, provocando la disminución del pH.

La suplementación con fuentes lipídicas, reduce levemente la tasa de degradabilidad ruminal del almidón (Brandt, 1995), sin afectar la digestión total (Zinn, 1989). Esto a su vez reduciría la incidencia de acidosis y otros problemas metabólicos relacionados con la ingestión de altos niveles de concentrados (Brandt, 1995).

Ivan *et al.* (2001) reportaron que la adición de aceite de girasol provocó un pH más alto y más estable con respecto a la dieta control. Al suministrar grasa animal y aceite de soja saponificada al 3,5% se obtuvieron resultados similares (Bock *et al.*, 1991). Según estos autores el aumento de pH podría estar relacionado a diferencias en la tasa de dilución y tiempo de retención de sólidos. La menor concentración de AGV, causado por una menor disponibilidad de carbohidratos fermentecibles explican el aumento del pH ruminal cuando se suplementa con lípidos (Elliott *et al.*, 1997). En cambio, Ueda *et al.* (2003) no encontraron efecto de la suplementación con aceite de lino sobre el pH ruminal.

2.7.2. AGV totales y la relación acético:propiónico (A:P)

Los productos de la fermentación difieren según sea la composición de la dieta porque los distintos microorganismos tienen mayores afinidades y preferencias para digerir carbohidratos específicos. Las dietas a base de forraje son ricas en celulosa, con un contenido intermedio en azúcares solubles y pobre en almidón, por lo que son activas las bacterias celulolíticas resultando en producciones elevadas de acético. Con dietas ricas en almidón, por el contrario, la población bacteriana principalmente es amilolítica, por lo que producen mayores cantidades de propiónico en un ambiente con un pH más bajo. El consumo de dietas ricas en concentrados determina un cambio hacia mayor producción de propiónico en el rumen (Church, 1993).

La incorporación de fuentes lipídicas a las dietas pueden provocar disturbios en la fermentación ruminal, a medida que se incrementa el grado de instauración de los ácidos grasos se incrementa su digestibilidad y por lo tanto aumenta la probabilidad de que la fermentación ruminal se vea afectada (Jenkins, 1993). Las reducciones en el consumo de MS, porcentaje de grasa en la leche y digestión de la fibra ruminal son indicadores de que la fermentación fue afectada. La tasa a la cual los ácidos grasos son liberados de los alimentos y expuestos a los microorganismos ruminales determina el grado en que la fermentación es afectada. Si esta capacidad para saturar se ve excedida, los AGI pueden acumularse e interferir con la fermentación.

Ueda *et al.* (2003) no encontraron efecto de la suplementación con aceite de lino sobre la concentración de AGV totales en el fluido ruminal. A mayor cantidad de concentrado en la dieta disminuyó el contenido del ácido acético y se incrementó el ácido propiónico y en estas condiciones la suplementación con aceite de lino incrementó la proporción de propiónico. Del mismo modo, Ikwuegbu y Sutton (1982) reportaron un incremento de la producción de AGV totales cuando se suplementó con aceite de lino.

Onetti *et al.* (2001) reportaron que los AGV totales no fueron afectados por la suplementación con dos niveles (2 y 4%) de 2 tipos de grasa y aunque hubo una tendencia por una mayor concentración de AGV totales para el control que los tratamientos, esta diferencia no se mantuvo luego de 4 hs postalimentación. Se detectó una disminución de la proporción molar de acético, aumento del propiónico y disminución de la relación A:P cuando se suplementó con las fuentes lipídicas con respecto a la dieta control.

Bateman y Jenkins (1998) reportaron que la concentración total de AGV declinó a medida que se fue incrementando (0, 2, 4, 6 y 8% de la MS) el porcentaje de

aceite de soja en las dietas. Esta adición de aceite resultó en disminuciones lineales del contenido de ácido acético e incrementos del ácido propiónico de modo que la relación A:P declinó linealmente. Bateman *et al.* (1996) reportaron incrementos en la relación A:P cuando fuentes lipídicas fueron agregadas a dietas altas en FDN y disminuciones en la relación A:P cuando los lípidos fueron agregados en dietas bajas en FDN.

Machmueller *et al.* (1998) evaluaron el aceite de coco, semilla de colza, semilla girasol y harina de lino sobre la fermentación ruminal *in vitro*. Exceptuando la semilla de colza que redujo la cantidad de MO fermentada, ninguno afectó la proporción molar de AGV totales aunque si hubieron cambios en las proporciones de los AGV individuales. Una reducción en la relación A:P frecuentemente mejora la eficiencia de la utilización del alimento debido a que altas producciones de propiónico es asociando con una menor producción de metano y por lo tanto una menor pérdida de energía en forma de gas.

2.7.3. Nitrógeno amoniacal

La disminución en la concentración de amonio puede estar asociada a la disminución en las poblaciones de los protozoos en el rumen lo cual provoca el uso de aceites en las dietas (Williams; Coleman, 1992). Esta menor concentración de N-NH₃ puede deberse a la disminución de la proteólisis de la proteína bacteriana por los protozoos ruminales (Broderick *et al.*, 1991 citado por Hristov *et al.*, 2005).

La información respecto al efecto de la suplementación lipídica sobre la concentración de N-NH₃ es variable. La adición de aceite de lino generó un incremento de N-NH₃ (Ueda *et al.*, 2003), mientras que la suplementación con dos niveles (2 y 4%) de dos fuentes de lípidos disminuyó la concentración de N-NH₃ con respecto a la

dieta control (Onetti *et al.*, 2001). Del mismo modo, Bateman y Jenkins (1998) encontraron disminuciones en la concentración de $N-NH_3$ a medida que se incrementó el porcentaje de aceite de soja en las dietas.

Getachew *et al.* (2001) encontraron bajas concentraciones de nitrógeno amoniacal cuando sales de potasio fueron adicionadas lo cual podría deberse a un incremento en la toma de N para el crecimiento microbiano o una reducción en la degradación de la proteína. El crecimiento microbiano se incrementó cuando las fuentes lipídicas se agregaron (Ikwuegbu; Sutton, 1982; Machmueller *et al.*, 1998) lo cual sugiere que una menor concentración de nitrógeno amoniacal podría deberse a una toma de N más que a reducciones en la degradación de la proteína.

Al reemplazar isocalóricamente energía bajo la forma de almidón (grano), por energía bajo la forma de lípidos en la dieta de vacas lecheras se observó un aumento de la concentración de $N-NH_3$ lo que podría deberse al aumento en la relación proteína:energía, debido a que los ácidos grasos no aportan energía para las bacterias ruminales (DePeters; Cant, 1992).

2.8. Perfil de ácidos grasos en la leche y carne

La mayor demanda de los consumidores por aumentar el consumo de ácidos grasos insaturados, los cuales son más saludables que los ácidos grasos saturados, ha generado que se aumente el interés en la manipulación del perfil de ácidos grasos de la grasa de la leche (AbuGhazaleh *et al.*, 2001) y de la carne (Wachira *et al.*, 2002). La adición de fuentes lipídicas con ácido linoleico y linolénico como también aceite de pescado a dietas altas en concentrados permite lograr este objetivo. Sin embargo, todo el perfil de ácidos grasos es afectado y estos cambios dependen principalmente de la composición de los ácidos grasos con los que se suplementa que pueden

beneficiar la salud humana cuando se consigue una disminución de los AGS y un incremento en los AGPI con una disminución en la relación $\Omega 6: \Omega 3$ y un aumento en el contenido de CLA (Schmid *et al.*, 2006)

Al incrementar el suministro de ácidos grasos de cadena larga en la dieta se demostró que su secreción se incrementa en la grasa de la leche y se inhibe la síntesis de *novoo* de los ácidos grasos de media longitud (Grummer, 1991 citado por Dhiman *et al.*, 2000). Las proporciones de los ácidos grasos de C12:0, C14:0 y C16:0 disminuyeron en la grasa de la leche de las vacas alimentadas con aceite respecto al tratamiento control, y esta disminución fue proporcional a la cantidad de aceite presente en la dieta (Dhiman *et al.*, 2000). Cuando se adicionó aceite de pescado en la dieta, las proporciones de ácidos grasos de cadena corta aumentaron (C4:0 hasta C12:0) como así también los ácidos grasos de cadena larga provocando que la grasa de la leche fuera más insaturada (Donovan *et al.*, 2000). La presencia en la grasa de la leche de los ácidos grasos de cadena larga suministrados por la dieta va a depender de la extensión de la biohidrogenación que los mismos hayan sufrido en el rumen. Esto determina el perfil que va a quedar disponible para la absorción de los tejidos.

Entre los ácidos grasos saturados cabe mencionar que los ácidos láurico (C12:0) y mirístico (C14:0) elevan el colesterol total y el colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) juzgadas como aterogénicas (Scherezenmeir; Jagla, 2000). Mientras que el consumo de ácidos grasos de cadena corta a media (C4:0 a C10:0) no estaría asociado a riesgos de muerte por afecciones coronarias (Hu *et al.*, 1999). En tanto, el ácido esteárico (C18:0) es considerado como neutro (sin peligro) sobre la salud humana mientras que el ácido oleico (C18:1) es un protector contra la aterogénesis debido a sus propiedades benéficas sobre la composición de los lípidos plasmáticos.

La suplementación con aceites no solamente incrementa el contenido de CLA sino que modifica toda la composición de ácidos grasos del tejido adiposo. Las concentraciones de los ácidos grasos C18:1, C18:2, C18:3 se incrementan a medida que se eleva el consumo de los mismos. Sin embargo, debido a la biohidrogenación ruminal que sufren los ácidos grasos insaturados la concentración de los ácidos grasos saturados en el tejido podría incrementarse al mismo tiempo (Casutt *et al.*, 2000)

Enser *et al.* (1999) reportaron incrementos en los niveles de CLA en el músculo *longissimus lumborum* de novillos cuando los mismos fueron alimentados con un silaje de pastura más la adición de semilla de lino. Del mismo modo, Wachira *et al.* (2002) encontraron incrementos de CLA en el músculo *longissimus dorsi* cuando incluyeron semilla de lino. Estos resultados fueron coincidentes cuando se trabajó con ovejas, donde el incremento de CLA fue mayor cuando se empleó una mezcla de aceite de pescado más semilla de lino que este último componente suministrado solo (Demirel *et al.*, 2004).

2.9. Perfil de ácidos grasos en sangre

La variación de las concentraciones sanguíneas de carbohidratos, lípidos y proteínas, es el reflejo de cambios metabólicos experimentados por el animal en respuesta a diferentes causas; entre ellas la nutrición, debido a que el rumiante presenta particularidades derivadas de su naturaleza poligástrica (Annison; Bryden, 1998). El perfil lipídico sanguíneo del bovino es un reflejo de la dinámica funcional del animal, influenciada por el manejo nutricional, estado reproductivo y medio ambiente (Byers; Schelling, 1993).

Los ésteres colesteroles y los fosfolípidos son los principales componentes de los lípidos de la sangre y juntos explican alrededor del 95% del total de lípidos en el plasma de los animales rumiantes. Sin embargo, los triacilglicéridos y los ácidos grasos libres representan <5% y 1% respectivamente del total de lípidos del plasma. Los ácidos grasos poliinsaturados que escapan de la biohidrogenación ruminal son preferentemente esterificados y pasan a formar parte de los ésteres colesteroles y fosfolípidos del plasma. Los ésteres colesteroles y fosfolípidos tienen una lenta tasa de recambio, mientras que la fracción triacilglicérida y de los ácidos grasos libres tienen una rápida tasa de recambio y por lo tanto suministran los ácidos grasos necesarios para los tejidos tal como los de la glándula mamaria y el tejido adiposo (Christie, 1981). Por lo tanto, el perfil de los triacilglicéridos del plasma representa el perfil de los ácidos grasos disponibles para la glándula mamaria y el tejido adiposo (AbuGhazaleh *et al.*, 2003). Loo *et al.* (2002) investigando el efecto de la soja extrusada sobre el perfil de los ácidos grasos del plasma en vacas lecheras, detectaron que el ácido vaccénico se encontró exclusivamente en la fracción triacilglicérida del plasma. Las concentraciones de *trans* C18:1 en general y VA en particular fueron incrementadas en la fracción triacilglicérida del plasma cuando vacas lecheras fueron suplementadas con un 1% de aceite de pescado más un 2% de diferentes fuentes que variaron en el grado de saturación de C18 (oleico, linoleico y linolénico). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los distintos tratamientos con respecto a la concentración de CLA en la fracción triacilglicérida del plasma (AbuGhazaleh *et al.*, 2003).

3. MATERIALES Y METODOS

Con el objetivo de conocer el efecto de la inclusión en la ración de aceite de lino y de lino + pescado sobre el ambiente ruminal, los parámetros sanguíneos, el consumo y la digestibilidad de la almidón, FDN, MO y PB de los distintos tratamientos, se propuso el siguiente experimento.

3.1. Experimento

3.1.1. Sitio y período experimental

La experiencia se llevó a cabo en los corrales de metabolismo de la Unidad Integrada Balcarce (EEA INTA Balcarce-Fac. Ciencias Agrarias, UNMdP), provincia de Buenos Aires (37° 45' latitud S, 58° 18' longitud W, 130 m sobre el nivel del mar) desde el 20 de abril hasta el 12 de julio del 2007.

3.1.2. Tratamientos

Se establecieron 3 tratamientos:

- **C**: dieta sin inclusión de aceite
- **L**: dieta con 5% aceite de lino
- **L+P**: dieta con 5% aceite de lino + 1% aceite de pescado

La dieta control se formuló en base a grano de maíz entero, ensilaje de planta entera de maíz y expeller de girasol como suplemento proteico. Las proporciones de los constituyentes de la dieta control en los tratamientos L y L+P variaron debido a la inclusión de los aceites (cuadro 1).

Cuadro 1. Composición química de las dietas

Constituyentes (% MS)	Tratamientos		
	C	L	L+P
Grano maíz (%)	64,4	61	60
Silaje de maíz (%)	20,6	20	20
Expeller girasol (%)	15	14	14
Aceite lino (%)		5	5
Aceite pescado (%)			1

Las dietas resultaron en un 10 % de proteína bruta base materia seca. Durante el período de acostumbramiento las dietas fueron ofrecidas a voluntad para determinar el consumo de los animales. Este valor fue necesario durante el período experimental para minimizar los rechazos, permitiendo el consumo total del aceite. Las dietas se suministraron en dos entregas diarias (8:00 y 20:00 hs), las cuales fueron preparadas para cada tratamiento, en forma diaria.

3.1.3. Animales

Se utilizaron 3 novillos de $280 \pm 5\text{Kg}$ de peso al inicio del ensayo, canulados en rumen con aproximadamente 18 meses de edad.

3.1.4. Manejo de los animales

Los animales fueron alojados al azar, en corrales individuales para cada tratamiento y donde tuvieron acceso al agua a voluntad.

El ensayo constó de 3 etapas definidas:

Etapa de preacostumbramiento: Durante un mes, se les fue sustituyendo, a los animales, el heno de baja calidad por dosis crecientes de grano de maíz hasta llegar a las proporciones necesarias de los constituyentes de las dietas de cada tratamiento para la realización del experimento.

Etapa de acostumbramiento: Los animales recibieron la dieta correspondiente según el tratamiento asignado. En este período que abarcó 10 días, se evaluó el consumo de cada animal asegurándose un rechazo mínimo del 5%.

Etapa de medición: comenzó una vez finalizado el período de acostumbramiento y se extendió durante cinco días. Durante los tres primeros días se realizó el muestreo de materia fecal y antes del suministro de las raciones, en el tercer día, se procedió a la extracción de sangre de la vena yugular. En el cuarto día, previo al suministro de la dieta, se colectaron muestras para la determinación de protozoos y luego de proveer las raciones correspondientes a cada animal, se procedió al muestreo del ambiente ruminal (AGV (ácidos grasos volátiles), N-NH₃ (nitrógeno amoniacal), pH y del perfil de ácidos grasos del contenido ruminal. En el quinto día se registró el comportamiento animal.

Terminada la fase experimental de cada periodo se efectuó el pesaje de los animales y el vaciado del rumen de los mismos. Para acelerar el período de acostumbramiento, el contenido ruminal fue trasvasado a otro animal, según el tratamiento correspondiente al próximo período experimental.

3.1.5. Mediciones

Consumo de MS: se determinó por diferencia entre la MS ofrecida y la MS remanente en cada uno de los comederos individuales.

Comportamiento ingestivo: el comportamiento ingestivo animal consistió en el registro cada 5 minutos durante 24 horas corridas de las acciones de consumo y rumia de cada uno de los animales presentes en el ensayo. Se consideró descanso, al tiempo en el cual los animales no realizaron ninguna de las dos actividades anteriores.

Muestreo de materia fecal: la producción total de heces se obtuvo a través de la utilización de un marcador externo (óxido de cromo). Se suministraron 12 grs. del marcador a través de la cánula ruminal divididos en 2 aportes diarios (8:00 y 16:00 hs). Las muestras de heces fueron colectadas cada 6 horas durante tres días consecutivos. Cada día el horario del primer muestreo fue desplazado 2 horas de forma tal que la muestra final estuviera compuesta por sub-muestras obtenidas con intervalos de 2 horas (cuadro 2). Estas muestras fueron secadas a 60°C hasta peso constante. Luego fueron molidas con malla de 1 mm y se realizó una muestra compuesta por animal y por período. Posteriormente esta muestra fue subdividida en dos submuestras, una de las cuales fue enviada al laboratorio para determinación de cromo (Cr) por medio de espectrofotometría de absorción atómica (Williams *et al.*, 1962). La segunda muestra fue enviada al laboratorio para analizar MS (materia seca), MO (materia orgánica), PB (proteína bruta), almidón y FDN (fibra detergente neutra). El cálculo de producción total de heces se realizó de la siguiente manera: g Cr suministrado por día / concentración de Cr en heces. A partir de estos datos y utilizando la fórmula $(\text{consumo} - \text{heces}) / \text{consumo} * 100$ se obtendrá la digestibilidad aparente *in vivo* de la MS, MO, PB, almidón y FDN de la dieta.

Cuadro 2. Horarios de muestreo de materia fecal

D	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1	#			#			#			#		
2		#			#			#			#	
3			#			#			#			#

Muestreo de sangre: se procedió a la extracción de muestras de sangre de la vena yugular con el objetivo de evaluar sobre las mismas el perfil de ácidos grasos. Estas fueron colocadas en tubos que contenían EDTA como anticoagulante e inmediatamente fueron llevadas al laboratorio donde se centrifugaron en una centrifuga refrigerada a una velocidad de 4000 rpm y a una temperatura entre 4 a 6°C. El líquido sobrenadante (suero) fue almacenado en tubos ependorff, los cuales fueron congelados hasta su procesamiento según protocolo para la determinación del perfil de los ácidos grasos (anexo 1).

Muestreo de rumen: en la fase experimental se tomaron muestras de licor ruminal de la región dorso-caudal del rumen con el objeto de caracterizar el ambiente ruminal. Los horarios de muestreo fueron 0, 2, 4, 8 y 12 hs. post alimentación. En los mismos se procedió a la determinación del pH, AGV, N-NH₃ y del perfil de ácidos grasos del contenido ruminal.

El licor ruminal fue filtrado a través de tela de quesería y se determinó el pH mediante Peachímetro Digital Cole Palmer.

De éste licor ruminal, 40 ml fueron colocados en potes plásticos que contenían 8 ml de una solución ácida para detener cualquier tipo de proceso fermentativo. La solución acidificante se formuló mezclando: 72 grs. de ácido metafosfórico con 24,09 ml H_2SO_4 y 280 ml H_2O . Las muestras se conservaron a $-20^{\circ}C$ hasta ser analizadas. Posteriormente se procedió al descongelado de las muestras para su centrifugación, que se realizó en una centrifuga refrigerada a 9500 rpm y a una temperatura entre 4 a $6^{\circ}C$. El líquido sobrenadante de cada una de las muestras, fue almacenado en cuatro tubos ependorff, los cuales fueron nuevamente congelados. Dos tubos de cada muestra fueron empleados en la determinación de los AGV y los tubos restantes se utilizaron para la determinación de $N-NH_3$ ruminal.

La concentración de AGV se determinó por cromatografía de fase gaseosa (Varga; Prigge, 1982), en un cromatógrafo de gas, Shimadzu, modelo GC-14, con un integrador Shimadzu, C-R6A, columna de vidrio 2x2 mm de diámetro interno, rellena con cromosorb AW, 10% polyetilen glicol adipato y 3% H_3PO_4 (ácido fosfórico). Las temperaturas fueron $155^{\circ}C$, $185^{\circ}C$ y $190^{\circ}C$ para la columna, inyector y detector respectivamente. Los flujos de gases para el gas nitrógeno, hidrógeno y aire fueron 50, 30 y 300ml/min respectivamente. Se utilizó el ácido 2 metil valérico como estándar interno.

Para la determinación de $N-NH_3$, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y diluidas en una relación 18:2 (agua destilada: licor ruminal). Posteriormente, se determinó la concentración de nitrógeno amoniacal mediante autoanalizador Kjeltec 1030, de Tecato®, modelo 2 (1970).

Para la determinación del perfil de ácidos grasos del rumen, se tomaron aproximadamente 500 grs. del material ruminal completo de la región dorso-caudal del rumen. Este material fue guardado tal cual, en bolsas de plástico a los que se les agregó 100 ml de licor ruminal. Las muestras se conservaron a $-20^{\circ}C$, luego se

procedió a la liofilización del material. Estas muestras fueron molidas en malla de 1mm y a las cuales se les realizó el procedimiento de metilación directa modificado para la determinación del perfil de ácidos grasos (anexo 2).

Muestreo de Protozoarios: para este muestreo se preparó una solución (verde de metilo -formaldehído-solución fisiológica) conservante para protozoos que fija, tiñe y permite el almacenado de ciliados ruminales, para su posterior identificación. La solución se formuló con los siguientes componentes:

35% solución formaldehído	100 ml
Agua destilada	900 ml
Verde de metilo	0.6 g
NaCl	8.0 g

Previo al suministro de la ración se extrajeron 20 ml de licor ruminal filtrado a través de la tela de quesería a los que se les adicionó 100 ml de la solución previamente preparada para protozoos. La mezcla se agitó para lograr su homogeneización y se conservó en heladera y en completa oscuridad hasta el envío de las muestras al laboratorio.

Mediciones en los alimentos: al inicio de cada período experimental se tomó una muestra de cada uno de los componentes de la dieta y se determinaron los siguientes parámetros:

- Materia Seca (MS), mediante el secado en estufa a 60° C con circulación de aire durante 48 hs hasta peso constante.

- Nitrógeno total (NT) mediante equipo LECO modelo FP 528 (Horneck; Miller, 1998).
- Fibra detergente neutro (FDN) con equipo ANKOM ²⁰⁰ (http://www.ankom.com/09_procedures/procedures.shtml).
- Materia orgánica (MO) y cenizas: por muflado de las muestras a 600 °C.
- Digestibilidad *in vitro* de la MO mediante incubador Daisy de ANKOM (http://www.ankom.com/09_procedures/procedures.shtml).
- Almidón (Mac Rae; Armstrong, 1968).
- pH de las muestras de silo. Se coloca en una licuadora 20 g de silaje (peso húmedo) y 100 ml de agua destilada, se tritura el material y en el líquido filtrado se procede a la determinación del pH mediante un peachímetro combinado.

3.1.6. Diseño Experimental y Análisis Estadístico

El consumo, los perfiles de ácidos grasos en sangre, el recuento de protozoos y la digestibilidad de la MO, FDN, PB y almidón de la dieta se analizaron mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS, 1998) dentro de un diseño de cuadrado latino 3x3.

El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \rho_i + \gamma_j + \zeta_k + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : observación de la unidad experimental en el i -ésima fila y la j -ésima columna del diseño,

μ : media general,

ρ_i : efecto del i -ésima fila (período),

γ_j : efecto del j-ésima columna (animal),

ζ_k : efecto del k-ésimo tratamiento,

e_{ij} : error experimental.

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, cuando la posibilidad del error fue menor al 5%.

Mientras que los perfiles de ácidos grasos en el rumen, el ambiente ruminal (pH, N-NH₃, AGV) y el comportamiento ingestivo (rumia y consumo) generados por las dietas se analizaron como medidas repetidas en el tiempo mediante el procedimiento PROC MIXED de SAS dentro de un diseño de cuadrado latino 3x3.

El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \rho_i + \gamma_j + \zeta_k + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : variable respuesta de la k-ésima observación correspondiente al i-ésimo tratamiento y al j-ésimo horario,

μ : media general,

ρ_i : efecto del i-ésimo tratamiento sobre la variable respuesta,

γ_j : efecto del j-ésimo horario sobre la variable respuesta,

ζ_k : efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento con el j-ésimo horario sobre la variable respuesta,

e_{ij} : error experimental.

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, cuando la posibilidad del error fue menor al 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Características químico-biológicas de los alimentos

En el cuadro 3 se presentan los valores de composición química y la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica del grano de maíz entero, del silaje de planta entera de maíz y del expeller de girasol. El porcentaje de proteína bruta del expeller de girasol estuvo dentro de los valores normales. En coincidencia la FDN del silaje de maíz se encontró dentro de los parámetros estándares mientras que el alto porcentaje de almidón estaría indicando un buen contenido de granos en el ensilaje.

Cuadro 3. Características químico- biológicas de los componentes de la dieta.

	Silaje de Maíz ¹	Grano maíz	Expeller girasol
Materia seca (MS) (%)	34,7	90,8	90,4
Materia orgánica (MO) (%)	94,27	94,2	87,8
DIVMO ² (%)	71,7	89,4	69,4
Proteína bruta (PB) (%)	8,20	6,8	30,2
FDN ³ (%)	40,20	8,5	39,2
CNES ⁴	13,47	10,8	8,4
Almidón (%)	28,57	76	0,5
Extracto etéreo (EE) (%)	2,7	4,2 ⁵	2,0

¹ Promedio de los tres períodos.

² **DIVMO**: Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica.

³ **FDN**: Fibra detergente neutra.

⁴ **CNES**: Carbohidratos no estructurales.

⁵ Valor NRC 2001.

La composición calculada de las dietas utilizadas para cada uno de los tratamientos se observa en el cuadro 4. Las dietas fueron isoproteicas (10,6; 10,02; 9,95 % de PB para los tratamientos C, L y L+P respectivamente) pero no isoenergéticas por la adición de los aceites. En los tratamientos L y L+P la cantidad de almidón disminuyó por la menor proporción del grano de maíz. La cantidad de silaje de planta entera de maíz no varió proporcionalmente en las dietas, por lo tanto la disminución en el contenido de MS solamente estuvo asociada a la adición de los aceites. Debido a que no se realizó la determinación del valor de EE para el grano de maíz se empleó tanto para el cálculo del EE como para la EM (energía metabolizable) el valor mencionado por el NRC de 4,2%.

Cuadro 4. Porcentaje de materia seca, composición química estimada y concentración energética de las raciones experimentales.

	C	L	L+P
Materia seca (MS) (%)	79,2	75	74,09
Materia orgánica (MO) (%)	93,25	88,61	87,67
DIVMO (%)	82,75	78,58	77,68
Proteína bruta (PB) (%)	10,6	10,02	9,95
FDN (%)	19,64	18,71	18,63
CNES	10,99	10,46	10,35
Almidón (%)	54,9	52,14	51,38
Extracto etéreo (EE) (%)	3,56	8,38	9,34
EM (Mcal/Kg MS) ¹	2,99	3,31	3,37

¹ EM (Mcal/Kg MS): Energía metabolizable.

En el cuadro 5 se detalla el perfil de ácidos grasos de los aceites de lino, pescado y del silaje de planta entera de maíz. Del total de ácidos grasos presentes en el aceite de lino el ácido linolénico representó un 51,53 % mientras que, en el aceite de pescado, los dos componentes más importantes, el EPA y el DHA, alcanzaron porcentajes de 8,21 y 15,54 % respectivamente. En el silaje, el principal ácido graso presente fue el esteárico (C18:0) que alcanzó un 34,93% y en segundo lugar de importancia se encontró el linoleico (C18:2) con un 15,62% del total de ácidos grasos.

La relación $\Omega 6:\Omega 3$ varió entre 0,30; 0,21 y 31,02 para el aceite de lino, pescado y el silaje de planta entera de maíz respectivamente.

Cuadro 5. Perfil de ácidos grasos de los aceites de lino, pescado y silaje de maíz.

Ácidos grasos	Aceite lino ¹	Aceite pescado ¹	Silaje de Maíz ¹
(% AG totales)			
C14:0	0,11	3,46	1,20
C16:0	6,40	18,48	18,02
C16:1	0,23	7,32	0,26
C18:0	5,02	3,32	34,93
C18:1	19,32	23,34	9,84
C18:2	15,15	1,99	15,65
C18:3	51,53	1,26	0,06
C20:0	0,15	0,38	13,38
CLA	0,20	.	.
C20:5 EPA	.	8,21	0,30
C 22:6 DHA	0,23	15,54	0,25
AGS	11,97	27,57	69,42
AGMI	19,71	32,05	12,35
AGPI	67,50	32,84	16,97
Ω3	51,64	27,19	0,53
Ω6	15,66	5,65	16,44
Otros	1,65	16,68	6,24

¹ Promedio de los tres períodos.

4.2. Consumo de MS

En el cuadro 6 se observan los valores promedios de consumo de MS, lípidos y de energía para todos los tratamientos. Se obtuvieron diferencias significativas en el consumo de MS, el consumo de lípidos y de energía metabolizable ($p > 0,05$). El mayor consumo promedio de MS lo presentó el tratamiento C mientras que para L y L+P se registró una disminución del 28,6 y 24,3 % respectivamente. En el consumo de lípidos se registro un incremento del 66% y del 100% para el tratamiento L y L+P con respecto a C. Mientras que el mayor consumo de energía se registro para el tratamiento C

Cuadro 6. Consumo de MS, lípidos y energía metabolizable de los novillos fistulados alimentados con C, L y L+P.

	C	L	L+P	p=	EEM ¹
Consumo MS (kg/an/día)	7,62 (a)	5,44 (b)	5,77 (b)	<,001	0,19
Consumo de lípidos (kg/an/día)	0,27(a)	0,45(b)	0,54(c)	<,001	0,01
Consumo de energía (Mcal/an/día)	22,78(a)	17,99(b)	19,46(b)	<,001	0,62

Valores con letras distintas en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

1 **EEM**: Error estándar de la media.

4.3. Digestibilidad in vivo

En el cuadro 7 se observa la digestibilidad del almidón, de la FDN, de la MO y de la PB de la dietas C, L y L+P. No se detectaron diferencias significativas entre las

medias de los tratamientos para los componentes analizados. La digestibilidad del almidón fue un 2,13 y 3,20 % superior para L y L+P respectivamente con respecto a C.

Cuadro 7. Digestibilidad del almidón, FDN, MO y PB de la dietas C, L y L+P.

	C	L	L+P	p=	EEM
MO	75,81	79,29	79,85	0,34	1,59
FDN	47,29	56,24	56,41	0,27	3,17
Almidón	93,70	95,70	96,70	0,32	1,05
PB	67,09	69,22	69,98	0,72	2,43

4.4. Ambiente ruminal

En el cuadro 8 se presentan los parámetros del ambiente ruminal generado por las tres dietas con las que fueron alimentados los novillos fistulados. Aunque el valor promedio del total de ácidos grasos volátiles (AGV) en el tratamiento L fue superior aproximadamente en un 4% con respecto a los tratamientos L+P y C, no se detectaron diferencias significativas, como así tampoco se observaron diferencias en las proporciones de los ácidos grasos en forma individual. La relación A:P no fue afectada ($p > 0,05$) por los tratamientos.

Cuadro 8. Valores del ambiente ruminal de los novillos fistulados alimentados con C, L y L+P.

	C	L	L+P	EEM	p=	
					trat	hora
AGV (mmol L ⁻¹)						
Total	104,26	108,24	104,02	5,02	0,83	0,10
Acético (A)	55,76	61,51	53,88	2,88	0,34	0,29
Propiónico (P)	26,78	22,72	26,42	1,68	0,52	0,16
Butírico(B)	14,59	15,39	15,29	1,08	0,86	0,15
Relación A:P	2,19	2,81	2,16	0,12	0,10	0,83
N-NH ₃ (mg dl ⁻¹)	5,94	14,37	5,69	1,73	0,11	0,71
pH	6,53	6,59	6,42	0,08	0,42	<,01
Protozoos (N°prot.x 10 ⁴ /ml)	14,37(a)	35,37(b)	13,87(a)	-	0,01	-

Valores con letras distintas en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En la figura 1 se observa la dinámica de la concentración de los AGV totales promedios por tratamiento posterior al suministro matutino de la ración. Se observan dos picos generados a las 2 y 8 hs pos alimentación para los tratamientos C y L, este comportamiento se diferenció en el caso del tratamiento L+P que tuvo una disminución más pronunciada desde el suministro de la ración (8 hs). El valor más alto se registró inmediatamente previo al suministro de alimento (128,08 mmol L⁻¹) para L+P y el valor más bajo correspondió al mismo tratamiento a las 8 hs pos alimentación (82,54 mmol L⁻¹). No se detectó interacción entre los tratamientos y las horas ($p = 0,60$).

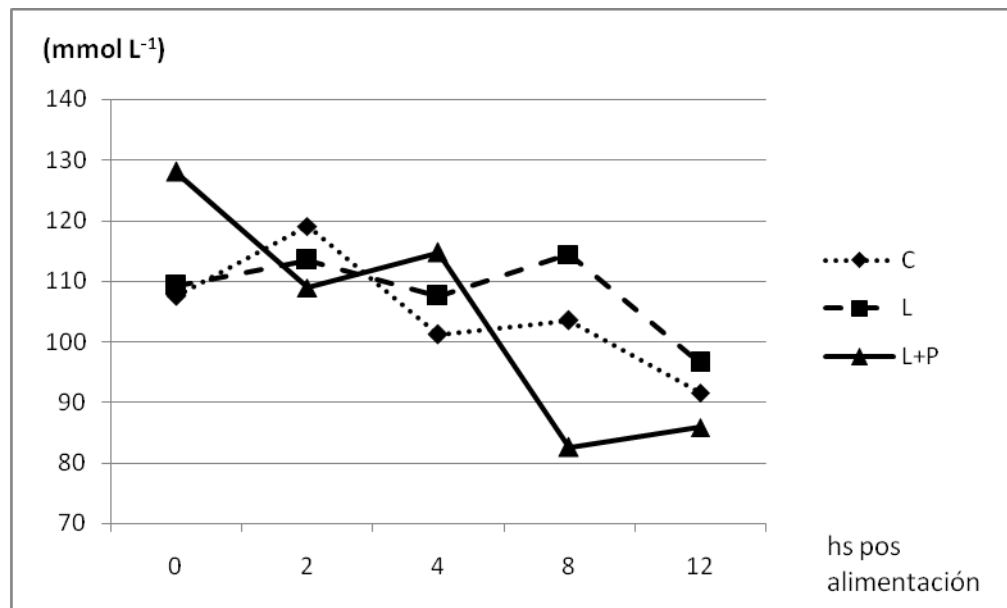


Figura 1. Evolución de la concentración promedio de los AGV totales para los tratamientos C, L y L+P.

En la figura 2 se observa la dinámica de la concentración promedio del ácido acético por tratamiento. Se observa dos picos generados a las 2 y 8 hs pos alimentación para los tratamientos C y L, este comportamiento se diferenció para el tratamiento L+P que tuvo una disminución más pronunciada desde el suministro de la ración. El valor más alto se registró a las 8 hs pos alimentación (65,92 mmol L⁻¹) para L y el valor más bajo correspondió al tratamiento L+P en el mismo horario (44,06 mmol L⁻¹). No se detectó interacción entre los tratamientos y las horas ($p=0,71$).

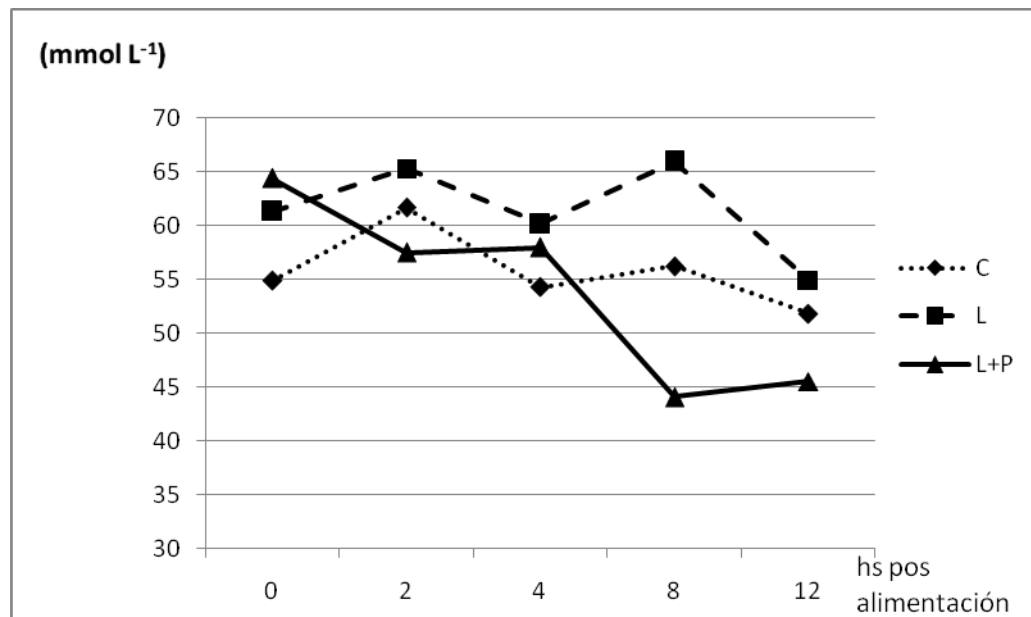


Figura 2. Evolución de la concentración del ácido acético promedio para los tratamientos C, L y L+P.

En la figura 3 se observa la dinámica del valor promedio del ácido propiónico por tratamiento a través de los horarios de medición. Desde el suministro de la ración (8 hs) se registró un leve descenso para los tratamientos C y L, este comportamiento se diferenció en el caso del tratamiento L+P ya que tuvo una disminución más pronunciada. Para el tratamiento C se generaron dos picos (2 y 8 hs pos alimentación) mientras que el tratamiento L se mantuvo prácticamente constante. En el caso de L+P, el pico se generó a las 4 hs pos alimentación. El valor más alto se registró a las 0 hs (33,97 mmol L⁻¹) para L+P y el valor más bajo correspondió al tratamiento L a las 12 hs pos alimentación (20 hs) (19,85 mmol L⁻¹). No se detectó interacción entre los tratamientos y las horas ($p=0,64$).

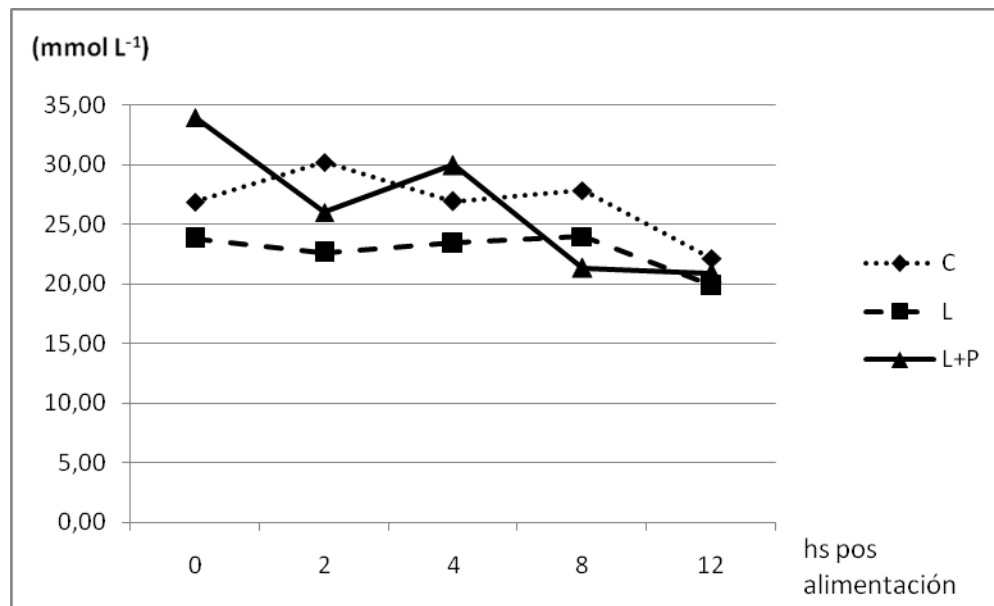


Figura 3. Evolución de la concentración del ácido propiónico promedio para los tratamientos C, L y L+P a través de los horarios de muestreo.

En la figura 4 se detalla el comportamiento de la relación A:P. Los valores de los tratamientos C y L+P prácticamente se comportaron de la misma manera con respecto al tratamiento L pero aún así no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos. Del mismo modo no se detectó interacción entre los tratamientos y las horas ($p=0,93$).

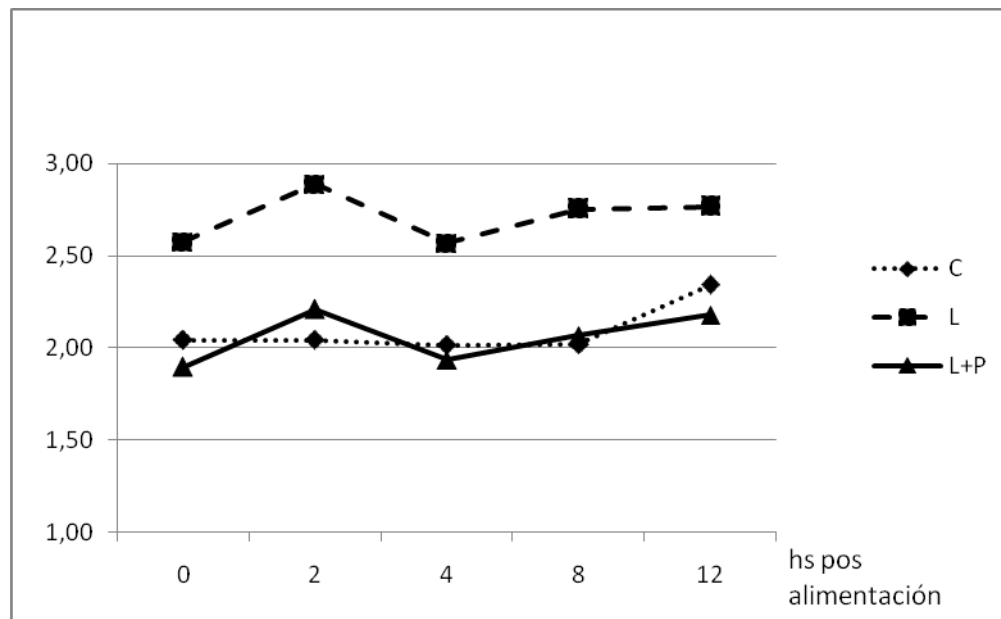


Figura 4. Evolución de la relación A:P promedio para los tratamientos C, L y L+P.

La adición de aceite de lino y su mezcla con aceite de pescado no generó diferencias significativas en el pH medio entre tratamientos (figura 5).

Se detectaron diferencias significativas con respecto a las horas de muestreo del pH ($p < .01$). Los máximos valores de pH para los tratamientos C, L y L+P fueron 7,12; 6,98 y 6,87 respectivamente y se registraron a las 12 horas post alimentación (8 hs p m). Los valores mínimos fueron de 6,12; 6,18 y 6,28 para C, L y L+P los cuales se observaron a las 4 hs luego del suministro de la comida (12 hs).

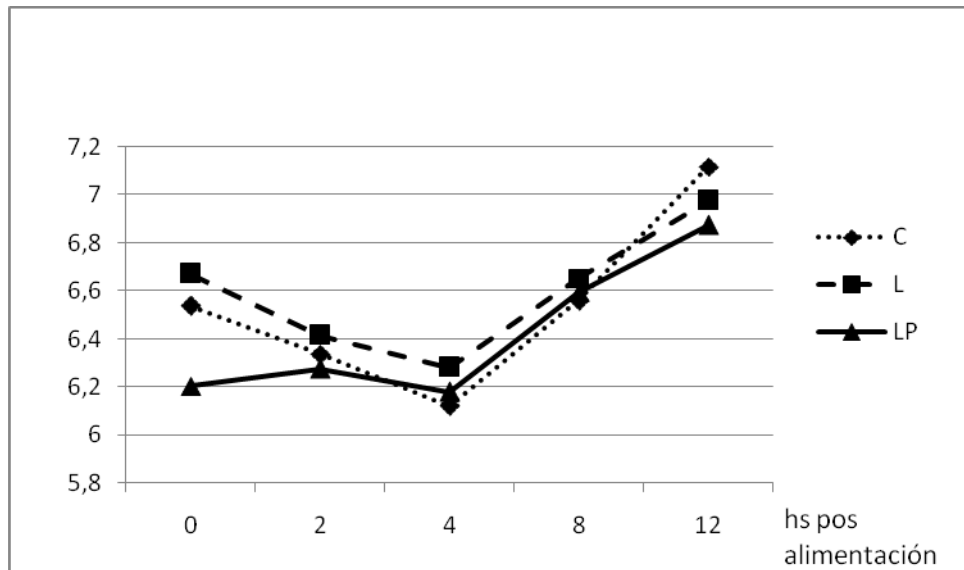


Figura 5. Evolución del pH promedio para los tratamientos C, L y L+P.

La adición de aceite de lino y su mezcla con aceite de pescado no generó diferencias significativas entre las medias de los tratamientos con respecto a la concentración de nitrógeno amoniacal a nivel ruminal (figura 6).

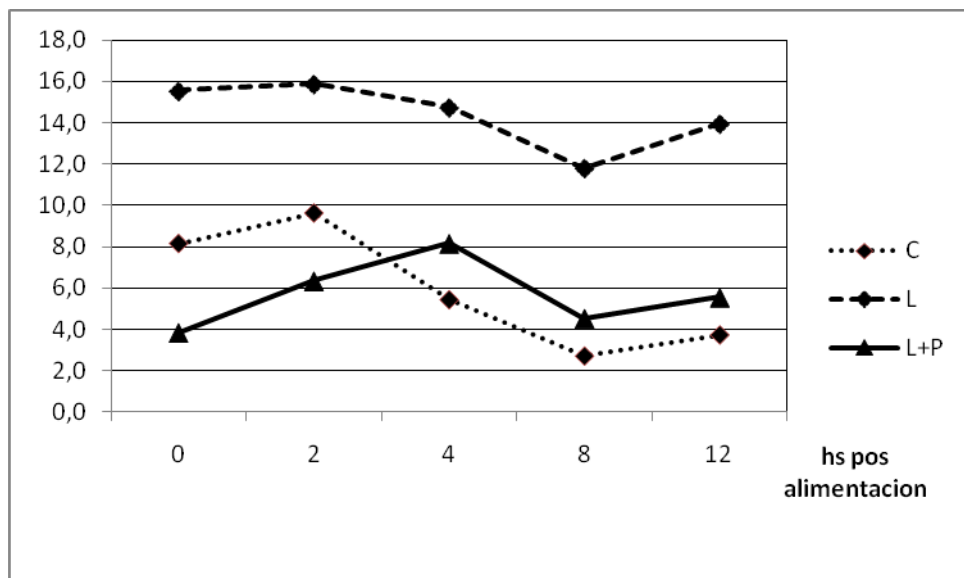


Figura 6. Evolución del N-NH₃ promedio para los tratamientos C, L y L+P.

No se detectó interacción entre los tratamientos y las horas ($p=0,99$) aunque se registró una fuerte tendencia debido a períodos ($p=0,08$) y por animal ($p= 0,08$).

Para el análisis de los resultados del recuento de protozoos realizados en el licor ruminal, se debieron transformar los datos debido a que no correspondían a una distribución normal. Se obtuvieron diferencias significativas para el período ($p=<,01$), animal ($p=<,01$) y tratamiento ($p=0,01$). Los valores para el período 1, 2 y 3 fueron 9,50; 17,60 y 36,50 N° protozoos $\times 10^4/\text{ml}$ respectivamente. Los valores para los animales 2, 3 y 4 fueron 33,20; 7,20 y 23,20 N° protozoos $\times 10^4/\text{ml}$ respectivamente. El tratamiento L fue un 246 y 255 % mayor en el recuento de protozoos con respecto a C y L+P respectivamente (figura 7).

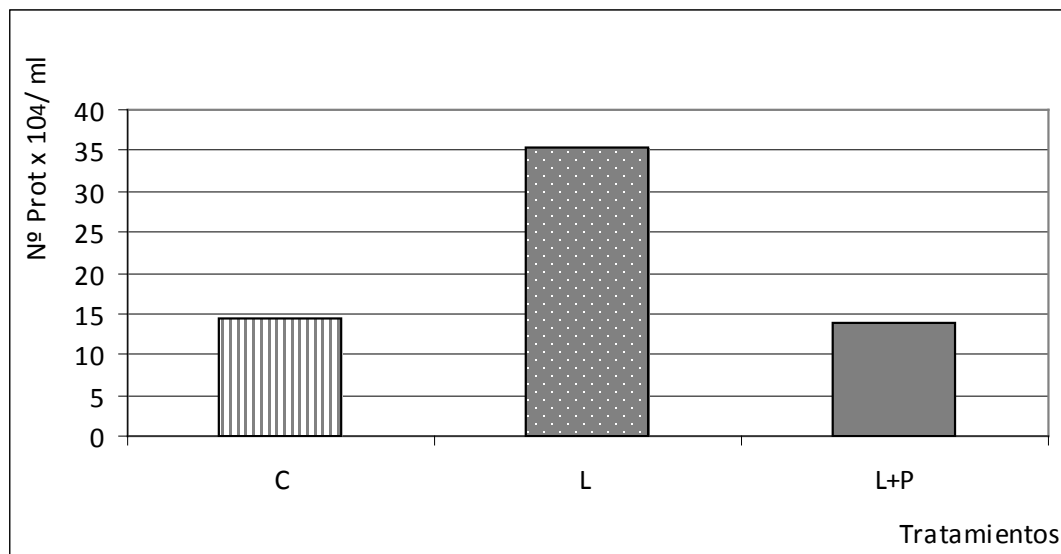


Figura 7. Promedio del número de protozoos (N° protozoos $\times 10^4/\text{ml}$) para los tratamientos C, L y L+P.

En la figura 8 se observa el número de protozoos para los tratamientos C, L y L+P para los tres períodos de medición. Si bien el comportamiento fue errático a través de los períodos claramente se observa un mayor número de protozoos para el tratamiento L con respecto a C y L+P.

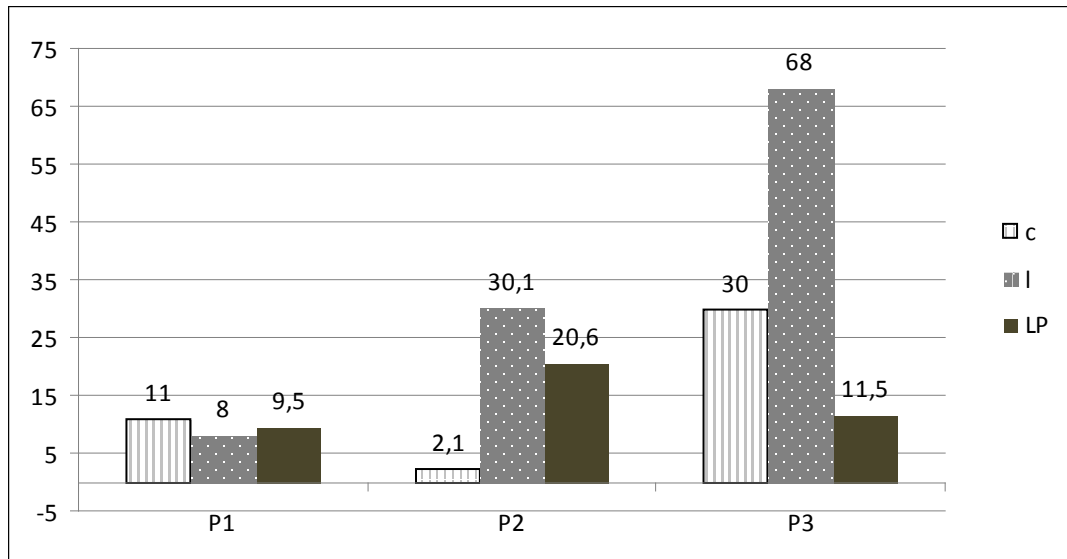


Figura 8. Número de protozoos (N° protozoos x 10⁴/ml) para los tratamientos C, L y L+P para los tres períodos de medición.

4.5. Perfil de los ácidos grasos del rumen

No se observaron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos para ninguno de los ácidos grasos detectados en el rumen excepto para el *trans* 11C18:1 (cuadro 9). Dentro de la composición de los ácidos grasos saturados de los tres tratamientos el C16:0 + C18:0 representaron el 50,36; 66,70 y 68,18% para C, L y L+P respectivamente. El ácido vaccénico se incrementó en un 9,37 y 109,37% para los tratamientos L y L+P con respecto al tratamiento C. Con respecto al ácido graso C18:1 c9 el tratamiento L+P registró el menor porcentaje, el cual se incrementó en un 5,51 y 89,69% para los tratamientos L y C respectivamente. L+P resultó en una menor % de C18:2 c9,12 mientras que se incrementaron en un 27,67 y 70,78 % para los tratamientos L y C respectivamente. La dieta control resultó con el mayor porcentaje de C18:3 c9,12,15 mientras que se registró una disminución del 33,33 y del 66,66 % para L y L+P respectivamente. Con respecto al CLA tanto la dieta C y L tuvieron

valores promedios iguales, mientras que L+P tuvo un incremento del 150%. Con respecto al 20:5 y 22:6 este último solamente incrementó su presencia en la dieta L+P. El tratamiento L presentó la mayor cantidad de AGS y el tratamiento C la mayor cantidad de AGI (AGMI+AGPI) que alcanzó porcentajes del 40,82% con respecto a 26,87 y 25,44 % para L y L+P respectivamente. El tratamiento L+P presentó el mayor porcentaje de Ω 3 y a su vez el menor porcentaje de Ω 6.

Cuadro 9. Perfil de ácidos grasos en rumen de los novillos fistulados alimentados con C, L y L+P.

Ácidos Grasos (% AG totales)	C	L	L+P	EEM	p=	
					trat	hora
c4	0,89	0,23	0,24	0,35	0,45	0,30
c6	1,10	0,35	0,20	0,29	0,26	0,39
c8	0,15	0,12	0,01	0,10	0,66	0,34
c11	0,07	0,37	0,22	0,06	0,17	0,02
c12	0,04	0,09	0,06	0,03	0,64	0,61
c14:0	1,63	0,89	0,74	0,20	0,15	0,29
c14:1	0,12	0,04	0,03	0,03	0,29	0,02
c15:0	0,53	0,30	0,39	0,10	0,43	0,50
c15:1	<,01	<,01	0,03	0,02	0,53	0,48
c16:0	21,07	17,16	16,63	1,75	0,34	0,54
c16:1	1,80	0,80	0,52	0,32	0,19	0,89
c17:0	0,35	0,40	0,43	0,06	0,74	0,99
c17:1	0,06	0,02	0,11	0,03	0,34	0,82
c18:0	29,29	49,54	51,55	5,69	0,18	0,75
c18:1 t9	0,32	0,54	0,80	0,12	0,20	0,70
c18:1 t11	0,64(a)	0,70(a)	1,34(b)	0,05	0,02	0,46
c18:1 c9	21,34	11,87	11,25	2,14	0,13	0,88

c18:2 t9,12	0,09	0,51	0,54	0,13	0,22	0,12
c18:2 c9,12	14,38	10,75	8,42	1,71	0,24	0,89
c18:3 c6,9,12	0,08	<,01	<,01	0,03	0,29	0,70
c20:0	1,25	1,50	1,13	0,27	0,67	0,99
c20:1	1,03	0,60	0,81	0,25	0,57	0,70
c18:3 c9,12,15	0,09	0,06	0,03	0,02	0,27	0,35
CLA	0,02	0,02	0,05	0,01	0,48	0,40
C21:0	0,28	0,09	0,13	0,04	0,14	0,59
C20:2	0,04	0,01	0,01	0,18	0,52	0,53
C22:0	0,13	0,07	0,01	0,03	0,19	0,50
c20:3 cis8,11,14	0,03	0,03	0,02	0,02	0,94	0,08
C22:1	0,16	0,10	0,08	0,14	0,80	<,01
C20:4	0,11	0,43	0,35	0,12	0,35	0,37
C23:0	1,10	0,25	0,48	0,29	0,30	0,44
C22:2	0,02	0,07	0,15	0,03	0,19	0,72
C20:5	0,24	0,04	0,02	0,08	0,31	0,43
C24:0	0,08	0,04	<,01	0,03	0,40	0,45
C24:1	0,17	0,12	0,27	0,04	0,25	0,62
C22:6	0,05	0,15	0,61	0,15	0,20	<,01
AGS	57,98	71,42	66,62	2,75	0,14	0,44
AGMI	25,66	14,80	15,24	2,20	0,11	0,86
AGPI	15,16	12,07	10,20	2,29	0,45	0,85
Ω3	0,38	0,24	0,66	0,14	0,29	0,04
Ω6	14,76	11,81	9,50	2,33	0,44	0,84

Valores con letras distintas en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

4.6. Perfil de los ácidos grasos en sangre

En el cuadro 10 se observa el perfil de los ácidos grasos de la sangre. No se obtuvieron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos para ninguno de los ácidos grasos detectados. Dentro de la composición de los ácidos grasos saturados de los tres tratamientos el C16:0 + C18:0 representaron el 47,69; 61,21 y 54,7 % para C, L y L+P respectivamente. Con respecto a los isómeros del ácido graso C18:1 (C18:1 t9; C18:1 t11y C18:1 c9) se registró valores del 12,94; 12,81 y 14,65% mientras que para el C18:2 26,43; 15,98 y 19,58 para C, L y L+P respectivamente, mientras que no se registró la presencia de CLA en ninguno de los tratamientos. Dentro de los componentes del aceite de pescado el tratamiento que registró el mayor valor fue L (0,05) para EPA mientras que para el DHA no fue detectado en ninguno de los tratamientos. Con respecto a los AGS el tratamiento L y L+P tuvieron un incremento del 20,22 y 11,37% con respecto a C. Los AGI (AGMI+AGPI) alcanzaron valores del 44,87; 31,69 y 37,38%. El tratamiento L tuvo el mayor porcentaje de Ω 3 y a su vez el menor porcentaje de Ω 6.

Cuadro 10. Perfil de los ácidos grasos de la sangre de los novillos fistulados alimentados con C, L y L+P.

Ácidos Grasos (% AG totales)	C	L	L+P	p=	EEM
c4	0,47	0,16	0,15	0,29	0,12
c6	0,11	0,06	<,01	0,76	0,10
c12	<,01	0,10	0,06	0,50	0,05
c14:0	1,16	0,61	0,90	0,44	0,25
c14:1	0,09	<,01	<,01	0,50	0,05
c15:0	0,52	0,39	0,49	0,78	0,13
c15:1	<,01	<,01	0,007	0,50	0,004
c16:0	16,79	14,84	15,67	0,19	0,48
c16:1	0,67	0,23	0,38	0,42	0,19
c17:0	0,17	0,28	0,42	0,62	0,16
c18:0	30,90	46,37	39,03	0,09	2,42
c18:1 t9	0,84	1,16	1,12	0,34	0,13
c18:1 t11	0,61	0,56	0,51	0,71	0,08
c18:1 c9	11,49	11,09	13,02	0,11	0,35
c18:2 t9,12	0,15	1,39	0,69	0,37	0,47
c18:2 c9,12	26,28	14,59	18,89	0,20	2,96
c18:3 c6,9,12	0,15	0,03	<,01	0,50	0,08
c20:0	3,03	1,93	3,17	0,72	1,10
c20:1	0,33	0,55	0,59	0,33	0,09
c18:3 c9,12,15	0,09	0,12	0,01	0,80	0,11
CLA
C21:0	0,62	0,04	0,33	0,59	0,34
C22:1	0,74	0,25	0,37	0,17	0,11
C20:4	0,47	0,29	0,64	0,50	0,17

C23:0	0,58	0,57	0,32	0,90	0,44
C22:2	2,94	1,09	1,16	0,16	0,45
C20:5	<,01	0,05	<,01	0,50	0,03
C24:1	<,01	0,29	<,01	0,07	0,05
Otros	0,78	2,96	2,08	0,57	1,26
C22:6
AGS	54,36	65,35	60,54	0,07	1,49
AGMI	14,78	14,13	15,99	0,09	0,31
AGPI	30,09	17,56	21,39	0,13	2,51
Ω3	0,09	0,17	0,01	0,64	0,10
Ω6	29,99	17,39	21,38	0,14	2,61

4.7. Comportamiento ingestivo

En el cuadro 11 se presentan los datos correspondientes al comportamiento ingestivo de los novillos. El tiempo empleado para consumir el alimento difirió entre los tratamientos. En la figura 9 se observa que a medida que los aceites se incorporaron a las dietas el tiempo empleado para el consumo se incrementó. El mayor tiempo dedicado a consumo fue observado durante la primera hora en los dos suministros diarios 92; 42 y 27% a las 8 hs am y 96; 58 y 35% a las 8 hs pm para los tratamientos C, L y L+P respectivamente. Los consumos de L y L+P fueron repartidos a lo largo de todo el día, en cambio se observó un gran consumo de la dieta para el tratamiento C en las primeras horas pos suplementación. Al cabo de 2 hs posteriores al suministro de la ración se registraron consumos del 53 % (L) y 35% (L+P) para la ración suministrada a las 8 hs y 58 % (L) y 41% (L+P) para la ración de las 20 hs. Luego de las primeras 5 hs posteriores a la comida se registró un 80 y 55 % para el suministro de las 8 hs y un 92,68 y 72,55 % para L y L+P respectivamente (figura 10). El tiempo promedio de consumo por kg de Ms fue de 10, 29 y 38 minutos para C, L y L+P

mientras que el tiempo promedio de rumia por kg de Ms fue de 39, 35 y 21 minutos respectivamente donde se registró una fuerte tendencia ($p=0,07$).

Cuadro 11. Comportamiento ingestivo de los novillos alimentados con las dietas C, L y L+P.

	C	L	L+P	p=	EEM
(min/ración)					
Consumo	80,00 (a)	160,00(b)	218,30(c)	0,01	6,94
Rumia	298,33	191,67	120	0,22	47,46
(min/Kg Ms)					
Consumo	10,50	29,41	37,83	0,14	6,43
Rumia	39,15*	35,23*	20,80**	0,07	2,96

Valores con * distintas en la misma fila indican tendencia a ser estadísticamente significativas ($p<0,1$).

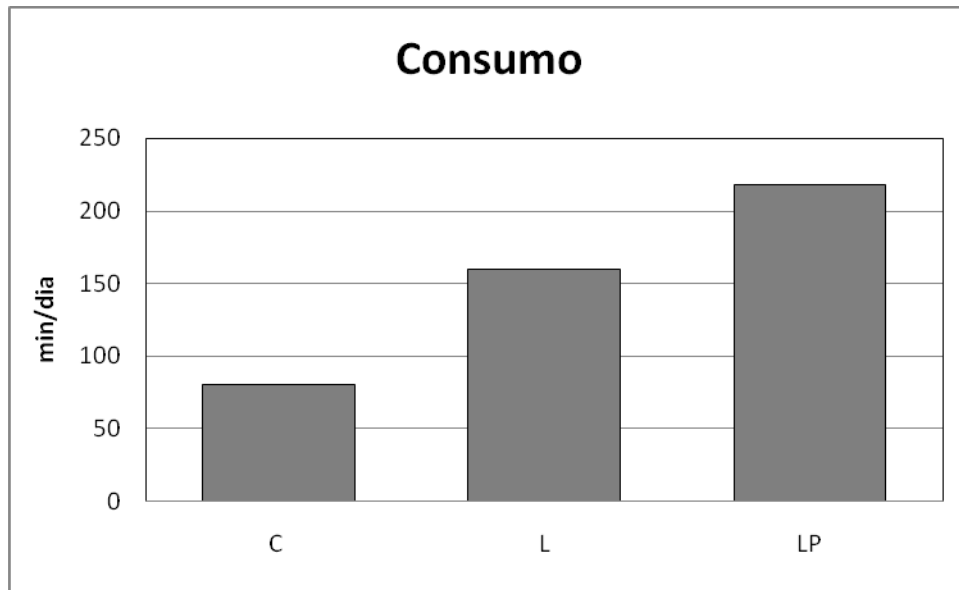


Figura 9. Tiempo total de consumo diario de los novillos alimentados con las dietas C, L y L+P.

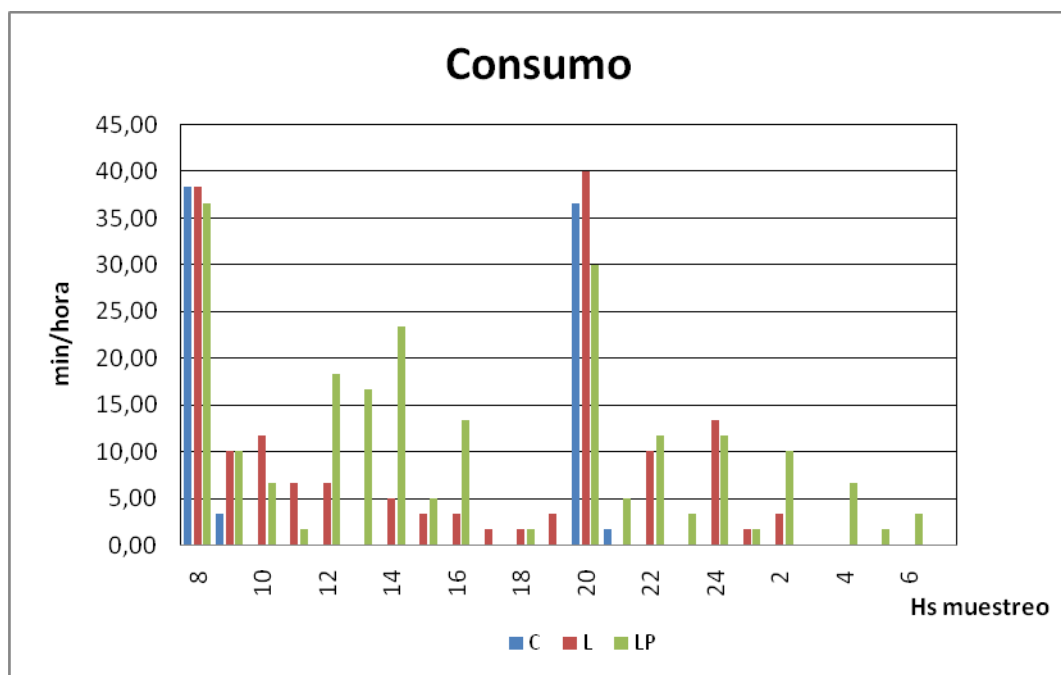


Figura 10. Evolución del tiempo dedicado al consumo de los novillos alimentados con las dietas C, L y L+P.

Aunque el valor promedio de actividad de rumia fue superior en el tratamiento C, esta diferencia no fue significativa (cuadro 9) En la figura 11 puede observarse los valores promedios por tratamiento. Los efectos de período y animal tuvieron un $p=0,56$ y $p=0,38$ respectivamente. En la figura 12 puede observarse que la actividad de rumia comenzó 1 hs luego del suministro de la ración para el tratamiento C haciendo un pico entre las 3 y 5 hs posteriores al suministro de la ración. Con respecto a L y L+P la actividad de rumia comenzó más tarde en ambos horarios de alimentación, retrasándose alrededor de 4 hs posteriores para el suministro de las 8 hs y 2 hs para el de las 20 hs.

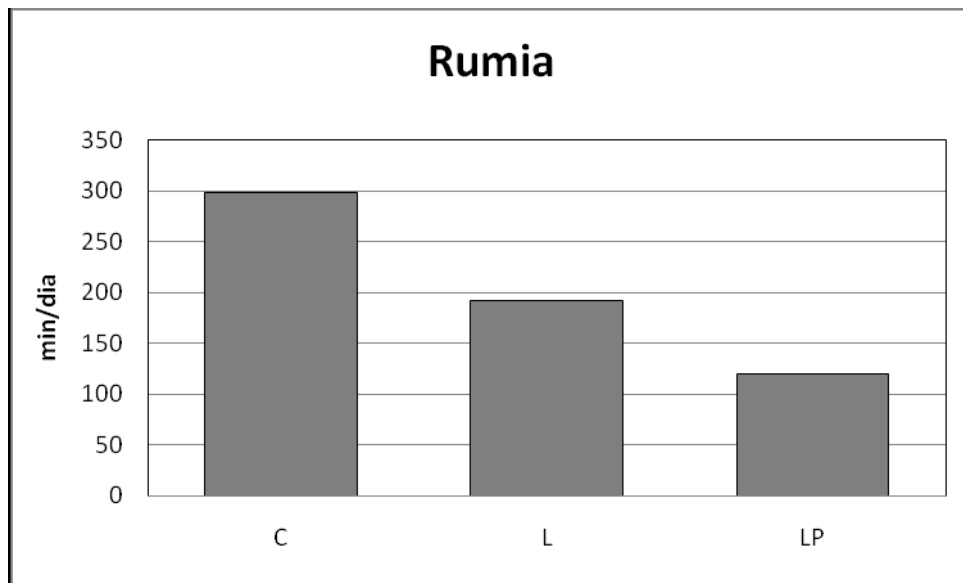


Figura 11. Tiempo total de rumia diaria de los novillos alimentados con las dietas C, L y L+P.

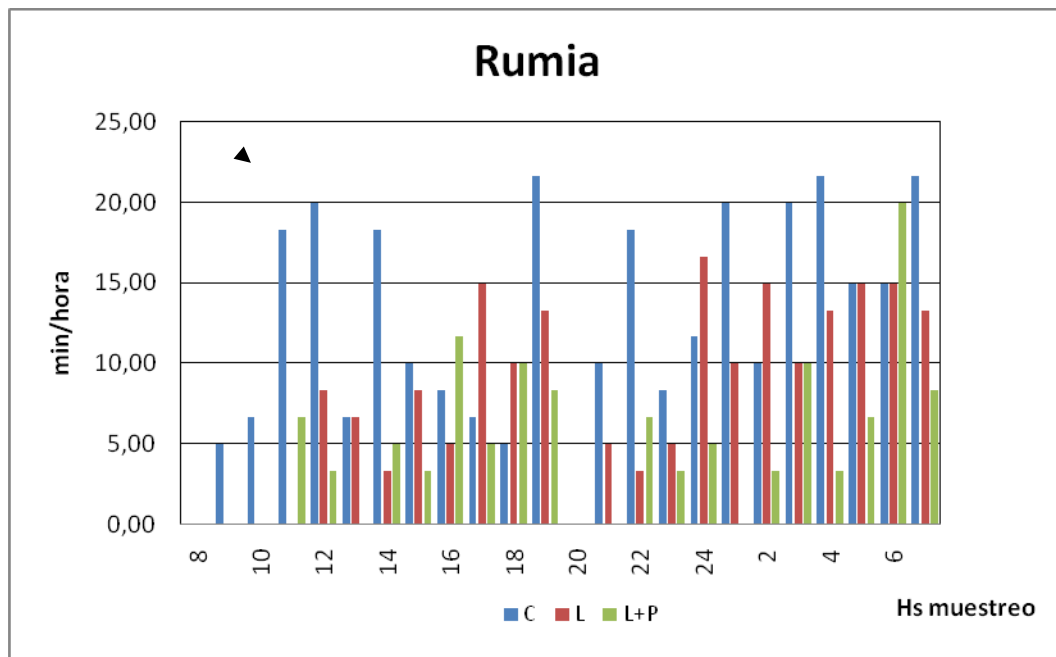


Figura 12. Evolución del tiempo dedicado a la rumia en los novillos alimentados con las dietas C, L y L+P.

5. DISCUSION

5.1. Características químico-biológicas

La concentración del ácido linolénico del aceite de lino fue similar a los encontrados por Stanton *et al.* (2003), National Research Council (2001) y Ueda *et al.* (2003) los cuales superaron el 50% de C18:3. Para los isómeros C18:2, los valores encontrados estuvieron en un rango entre un 13 a un 20%, mientras que el porcentaje de C18:1 fue semejante para todos los autores citados anteriormente (alrededor de 20%) salvo Ueda *et al.* (2003) que presentó un valor inferior (16,4%).

El AP utilizado en el presente ensayo presentó un alto porcentaje de C18:1 (23,3%) con respecto a las concentraciones encontradas por Whitlock *et al.* (2002), Donovan *et al.* (2000), AbuGhazaleh *et al.* (2002 y 2003) que estuvieron entre un 7 y 13% respectivamente. Con respecto al porcentaje de C18:2 se detecto solamente 1,9% el cual fue similar a los valores presentados por los autores anteriormente citados, salvo por el valor encontrado por Gagliostro (2006) de 17%. El AP utilizado en esta experiencia presentó 1,3% de C18:3 cuyo valor es similar a los publicados por Whitlock *et al.* (2002), AbuGhazaleh *et al.* (2002 y 2003) y Gagliostro (2006) mientras que Donovan *et al.* (2000) presentó un valor de un 147% por encima de este valor (3,1%). La concentración del EPA fue intermedio según los valores mencionados por Gagliostro (2006), Whitlock *et al.* (2002), Donovan *et al.* (2000) y AbuGhazaleh *et al.* (2002 y 2003) (entre 7 y 12%). Mientras que el porcentaje de C22:6 (15,5%) fue superior teniendo en cuenta los mismos autores (entre 9 y 12%). La composición del AP puede variar en función de la época del año en la que se efectúa la captura de las especies marinas, la especie utilizada y el proceso de elaboración (Gagliostro 2006).

En el silaje de maíz, el C18:0 presentó un valor elevado (34,9%) con respecto a los valores citados por Whitlock *et al.* (2002) (1,8%), Donovan *et al.* (2000) (5,4%) y AbuGhazaleh *et al.* (2001 y 2002) (3,5 y 1,9% respectivamente). Para el porcentaje de C18:1 los autores previamente citados encontraron valores entre 16 y 19%, mientras que en este trabajo se detectó un 9,8%. Se observó una gran discrepancia para el C18:2 debido a que la mayoría de los autores encuentra valores por encima del 36% mientras que en el silaje utilizado no superó el 16%. Para el ácido graso C18:3 se detectó un 0,06% mientras que según los mismos autores dicho valor se mantuvo por encima del 6%. Según Morand-Fehr; Tran (2001) el ensilaje, si se lo compara con el grano de maíz, tienen una composición bastante similar con menor porcentaje de ácido linoleico mientras que el grano de maíz posee mayor proporción de ácidos grasos saturados (C18:0 y C16:0) y ácido linolénico. El silaje de maíz es un material donde toda su composición es variable de acuerdo a la elección del híbrido, momento de cosecha, tamaño de picado, altura de corte y método de almacenaje (Bragachini y otros, 2008), esto provoca que el material generado tenga características particulares en cada caso. Los forrajes picados son más propensos a la oxidación de los lípidos, lo cual pudo haber generado las bajas concentraciones en los ácidos grasos C18:1, C18:2 y C18:3. Dewhurst y King (1998) mostraron que generalmente un ensilaje tiene una composición en ácidos grasos próxima a la del forraje verde correspondiente, salvo que las condiciones antes y durante el ensilado no hayan sido óptimas. El componente con mayor variabilidad es el almidón, tomándose un 18% como valor promedio y de 39% como máximo (Guaita y Fernández, 2005) con lo cual el ensilaje empleado contenía una alta proporción de granos (28,6% de almidón).

Si bien en este trabajo no se determinó el perfil de ácidos grasos de la semilla de maíz, Duckett *et al.* (2002) publicaron valores de 23,2; 57,5 y 1,8% para los ácidos grasos C18:1, 18:2 y 18:3, mientras que un 1,8% para C18:0, los cuales fueron

coincidentes con los presentados por Navarro (2007) 28,7; 52,5 y 1,5% para 18:1, C18:2, C18:3 y 2,6% para 18:0. Depetris (2004) encontró valores de 33,7; 43,9, 1 y 4,2 % para los mismos ácidos grasos.

Los valores químico-biológicos del silaje de maíz de planta entera, grano de maíz y del expeller de girasol se encontraron dentro de los rangos publicados por el National Research Council (2001) y por los reportados por Guaita y Fernández (2005).

5.2. Consumo

Zinn y Shen (1996) suplementando con un 5% de grasa amarilla en dietas altas en concentrados (75% de maíz) obtuvieron una reducción del consumo del 6%. Del mismo modo, Ramirez y Zinn (2000) obtuvieron una disminución del 5% cuando agregaron un 4% de distintas fuentes lipídicas (cebo, grasa amarilla o grasa parrilla) en dietas altas en concentrados (70% de maíz). En cambio, la depresión en el consumo fue cercana al 10% cuando se agregó un 4% de aceite de soja (Engle *et al.*, 2000). Esta mayor depresión se debe a que los ácidos grasos insaturados disminuyen en mayor medida el consumo (Czerkawski; Clapperton, 1984) que los ácidos grasos saturados. Los microorganismos ruminales parecen ser tolerables a pequeñas cantidades de lípidos (3 a 5%) (Hatch *et al.*, 1972; Palmquist; Jenkins, 1980). La digestión de los carbohidratos estructurales puede reducirse con la adición de lípidos en la dieta (Ikwuegbu; Sutton, 1982) mientras que los carbohidratos no estructurales son menos afectados (Jenkins, 1993) con lo cual, las dietas con mayor fibrosidad serían más afectadas por la adición de lípidos que las dietas con alta inclusión de granos. Offer *et al.* (2001) observaron una depresión del consumo de MS al suplementar una dieta rica en almidón con aceite de lino, esta disminución en el consumo estuvo asociada a que la suplementación con lípidos incremento la densidad energética de la dieta (NRC, 1989). Según Plegge *et al.* (1984) citado por Church

(1993) los consumos máximos de EM en vacunos en terminación se alcanzaron con concentraciones de energía en la dieta de 3,1-3,2 Mcal de EM/Kg. En los tratamientos C, L y L+P los valores alcanzados de EM/kgMS fueron de 2,99; 3,31 y 3,37 por lo tanto, los últimos dos tratamientos al superar este umbral pudieron afectar los consumos con respecto al tratamiento control.

Otro factor a tener en cuenta es la palatabilidad y aceptabilidad de la dieta (Allem, 2000), en el presente ensayo se observó mediante el registro del comportamiento animal como la adición de aceites a las dietas influyó sobre la aceptabilidad de los distintos tratamientos. El aceite de lino no presentó un olor desagradable, mientras que el aceite de pescado aún saborizado, al tomar contacto con el aire rápidamente dejaba sentir el olor característico de su origen. En parte, esto podría explicar porque el tratamiento C tardaba en promedio unos 80 minutos en consumir su ración diaria mientras que L el doble y L+P en un 173% más de tiempo que C.

En este estudio, el consumo de AGI fue de 174,5; 331,6 y 383,6 gr/an/día para C, L y L+P respectivamente. Un mayor consumo de AGI genera una mayor llegada de estos a duodeno (Wu *et al.*, 1991). Los efectos hipofágicos de los AGI son mayores que los AGS (Jenkins y Jenny, 1989; Pantoja *et al.*, 1994; Pantoja *et al.*, 1996a; Allen, 2000). La infusión abomasal de ácidos grasos de cadena larga con alto grado de insaturación generó una mayor caída del consumo que las fuentes de grasa más saturadas (Drackley *et al.*, 1992; Christensen *et al.*, 1994; Bremmer *et al.*, 1998). Drackley *et al.* (1992) hipotetizan que el grado de insaturación de los ácidos grasos que alcanzan el intestino disminuye el consumo por afectar la motilidad gastrointestinal.

5.3. Digestibilidad

La digestibilidad aparente en el tracto total para la PB, FDN, MO y almidón no fueron diferentes entre tratamientos aunque se registró una fuerte tendencia para este último componente. Los aceites que contienen mayor proporción de ácidos grasos insaturados tienen el potencial de disminuir en mayor medida la fermentación (Jenkins, 1993) que los que tienen menor porcentaje de insaturados. Sin embargo, Hristov *et al.* (2005) adicionando aceites de girasol enriquecido con ácido oleico ó linoleico (5% de la MS) en dietas de terminación (78% de grano de cebada) no encontró efecto del tipo de aceite sobre la digestibilidad aparente total de la MS, MO, FDN, FDA y del almidón. La falta de diferencias entre tratamientos puede deberse a que la digestibilidad ruminal no fue afectada por la adición de lípidos (cuadro 8) o que el intestino compensó la reducción que podría haberse generado. Varios autores (Ikuwuegbu; Sutton, 1982; Sutton *et al.*, 1983; Ueda *et al.*, 2003) mostraron la digestión “compensatoria” de la MO y de la fibra en el intestino cuando la digestibilidad ruminal disminuyó por el agregado del aceite de lino. Faichney *et al.* (2002) también demostraron que la digestión del intestino compensó el efecto negativo de los lípidos insaturados sobre la digestión ruminal. Ikuwuegbu y Sutton (1982) observaron que la compensación del intestino fue total a un nivel de 2,2% de aceite de lino pero no al 6,6%. La digestibilidad aparente total para FDN y almidón encontradas en el presente trabajo fueron similares a las presentadas por Hristov *et al.* (2005) (66% y 96% respectivamente) con dietas que contenían un 24 % de FDN y un 49,5% de almidón.

En el caso del almidón, si bien los porcentajes fueron similares en la formulación de las dietas de cada tratamiento (54,9, 52,2 y 51,4 % para C, L y L+P respectivamente) y las variaciones registradas se debieron principalmente por la adición de aceites, la disminución en el consumo promedio de MS total, provocó una disminución ($p=0,06$) del consumo de almidón los cuales fueron de 2,84 y 2,96 para

los tratamientos L y L+P con respecto a C que consumió 4,18 kg de almidón promedio por día. Los descensos de la digestibilidad debido al aumento del consumo de MS son consecuencia de una mayor tasa de pasaje a través del conducto digestivo e incluye descensos en la digestibilidad tanto del almidón como de los componentes fibrosos de la dieta (Church, 1993). Por este motivo, el tratamiento C tuvo una menor digestibilidad del almidón donde el consumo de MS fue mayor que los tratamientos L y L+P.

5.4. pH

El promedio de pH para los tratamientos C, L y L+P fue de 6,53, 6,59 y 6,42 respectivamente, manteniéndose por encima del valor crítico de 6,2 donde no se vería afectada la fermentación ruminal de la fibra (Mould *et al.*, 1983). En general, la suplementación con lípidos no tiene impacto sobre el pH ruminal (Pantoja *et al.*, 1994). En este sentido, Ueda *et al.*, (2003) no encontró efecto de la suplementación con aceite de lino sobre el pH en dietas altas en concentrado. Del mismo modo Onetti *et al.* (2001) trabajando con vacas lecheras a las que se las suplementó con dos tipos de lípidos y en dos niveles (2 y 4%) observaron que el pH tampoco fue afectado por los tratamientos. Hristov *et al.* (2005) trabajando con la adición de aceites de girasol enriquecido con oleico ó linoleico (5% de la MS) no encontraron efectos sobre el pH.

En los tratamientos L y L+P, la adición de lípidos provocó que los animales estuvieran más tiempo consumiendo su ración diaria y por lo tanto la ingesta se realizaba en pequeñas cantidades lo cual explicaría los altos pH registrados. Si bien se podría suponer que el tratamiento C al ingerir mayor cantidad de almidón debería haber registrado el pH más bajo, según el registro de comportamiento animal este tratamiento comenzó mucho antes la rumia y dedicó más tiempo por kg de MS ($p=0,07$) consumida a rumear que los otros dos tratamientos lo que podría haber generado una menor disminución del pH.

5.5. AGV

La concentración total de AGV no es afectada por la suplementación con lípidos (Pantoja *et al.*, 1994), sin embargo, otros autores concluyen que disminuye la proporción de acético mientras que aumenta la de propiónico (Zinn, 1988). Montgomery *et al.* (2008) trabajando con grasa, germen de maíz, aceite de maíz y aceite de lino encontró que la mayor concentración de AGV totales se detectó con la adición de grasa, mientras que con el aceite de maíz se obtuvieron las mayores concentraciones de acético, isobutírico e isovalérico. Ueda *et al.* (2003) trabajando con dietas concentradas encontraron que la adición de aceite de lino no generó ninguna diferencia en la concentración de los AGV totales, aunque disminuyó la concentración del acético y se produjo un incremento del propiónico. Un 5% de aceite de girasol (enriquecido con linoleico o con oleico) no generó diferencias en la concentración tanto de los AGV totales como en los individuales (Hristov *et al.*, 2005). Los valores para AGV totales de acético y propiónico del presente trabajo fueron similares a los encontrados por Hristov *et al.* (2005) que trabajaron con una dieta de características análogas (24% de FDN y 49,5% de almidón) donde la principal diferencia estuvo en la adición de aceites que variaron en su grado de insaturación. Aunque los tratamientos que recibieron aceite consumieron menor cantidad de los componentes de FDN y de almidón con respecto al control, no se detectó una menor producción de acético o propiónico en el rumen. La tasa de pasaje del tratamiento control seguramente fue mayor con respecto a los tratamientos que recibían aceites provocando que tanto la fibra como el almidón sea menos digerido que en los tratamientos L y L+P donde el consumo de MS fue menor, provocando que los componentes de la dieta de estos tratamientos fueran más degradados.

5.6. Protozoos

Contrariamente a lo esperado, no se detectaron disminuciones del número de protozoos debido a la adición de lípidos (cuadro 8). La presencia de protozoos puede haberse mantenido debido a que no se registró una disminución severa del pH, generando un ambiente adecuado para altos niveles de biohidrogenación provocando que la presencia del o los aceites en el rumen no ejerciera efectos negativos sobre los protozoos. La mayoría de la bibliografía coincide en que los aceites agregados a las dietas de los rumiantes son tóxicos para los protozoos (Newbold; Chamberlain, 1988). Ueda *et al.* (2003) registraron que el número total de protozoos en el fluido ruminal disminuyó marcadamente en las dietas con altos niveles de concentrados (28,4% de trigo, 10,2 % de harina de semilla de colza, 8,6% de harina de semilla de girasol y 5,7% de afrecho de trigo) a la que se le adicionó aceite de lino (3%). Del mismo modo, Onetti *et al.* (2001) encontraron que la suplementación con dos tipos de grasas, disminuyó la concentración de protozoos por ml de fluido ruminal, siendo más severa la disminución a medida que se incrementó el porcentaje de lípidos en la dieta. Ikwuegbu y Sutton (1982) observaron un efecto negativo lineal ($p < 0,01$) y cuadrático ($p < 0,05$) para el número de protozoos al incrementar la cantidad de aceite de lino en las dietas de ovejas. Ivan *et al.* (2001) trabajando con ovejas que recibieron una dieta de silaje de cebada con la adición de un 6% (base MS) de aceite de girasol no encontraron diferencias en la concentración de protozoos entre los días 0 hasta 5 del experimento, sin embargo, la misma se hicieron significativas a partir del sexto día hasta la finalización del ensayo. En el presente ensayo se realizó la toma de muestra para protozoos en el 4 día de la fase experimental lo cual pudo haber provocado que los valores encontrados tuvieran un comportamiento errático, presentándose la mayor cantidad de protozoos para el tratamiento L, luego para C y por último para L+P.

Algunos protozoos ciliados son retenidos selectivamente en el rumen por migración o por medio de un mecanismo de captación o retención que depende de la quimiotaxis (Abe *et al.*, 1981; Ankrah *et al.*, 1990). Teniendo en cuenta esto, además de que del total de protozoos (10^5 a 10^6 células /ml de contenido ruminal) la mayoría son ciliados (Church, 1993) y que se realizó una sola toma de muestra por período, en conjunto podría haber generado las altas variaciones encontradas entre los tratamientos.

5.7. N-NH₃

No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, lo cual pudo deberse en parte al no haber encontrado diferencias en el número de los protozoos ruminales. Aunque las dietas fueron isoproteicas (10% PB) los consumos promedios diarios de proteína fueron mayores para C con respecto a las dietas adicionadas con aceite (0,81, 0,55 y 0,57 kg de PB por día para C, L y L+P). Estas diferencias no se reflejaron en las concentraciones de N-NH₃ ruminales debido posiblemente al tiempo de retención que tuvo cada dieta provocando que el tratamiento C aunque ingirió mayor cantidad de proteína, tuviera una menor proporción efectivamente digerida en el rumen. La proteína es degradada a cetoácidos y amoníaco, siendo este último la principal fuente de N para la síntesis microbiana, la intensidad de este proceso degradativo es variable y depende de la magnitud de la fracción potencialmente degradable y del tiempo de retención en el rumen (Ørskov; McDonald, 1979). Hristov *et al.* (2005) trabajando con la adición de aceites de girasol enriquecido con oleico ó linoleico (5% de la MS) no obtuvieron efecto sobre la concentración de N-NH₃. Del mismo modo, el nitrógeno ruminal no fue afectado debido a la inclusión de niveles crecientes de aceite de soja (0; 3,2; 6,3 y 9,4) en una dieta concentrada (Kucuk *et al.*, 2007).

5.8. Perfil de ácidos grasos en rumen

Contrariamente a lo esperado, no se encontraron diferencias en ninguno de los ácidos grasos del en la digesta ruminal salvo para el C18:1 n -11 (cuadro 9). AbuGhazaleh *et al.*, (2002), adicionando un 2% de aceite de pescado, 2% de aceite de soja y una mezcla de un 1% de cada uno de los aceites, encontraron que se incrementó en el rumen las proporciones de CLA (0,1; 0,3; 0,2 y 0,2 g/100 g de ácidos grasos) con la suplementación con aceites, encontrándose el valor más alto cuando se incorporó el aceite de pescado a la dieta. Los mismos autores determinaron que el AV (2,6; 4,6; 4,6 y 4,4 g/100 g de ácidos grasos para las mismas fuentes) se incrementó con la suplementación con lípidos con respecto a la dieta control pero sin registrarse diferencias entre las distintas fuentes de aceites. AbuGhazaleh *et al.* (2003) no encontraron diferencias para el n -9 n -11 CLA en el rumen (0,2 g/100g ácidos grasos) cuando se adicionó lípidos altos en oleico, linoleico y linolénico. Las proporciones de VA se incrementaron a medida que aumentó el grado de insaturación con respecto a la dieta adicionada con esteárico, obteniéndose el mayor incremento cuando se adicionó el linoleico. Se produjo una disminución sustancial en la concentración de EPA y DHA en la digesta ruminal comparados con los ácidos grasos dietarios, causado probablemente por la biohidrogenación de ambos. La menor proporción de DHA en la digesta del rumen comparado con EPA puede indicar que el DHA desaparece a mayor tasa que el EPA. Las diferencias encontradas por AbuGhazaleh *et al.* (2003) con respecto al presente ensayo se deben a que el oleico y el linoleico provenían de semillas de girasol mientras que el linolénico de semilla de lino. La biohidrogenación podría ser disminuida cuando las semillas son suministradas enteras debido a la presencia de la cubierta protectora (Aldrich *et al.*, 1997).

En el presente trabajo no se detectaron diferencias entre las medias de los tratamientos para los ácidos grasos individuales considerados, salvo para el C18:1 *n*-11 (ácido vaccénico). Si bien se ofrecieron dietas altas en concentrados, los altos pH registrados pudieron ser favorables para que se produjera una mayor biohidrogenación de los aceites adicionados, lo cual se refleja en las altas concentraciones de 18:0 en L y L+P con respecto a C (29,3; 49,5; 51,5% C18:0 para C, L y L+P respectivamente). Por lo tanto, los altos pH registrado, que es el factor que más influye sobre la biohidrogenación además que, a mayor grado de instauración la tasa de biohidrogenación aumenta, pudieron ser los dos factores principales causantes de que no se hayan registrado diferencias a nivel ruminal debido a la adición de C18:3. En este sentido, Moate *et al.* (2004) estimaron tasas medias de biohidrogenación *in vivo* de los ácidos oleico, linoleico y linolénico de 27, 88 y 244% por hora, respectivamente mientras que Wachira *et al.* (2000) determinaron que la biohidrogenación para los ácidos grasos 18:2 y 18:3 fue de un 80 y 93% cuando se alimentaron corderos con AP o semilla entera de lino. Van Nevel y Demeyer (1996) observaron una caída significativa en la desaparición de los ácidos linoleico y linolénico de los cultivos de rumen a medida que el pH cambió de 6,8 a 5,2. Según Kepler y Tove (1967), el pH óptimo de la isomerasa se encuentra entre un pH de 7 y 7,2. La enzima isomerasa (*cis* 9 *trans* 11 isomerasa) llamada también linoleata isomerasa presente en algunas bacterias como *Butyrivibrio fibrisolvens*, tiene la capacidad de isomerizar los dobles enlaces con configuración *cis* de los AGPI y transformarlos en *cis/trans* e hidrogenar estos ácidos grasos obteniéndose como producto final este proceso el C18:1 *n*-11. Martin y Jenkins (2002) también reportaron una menor formación de los *trans* C18:1 en un cultivo con un pH de 5,5 comparado con uno de 6,5. Por lo tanto se generaron las condiciones óptimas para lograr la formación de altas concentraciones de C18:1 *n*-11, lo cual se verificó mediante el

incremento en un 92% de este ácido graso en L+P. Esto implica que no solamente son necesarias las condiciones anteriormente mencionadas sino que la presencia de AP podría haber generado un cambio en la población de los microorganismos del grupo B. AbuGhazaleh y Jenkins (2004) sugirieron que el DHA promueve la acumulación de los *trans* C18:1 y VA en el rumen debido a que posiblemente inhibe la enzima reductasa de los microorganismos que son las responsables de la biohidrogenación terminal de *trans* C18:1 a C18:0. Las concentraciones de EPA y DHA en la digesta del rumen fueron bajas, si bien el aceite de pescado representaba un 1% de la dieta solamente, la disminución en el consumo y por lo tanto el mayor tiempo de retención pueden haber generado la biohidrogenación de ambos ácidos grasos (Allem, 2000). Wachira *et al.* (2000) reportaron biohidrogenaciones del 72 al 79% para EPA y DHA en dietas que contenían aceite de pescado y la mezcla de DHA con semilla de lino.

Jenkins (1993) y Bauman *et al.* (2003) mencionan que uno de los factores que disminuye la biohidrogenación es la carga excesiva de aceite en el rumen haciendo que se dificulte la normal biohidrogenación. En el presente ensayo se registró un mayor tiempo de consumo de las dietas adicionadas con aceite, lo cual provocaría que el ingreso de los aceites al rumen sea en bajas dosis pudiendo favorecer aún más su biohidrogenación.

5.9. Perfil de ácidos grasos en sangre

En el presente ensayo no se encontraron diferencias significativas entre los ácidos grasos individuales, no se detectó la presencia de CLA y las diferencias generadas en el rumen de C18:1 *t* 11 no se reflejaron en el plasma. Además, se detectó la presencia de C20:5 en los tres tratamientos mientras que ocurrió lo contrario para C20:6. AbuGhazaleh *et al.* (2003) encontraron que los efectos de la suplementación con lípidos (aceite de pescado + diferentes fuentes (esteárico, oleico,

linoleico y linolénico) sobre las concentraciones de AV en rumen (2,8; 4,4; 8,7 y 4,7 g/100 de ácidos grasos) fueron también reflejadas en los triglicéridos del plasma (2,7; 4,6; 8,8 y 5,4 g/100 g de ácidos grasos respectivamente). Las diferencias encontradas en el CLA ruminal (0,09; 0,16; 0,18 y 0,16 g/100 g de ácidos grasos) donde AP + esteárico fue inferior a los otros tres tratamientos, no se mantuvieron en el plasma (0,06; 0,07; 0,06 y 0,07 g/100 g de ácidos grasos). En el presente trabajo podemos concluir que la alta biohidrogenación provocada por los altos pH generó pequeñas variaciones en el rumen en C18:1 \neq que no pudieron reflejarse a nivel del perfil lípido del plasma. Los valores presentados por AbuGhazaleh *et al.* (2003) fueron muy superiores a los obtenidos en este ensayo.

6. Implicancias

La adición de los niveles de aceites de lino y lino + pescado en dietas concentradas empleados en el presente ensayo no fue un método eficiente para provocar cambios favorables en los perfiles de ácidos grasos en rumen y en consecuencia en sangre.

Varias causas pueden haber provocado que el objetivo de este trabajo no se cumpliera. Si bien el aceite de lino fue similar a los encontrados en la bibliografía (se considera como tal cuando posee concentraciones de C18:3 > al 50%), se encontró una alta variabilidad en la composición del aceite de pescado. Como se mencionó anteriormente, la composición del mismo depende de la época de captura la especie utilizada y el proceso de elaboración, lo que podría traer consecuencias como las vistas en este ensayo en cuanto a la aceptabilidad de la dieta por parte del animal. Los autores consultados no hacen referencias a que los aceites de pescados empleados sean saborizados, mientras que el AP utilizado en este ensayo poseía sabor a naranja y estaba enriquecido con Vitamina E para evitar la oxidación del mismo. Se deberían

realizar ensayos para determinar si este es el sabor mas aceptado por los bovinos o lograr que el AP sea inodoro e insípido.

Las condiciones generadas en el ambiente ruminal (principalmente el pH) permitieron una alta biohidrogenación de los aceites minimizando la formación de CLA y sus precursores. Además, la ingesta de los aceites fue más espaciada debido al mayor tiempo que le tomo a los tratamientos L y L+P en consumir la ración diaria provocando que no se generaran disturbios en la fermentación ruminal. La fracción grano de maíz se suministro en forma entera, lo cual podría reemplazarse el 50% en forma molida para lograr un descenso del pH y de este modo evitar las altas biohidrogenaciones de los aceites.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo es posible concluir que en los novillos alimentados con dietas concentradas:

- La inclusión de aceites provocó un incremento en el consumo de lípidos y en consecuencia una disminución en el consumo de MS. Se adjudica estos efectos principalmente a la aceptabilidad de la dieta y al mayor consumo de ácidos grasos insaturados.
- La digestibilidad aparente total de la FDN, Almidón, PB y MO no fueron afectadas por la inclusión de aceite de lino solo y su combinación con aceite de pescado debido a que los porcentajes de aceites se encuentran dentro de un rango aceptable para no provocar interferencias en la fermentación.
- La adición de aceites no provocó una disminución en el número de protozoos con respecto al tratamiento control.
- La inclusión de aceites no generó un cambio en el perfil de ácidos grasos tanto en sangre como en licor ruminal a excepción del *trans* 11C18:1. El lento consumo de las dietas suplementadas con aceites observado durante el comportamiento animal generó que el aceite que se iba consumiendo sumado a los altos pH registrados, sufriera una alta biohidrogenación.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABE, M.; IRIKI, T.; TOBE, N.; SHIBUI, H. 1981. Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 758–765.
- ABUGHAZALEH, A.A.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R. 2001. Conjugated linoleic acid and other beneficial fatty acids in milk fat from cows fed soybean meal, fish meal or both. *J. Dairy Sci.* 84: 1845:1850.
- ABUGHAZALEH, A.A.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R.; KALSCHEUR, K.F.; WHITLOCK, L.A. 2002. Fatty acid profiles of milk and rumen digesta from cows fed fish oil, extruded soybeans or their blend. *J. Dairy Sci.* 85: 2266-2276.
- ABUGHAZALEH, A.A.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R.; KALSCHEUR, K.F. 2003. Conjugated linoleic acid and vaccenic acid in rumen, plasma and milk of cows fed fish oil and fats differing in saturation of 18 carbon fatty acids. *J. Dairy Sci.* 86: 3648-3660.
- ABUGHAZALEH, A.A.; JENKINS, T.C. 2004. Short communication: docosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 87: 1047-1050.
- ALDRICH, C.G.; MERCHEN, N.R.; DRACKLEY, J.K.; GONZALEZ, S.S.; FAHEY Jr., G.C.; BERGER, L.L. 1997. The effects of chemical treatment of whole canola seed on lipid and protein digestion by steers. *J. Anim. Sci.* 75: 502-511.
- ALLEM, M.S. 2000. Effects of diets on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83: 1598 -1624.
- ANKRAH, P.; LOERCH, S.C.; DEHORITY, B.A. 1990. Sequestration, migration and lysis of protozoa in the rumen. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1869-1875.
- ANNISON, E.F.; BRYDEN, W.L. 1998. Perspectives on ruminant nutrition and metabolism. *Nutr. Res. Rev.* 11: 73-198.

- ASHES, J.R.; VINCENT WELCH, P.ST.; GULATI, S.K.; SCOTT, T.W.; BROWN, G.H.; BLAKELY, S. 1992. Manipulation of the fatty acid composition of milk by feeding protected canola seed. *J. Dairy Sci.* 75: 1090.
- BAER, R.J.; RYALI, J.; SCHINGOETHE, D.J.; KASPERSON, K.M.; DONOVAN, D.C.; HIPPEN, A.R.; FRANKLIN, S.T. 2001. Composition and properties of milk and butter from cows fed fish oil. *J. Dairy Sci.* 84: 345-353.
- BATEMAN, H.G.; SPAIN, J.N.; ELLERSIECK, M.R. 1996. Influence of by-product feeds and tallow on lactation performance of Holstein cows during two seasons. *J. Dairy Sci.* 79: 114-421.
- BATEMAN II, H.G.; JENKINS, T.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: 2451-2458.
- BAUMAN, D.E.; PERFIELD II, J.W.; DE VETH, M.J.; LOCK, A.L. 2003. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. *Proc. Cornell Nutr. Conf.* pp. 175-189.
- BEAM, T.M.; JENKINS, T.C.; MOATE, P.J.; KOHN, R.A.; 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: 2564-2573.
- BLAXTER, K.L.; CLAPERTON, J.L. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Br. J. Nutr.* 19: 511-522.
- BOCK, B.J.; HARMON, D.L.; BRANDT, R.T.Jr.; SCHNEIDER, J.E. 1991. Fat source and calcium level effects on finishing steer performance, digestion, and metabolism. *J. Anim. Sci.* 69: 2211-2224.
- BRAGACHINI, M.; CATTANI, P.; GALLARDO, M.; PEIRETTI, J. 2008. Forrajes conservados de alta calidad y aspectos relacionados al manejo nutricional. INTA-Precop II. Manual tecnico N° 6. 327 p.

- BRANDT, R.T.Jr. 1995. Use of supplemental fat to optimize net energy intake by feedlot cattle. Symposium: Intake by feedlot cattle. Oklahoma Agricultural Experiment Station –Division of Agricultural Sciences and Natural Resources Oklahoma State University. pp. 303-311.
- BREMMER, D.R., RUPPERT, L.D., CLARK, J.H. and 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: 176-188.
- BROOKS, C.C.; GARNER, G.B., GEHRKE, C.W.; MUHRER, M.E.; PFANDER, W.H. 1954. The effect of added fat on the digestion of cellulose and protein by ovine rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.* 13: 758-764.
- BU, D.P.; WANG, J.Q.; DHIMAN, T.R.; 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: 998-1007.
- BYERS, F.M.; SCHELLING, G.T. 1993. Los lípidos en la nutrición de los rumiantes. En: Church, C.D. ed. *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición* Acribia, Zaragoza, pp. 339-356.
- CASUTT, M.M.; SCHEEDER, M.R.; OSSOWSKI, D.A.; SUTTER, F.; SLIWINSKI, B.J.; DANILO, A.A. 2000. Comparative evaluation of rumen-protect fat, coconut oil and various oilseeds supplemented to fattening bulls. 2. Effects on composition and oxidative stability of adipose tissues. *Archiv der Tierernahrung* 53: 25-44.
- CHALUPA, W.; RICKABASUGH, W.B.; KRONFELD, D.S.; SKLAN, D. 1984. Rumen fermentation in vitro as influenced by long chain fatty acids. *J. Dairy Sci.* 67: 1439-1444.
- CHENG, K.J.; FORSBERG, C.W.; MINATO, H.; COSTERTON, J.W. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation without the rumen. In: Tsuda, T.; Sasaki Y. and Kawashima R, Ed. *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants: Proceedings of the Seventh International Symposium on Ruminant Physiology.* Academic Press, Inc., San Diego, CA. pp. 595.

- CHILLIARD, Y. 1993. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pig and rodents: A review. *J. Dairy Sci.* 76: 3897-3931.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, R.; DOREAU, M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Anim. Zootech.* 49: 181-205.
- CHIN, S.F.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; HA, Y.L.; PARIZA, M.W. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Comp. Anal.* 5: 185-197.
- CHOI, B.R.; PALMQUIST, D.L. 1996. High fat diets increase plasma cholecystokinin and pancreatic polypeptide, and decrease plasma insulin and feed intake in lactating cows. *J. Nutr.* 126: 2913-2919.
- CHOUINARD, P.Y.; GIRARD, V.; BRISSON, G.J. 1998. Fatty acid profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturations. *J. Dairy Sci.* 81: 471-481.
- CHRISTIE, W.W. 1981. The effects of diets and other factors on the lipid composition of ruminant tissue and milk. In: Christie, W.W. (eds.) *Lipid Metabolism in ruminant animals*. N.Y.: Pergamon Press. Pp.93-226.
- CHURCH, C.D. *El ruminante: fisiología digestiva y nutrición*. Acribia 900 p.
- CHRISTENSEN, R.A., DRACKLEY, J.K., LaCOUNT, D.W. and CLARK, J.H. 1994. Infusion of four long-chain fatty acid mixtures into the abomasum of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77: 1052-1069.
- COLLOMB, M.; SCHMID, A.; SIEBER, R.; WECHSLER, D.; RYHANEN, E. 2006. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects: Review. *Int. Dairy J.* 16: 1347-1361.

- CZERKAWSKI, J.W.; CLAPPERTON, J.L. 1984. Fats as energy-yielding compounds in the ruminant diet in *Fats in Animal Nutrition*. J. Wiseman, ed. Butterworths, Boston, MA. 249 p.
- DAVIS, C.L.; BROWN, R.E. 1970. Low-fat milk syndrome. In *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant*. A. T. Phillipson, ed. Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne, England. 545-565 p.
- DEMEYER, D.; DOREAU, M. 1999. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proc. Nutr. Soc.* 58: 593-607.
- DEMIREL, G.; WOOD, J.D.; ENSER, M. 2004. Conjugated linoleic acid content of the lamb muscle and liver fed different supplements. *Small Rum. Res.* 53: 23-28.
- DEPETERS, E.J.; CANT, J.P. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *J. Dairy Sci.* 75: 2043-2070.
- DEPETRIS, G.J. 2004. Características productivas y composición de la grasa corporal en novillos de terminación y terneras de destete alimentados con grano de maíz con alto contenido en aceite. Tesis Magister Scientiae Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina. 73 p.
- DEWHURST, R.J.; KING, P.J. 1998. Effects of extended wilting, shading and chemical additives on the fatty acids in laboratory grass silages. *Grass Forage Sci.* 53: 219-224.
- DHIMAN, T.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W.; GALLI, M.P.; ALBRIGHT, K.; 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: 1016-1027.
- DONOVAN, D.C.; SCHINGOETHE, D.J.; BAER, R.J.; RYALI, J.; HIPPEN, A.R.; FRANKLIN S.T. 2000. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83: 2620-2628.

- DOREAU, M.; FERLAY, A. 1994. Digestion and utilization of fatty-acids by ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45: 379-396.
- DRACKLEY, J.K., KLUSMEYER, T.H., TRUSK, A.M. and CLARK, J.H. 1992. Infusion of long-chain fatty acids varying in saturation and chain length into the abomasum of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75: 1517-1526.
- DUCKETT, S.K.; ANDRAE, J.G.; OWENS, F.N. 2002. Effect of high-oil corn or added corn oil on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *J. Anim. Sci.* 80: 3353-3360.
- ENGLE, T.E.; SPEARS, J.W.; FELLNER, V.; ODLE, J. 2000. Effects of soybean oil and dietary copper on ruminal and tissue lipid metabolism in finishing steers. *J. Anim. Sci.* 78: 2713-2721.
- ENSER, M.; HALLETT, K.G.; HEWETT, B.; FURSEY, G.A.J.; WOOD, J.D.; HARRINGTON, G. 1998. Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Science* 49: 329-341.
- ENSER, M.; SCOLLAN, N.D.; CHOI, N.J.; KURT, E.; HALLET, K.; WOOD, J.D. 1999. Effect of dietary lipid on the content of conjugated linoleic acid (CLA) in beef. *J. Anim. Sci.* 60: 143-146.
- ENSER, M. 2001. The role of fats in human nutrition. In: B. Rossell ed. *Oils and fats, V. 2. Animal carcass fats*. Leatherhead, Surrey, UK: Leatherhead Publishing. pp. 77-122.
- FAICHNEY, G.J.; GORDON, G.L.R.; WELCH, R.J.; RINTOUL, A.J. 2002. Effect of dietary free lipid on anaerobic fungi and digestion in the rumen of sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 53: 519-527.
- FELLNER, V.; SAUER, F.D.; KRAMER, K.J. 1995. Steady-state rates of linoleic acid biohydrogenation by ruminal bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 78: 1815-1823.

- GAGLIOSTRO, G. and CHILLIARD, Y. 1991. Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 2. Voluntary intake, milk production, and composition. *J. Dairy Sci.* 74: 499-509.
- GAGLIOSTRO, G.A. 2004. Control nutricional del contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche y su presencia en alimentos naturales funcionales. 2. Producción de leche alto CLA de vaca. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 24 (3-4): 137-163.
- GAGLIOSTRO, G.A.; RODRIGUEZ, A.; PELLEGRINI, P.A.; GATTI, P.; MUSET, G.; CASTAÑEDA, R.A.; COLOMBO, D.Y.; CHILLIARD, Y. 2006. Efectos del suministro de aceite de pescado solo o en combinación con aceite de girasol sobre las concentraciones de ácido linoleico conjugado (CLA) y omega 3 (n-3) en leche de cabra. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 26: 71-87.
- GALBRAITH, H.; MILLER, T.B., PATON, A.M.; THOMPSON, J.K. 1971. Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *J. Appl. Bact.* 34: 803-813.
- GARNSWORTHY, P.C. 1997. Fats in dairy cows diets. In recent advances in animal nutrition. In: Garnsworthy, P.C.; Wiseman, J. Ed. Nottingham Univ. Press. Nottingham, UK. pp. 87-103
- GEAY, Y.; BAUCHART, D.; HOCQUETTE, J.F.; CULIOLI, J. 2001. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod. Nutr. Dev.* 41: 1-26.
- GETACHEW, G.; DePETERS, E.J.; ROBINSON, P.H.; TAYLOR, S.J. 2001. In vitro rumen fermentation and gas production: influence of yellow grease, tallow, corn oil and their potassium soaps. *Anim. Feed Sci. Tech.* 93: 1-15.
- GRIINARI, J.M.; CHOUINARD, P.Y.; BAUMAN, D.E. 1997. Trans fatty acid hypothesis of milk fat depression revised. Proceedings of the Cornell nutrition conference for feed manufacturers, Cornell University, Ithaca, NY, pp. 208-216.

- GRIINARI, J.M.; CORL, B.A.; LACY, S.H.; CHOUINARD, P.Y.; NURMELA, K.V.; BAUMAN, D.E. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by D9-desaturase. *J. Nutr.* 130: 2285–2291.
- GRUMMER, R.R. 1995. Ruminal inertness vs. intestinal digestibility of fat supplements: can there be harmony. In *Proc. Cornell Nutr. Conf. for Feed Manufactures*. Cornell University, Ithaca, NY. pp.13-24
- GUAITA, M.S.; FERNÁNDEZ, H.H. 2005. Tabla de composición química de los alimentos para rumiantes. Área de investigación en producción animal. INTA Estación Experimental Agropecuaria Balcarce. Centro Regional Buenos Aires Sur. Argentina. 60 p.
- GULATI, S.K.; ASHES, J.R.; SCOTT, T.W. 1999. Hydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their incorporation into milk fat. *Anim. Feed Sci. Tech.* 79: 57-64.
- HA, Y.L.; GRIMM, N.K.; PARIZA, M.W. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881–1887.
- HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. 1988. Lipid metabolism in the rumen. In: P.N. Hobson (Ed.), *The rumen microbial ecosystem*. London: Elsevier Science Publishers .pp. 285-322.
- HARFOOT, C.G. 1981. Lipid metabolism in the rumen. In: W. W. Christie (ed.) *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*. Pergamon Press Ltd., Oxford, UK. pp. 21-55.
- HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: P.N. Hobson and C.S. Stewart, eds. *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, New York. pp. 382-426.
- HATCH, C.F.; PERRY, T.W.; MOHLER, M.T.; BEESON, W.M. 1972. Effect of added fat with graded levels of calcium and urea-containing rations for beef cattle. *J. Anim. Sci.* 34: 483-487.

- HEGARTY, R.S. 1999. Reducing rumen methane emission through elimination of rumen protozoa. *Aust. J. Agric. Res.* 50: 1321-1327.
- HENDERSON, C. 1973. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. *J. Agric. Sci.* 81: 107-112.
- HRISTOV, A.N.; KENNINGTON, L.R.; McGUIRE, M.A.; HUNT, C.W. 2005. Effect of diets containing linoleic acid-or oleic acid-rich oils on ruminal fermentation and nutrient digestibility, and performance and fatty acid composition of adipose and muscle tissues of finishing cattle. *J. Anim. Sci.* 83: 1312-1321.
- HU, H.B.; STAMPFER, M.J.; MANSON, J.E.; ASCHRERIO, A.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E. 1999. Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. *J. Clin. Nutr.* 70:1001-1008.
- IKWUEGBU, O.A.; SUTTON, J.D. 1982. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. *Br. J. Nutr.* 48:365
- IVAN, M.; MIR, P.S.; KOENING, K.M.; RODE, L.M.; NEILL, L.; ENTZ, T.; MIR, Z. 2001. Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Rum. Res.* 41: 215-227.
- JENKINS, T. C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76: 3851-3863.
- JENKINS, T.C.; JENNY, B.F. 1989. Effect of hydrogenated fat on feed intake, nutrient digestion and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72: 2316-2324.
- JENKINS, T.C.; PALMQUIST D.L. 1982. Effect of added fat and calcium on in vitro formation of insoluble fatty acid soaps and cell wall digestibility. *J. Anim. Sci.* 55: 957-963.
- JENKINS, T.C.; PALMQUIST, D.L. 1984. Effect of fatty acids or calcium salts on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *J. Dairy Sci.* 67: 978-986

- JOUANY, J.P. 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *J. Nutr.* 126: 1335-1346.
- KELLY, M.L.; BERRY, J.R.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; CHOUINARD, P.Y.; VAN AMBURGH, M.E.; BAUMAN, D.E. 1998. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr.* 128: 881–885.
- KEMP, P.Y.; LANDER, D.J. 1984. Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 130: 527-533.
- KEPLER, C.R.; TOVE, S.B. 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. 3. Purification and properties of a linoleate D12-cis, D11- trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 242: 5686–5692.
- KRAFT, J.; COLLOMB, M.; MÖCKEL, P.; SIEBER, R.; JAHREIS, G. 2003. Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids. *Lipids* 38: 657–664.
- KUCUK, O.; HESS, B.W.; LUDDEN, P.A.; RULE, D.C. 2001. Effect of forage:concentrate ratio on ruminal digestion and duodenal flow of fatty acids in ewes. *J. Anim. Sci.* 2001. 79: 2233-2240.
- KUCUK, O.; HESS, B.W.; RULE, D.C. 2007. Fatty acid compositions of mixed ruminal microbes isolated from sheep supplemented with soybean oil. *Res. Vet. Sci.* in press.
- LATIMORI, N.J.; KLOSTER, A.M.; AMIGONE, M.A.; GARCÍA, P.T.; CARDUZA, F.J.; PENSEL, N.A. 2005. Calidad de la carne bovina según genotipo y sistema de alimentación. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 25(1): 365-367.
- LOOR, J.J.; BANDARA, A.B.P.A.; HERBEIN, J. H. 2002. Characterization of 18:1 and 18:2 isomers produced during microbial biohydrogenation of unsaturated fatty acids from canola or soybean oil in the rumen of lactating cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 86: 422–432.

- LOOR, J.J.; UEDA, K.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y.; DOREAU, M. 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in response to dietary forage: concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: 2472–2485.
- LOOR, J.J.; FERLAY, A.; OLLIER, A.; UEDA, K.; DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. 2005. High-concentrate diets and polyunsaturated Oils alter trans and conjugated isomers in bovine rumen, blood and milk. *J. Dairy Sci.* 88: 3986-3999.
- McCARTHY, R.D.J.; KLUSMEYER, T.H.; VICINI, J.L.; CLARK, J.H.; NELSON, D.R. 1989. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 72: 2002-2016.
- MACHMUELLER, A.; OSSOWSKI, D.A.; WANNER, M.; KREUZER, M. 1998. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec) *Anim. Feed Sci. Technol.* 71: 117-130.
- McGUIRE, M. A.; McGUIRE, M. K. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *J. Anim. Sci.* 77: 1-8.
- MACZULAK, A.E.; DEHORITY, B.A.; PALMQUIST, D.L. 1981. Effects of long chain fatty acids on growth of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 856.
- MANSBRIDGE, R.J.; BLAKE, J.S. 1997. Nutricional factors affecting the fatty acids composition of bovine milk. *Br. J. Nutricion* 78(1): 37-47.
- MARTIN, S.A.; JENKINS, T.C. 2002. Factors affecting conjugated linoleic acid and trans-C18:1 fatty acid production by mixed ruminal bacteria *J. Anim. Sci.* 80: 3347–3352.
- MARTIN, J.C.; VALEILLE, K. 2002. Conjugated linoleic acids: all the same or to everyone its own function?. *Reproduction Nutrition Development.* 42: 525-536.

- MOATE, P.J.; CHALUPA, W.; JENKINS, T.C.; BOSTON, R.C. 2004. A model to describe ruminal metabolism and intestinal absorption of long chain fatty acids. *Anim. Feed Sci. Technol.* 112: 79-105.
- MONTGOMERY, S.P.; DROUILLARD, J.S.; NAGARAJA, T.G.; TITGEMEYER, E.C.; SINDT, J.J. 2008. Effects of supplemental fat source on nutrient digestion and ruminal fermentation in steers. *J. Anim. Sci.* 86: 640-650.
- MORAND-FEHR, P.; TRAN, G. 2001. La fraction lipidique des aliments et les corps gras utilisés en alimentation animale. *INRA Prod. Anim.* 14: 285-302.
- MOULD, F.L.; ORSKOV, E.R.; MANN, S.A. 1983. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10: 15-30.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1989. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 6th rev. ed. National academy of sciences, Washington, D.C. pp 750.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th ed. National academy of sciences, Washington, D.C. pp 381.
- NAVARRO, J.A. 2007. Características productivas y calidad de la res y perfil de ácidos grasos de la carne de terneras engordadas a corral con diferentes niveles de semilla de girasol o soja. Tesis Magister Scientiae, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina. 110 p.
- NEWBOLD, C.J.; CHAMBERLAIN, D.G. 1988. Lipids as rumen defaunating agents. *Proc. Nutr. Soc.* 47: 154.
- OFFER, N.W.; MARSDEN, M.; DIXON, J.; SPEAKE, B.K.; THACKER, F.E. 1999. Effect of dietary fat supplements on levels of n-3 poly-unsaturated fatty acids trans acids and conjugated linoleic acids in bovine milk. *Anim. Sci.* 69: 613-625.

- OFFER, N. W.; SPEAKE, B. K.; DIXON, J.; MARSDEN, M. 2001. Effect of fish-oil supplementation on levels of (n-3) poly-unsaturated fatty acids in the lipoprotein fractions of bovine plasma. *Anim. Sci.* 73: 523-531.
- ONETTI, S.G.; SHAVER, R.D.; McGUIRE, M.A.; GRUMMER, R.R. 2001. Effect of type and level of dietary fat on rumen fermentation and performance of dairy cows fed corn silage-based diets. *J. Dairy Sci.* 84: 2751-2759.
- ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92: 499-503.
- PALMQUIST, D.L.; JENKINS, T.C. 1980. Fat in lactation rations: review. *J. Dairy Sci.* 63: 391-395.
- PALMQUIST, D.L.; JENKINS, T.C.; JOYNER Jr., A.E. 1986. Effect of dietary fat and calcium source on insoluble soap fermentation in the rumen. *J. Dairy Sci.* 69: 1020.
- PANTOJA, J.; FIRKINS, J.L.; EASTRIDGE, M.L.; HULL, B.L. 1994. Fatty acid digestion in lactating dairy cows fed fat varying in degree of saturation and different fiber sources. *J. Dairy Sci.* 79: 575-584.
- PANTOJA, J.; FIRKINS, J.L.; EASTRIDGE, M.L. 1996. Fatty acid digestibility and lactation performance by dairy cows fed fats varying in degree of saturation. *J. Dairy Sci.* 79: 429-437.
- PARIZA, P.W.; ASHOOR, W.A.; CHU, F.S.; LUND, D.B. 1979. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Lett.* 7: 63-69.
- RAES, K.; FIEVEZ, V.; CHOW, T.T.; ANSORENA, D.; DEMEYER, D.; De SMET, S. 2003. Effect of diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids on muscle lipids and fatty acids in Belgian Blue double-muscled young bulls. *Reprod. Nutr. Dev.* 43: 331-345.

- RAES, K.; De SMET, S.; DEMEYER, D. 2004. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 113: 199-221.
- RAMASWAMY, N.; BAER, R.J.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R.; KASPERSON, K.M.; WHITLOCK, L.A. 2001. Composition and flavor of milk and butter from cows fed fish oil, extruded soybeans, or their combination. *J. Dairy Sci.* 84: 2144–2151.
- RAMIREZ, J.E.; ZINN, R.A. 2000. Interaction of dietary magnesium level on the feeding value of supplemental fat in finishing diets for feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 78: 2072-2080.
- ROCHE, H.M.; NOONE, E.; NUGENT, A.; GIBNEY, M.J. 2001. Conjugated linoleic acid: a novel therapeutic nutrient? *Nutr. Res. Rev.* 14: 173-187.
- SCHMID, A.; COLLOMB, M.; SIEBER, R.Y.; BEE, G. 2006. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review. *Meat Sci.* 73: 29–41.
- SCHREZENMEIR, J.; JAGLA, A. 2000. Milk and diabetes. *J. Am. College of Nutrition.* 19(2): 176-190.
- SCHWARTZ, H.M.; GILCHRIST, J.K. 1975. Microbial interactions with the diet and the host animal. In: I. W. McDonald and A.C.I. Warner, eds. *Digestion and metabolism in the ruminant*, Univ. of New England Publishing Unit, Armidale, NSW, Australia. Pp. 165
- SCOLLAN, N.D.; DHANOA, M.S.; CHOI, N.J.; MAENG, W.J.; ENSER, M.; WOOD, J.D. 2001. Biohydrogenation and digestion of long chain fatty acids in steers fed on different sources of lipid. *J. Agric. Sci.* 163: 345-355.
- STANTON, C.; MURPHY, J.; McGRATH, E.; DEVERY, R. 2003. Animal feeding strategies for conjugated linoleic acid enrichment of milk. In: Sebedio, J.L.; Christie, W.W.; Adolf, L. (eds.) *Advances in conjugated linoleic acid research 2* Champaign, IL, USA: AOAC Press. pp.123-145

- SUTTON, J.D.; KNIGHT, R.; MCALLAN, A.B.; SMITH, R.H. 1983. Digestion and synthesis in the rumen of sheep given diets supplemented with free and protected oils. *Br. J. Nutr.* 49: 419-432.
- UEDA, K.; FERLAY, A; CHABROT, J.; LOOR, J. J.; CHILLIARD, Y.; DOREAU M. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage: concentrate ratios. *J. Dairy Sci.* 86: 3999-4007.
- VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 36: 53-63.
- VEIRA, D.M.; IVAN, M.; JUI, P.Y. 1983. Rumen ciliate protozoa: Effects on digestion in the stomach of sheep. *J. Dairy Sci.* 66: 1015-1022.
- VEIRA, D.M.; IVAN, M.; JUI, P.Y. 1984. The effect of ciliate protozoa on the flow of amino acids from the stomach of sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 64: 22-23.
- WACHIRA, A.M.; SINCLAIR, L.A.; WILKINSON, R.G.; HALLETT, K.; ENSER, M.; WOOD, J.D. 2000. Rumen biohydrogenation of n-3 polyunsaturated fatty acids and their effects on microbial efficiency and nutrient digestibility in sheep. *J. Agric. Sci.* 135: 419-428.
- WACHIRA, A.M.; SINCLAIR, L.A.; WILKINSON, R.G.; ENSER, M.; WOOD, J.D.; FISHER, A.V. 2002. Effects of dietary fat source and breed on the carcass composition, n-3 polyunsaturated fatty acid and conjugated linoleic acid content of sheep meat and adipose tissue. *Br. J. Nutr.* 88: 697-709.
- WHITLOCK, L.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R.; KALSCHEUR, K.F.; BAER, R.J.; RAMASWAMY, N.; KASPERSON, K.M. 2002. Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase CLA in milk of dairy cows more than when fed separately. *J. Dairy Sci.* 85: 234-243.
- WILDE, P.F.; DAWSON, R.M. 1966. The biohydrogenation of alpha-linolenic acid and oleic acid by rumen microorganisms. *Biochem. J.* 98: 469-475.

- WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. 1992. The rumen protozoa. Springer-Verlag Inc., New York. pp 133-164.
- WOOD, J.D.; RICHARDSON, R.I.; NUTE, G.R.; FISHER, A.V.; CAMPO, M.M.; KASAPIDOU, E.; SHEARD, P.R.; ENSER, M. 2003. Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Sci.* 66: 21-32.
- WU, Z., OHAJURUKA, O.A. and PALMQUIST, D.L. 1991. Ruminal synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74: 3025-3034.
- YANG, A.; LANARI, M.C.; BREWSTER, M.; TUME, R.K. 2002. Lipid stability and meat color of beef from pasture-and grain-fed cattle with or without vitamin E supplement. *Meat Sci.* 60: 41-50.
- ZINN, R.A. 1988. Comparative feeding value of supplemental fat in finishing diets for feedlot steers supplemented with and without monensin. *J. Anim. Sci.* 66: 213-227.
- ZINN, R. A. 1989. Influence of level and source of dietary fat on its comparative feeding value in finishing diets for feedlot steers: metabolism. *J. Anim. Sci.* 67: 1038.
- ZINN, R.A.; SHEN, Y. 1996. Interaction of dietary calcium and supplemental fat on digestive function and growth performance in feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 74: 2303-2309.

ANEXO

Anexo 1

Protocol for fatty acid extraction and methylation in plasma samples – IGER

Fat extraction

Reagents

Chloroform (Lennox)

Methanol (Lennox)

Butylated hydroxytoluene (BHT) (Sigma)

Potassium chloride (Lennox)

Equipment

Whatman No. 1 filter paper (Sigma)

Vortex mixer

Sintered glass funnel

50 mL red capped tube (Sarstedt, product number 62.559)

Pipette and pipette tips (1 mL pipette) (Lennox, product number: 702521)

Pasteur pipettes (Lennox)

Centrifuge

Glassware for making up solutions

Water bath

Solutions

Chloroform:methanol 2:1

1 L of chloroform added to 500 mL methanol. Add 0.75 g of BHT and mix well.

0.88% potassium chloride

Add 0.88 g of potassium chloride in 100 mL of distilled water

water: methanol 1:1

Add 1 L of distilled water in 1 L of methanol

Procedure

1. To 1g of blood plasma or rumen fluid add 25mls chloroform: methanol (2:1; with added antioxidant – 0.005% BHT). Vortex mix for 2 minutes. Allow to stand for 5 minutes.
2. Filter the mixture through a sintered glass funnel (with Whatman No. 1 filter paper) into a 50 mL red capped tube. (Wet filter paper first with chloroform: methanol mix).
3. Rinse red-capped tube with approx. 2 mls of chloroform: methanol (2:1), and use to wash filter paper.
4. Once washed, allow filter paper to dry, add a volume of 0.88% potassium chloride equal to approx. one quarter the volume of the filtrate. (Use 0.88% potassium chloride to balance tubes for centrifugation). Cap tube and vortex for 1 minute.
5. Centrifuge at 3000 rpm for 4 minutes (separation of the two phases of the system should have occurred without any interfacial fluff).
6. Carefully remove upper layer completely and discard.
7. To the remaining phase add a volume of water: methanol (1:1), (Use water: methanol to balance tubes for centrifugation) repeat washing procedure twice.

8. Filter the lower phase into a glass methylation tube and dry down to approx 2mls under nitrogen in the heating block (or bath).
9. Store at -20° C.

Methylation

Reagents

Dry methanol (Lennox)

Desferrioxamine mesylate salt, Desferal (Sigma)

Ascorbic acid (Lennox)

KOH (Lennox)

Hexane (Lennox)

HCl (Lennox)

Acetonitrile (CH₃CN) (Lennox)

Acetic acid (CH₃COOH) (Lennox)

Equipment

16 x 160 mm test tubes with Teflon-lined screw caps (Lennox -1636/30 culture tube). (Same tube that for grass methylation).

Syringe and filters

G.C vials (Varian 3800 GC, CP 8400 AutoSampler – 100 vials/2mL, JVA)

Pipette and □ipette tips (1 mL □ipette) (Lennox, product number: 702521)

Pasteur pipettes (Lennox)

Centrifuge

Glassware for making up solutions

Solutions

Desferal Solution

Add 0.25 g of desferal in 10 mL of distilled water.

Ascorbic acid solution

To 25 g of ascorbic acid add distilled water up to 100 mL.

KOH 10 N solution

Add 56.1 g of KOH in 100 mL of distilled water.

HCl solution

Add 37 mL of HCl in 63 mL of distilled water.

CH₃CN/0.14% CH₃COOH (vol/vol)

Add 0.14 mL of acetic acid to 100 mL of acetonitrile.

Procedure

1. Dissolve the extracted lipids in 5 ml methanol, 100 µl of Desferal, 1 ml of a 25% water solution of ascorbic acid, 0.5 ml of a 10 N KOH
2. Leave in the dark at room temperature for 14 hr
3. Add 10 ml of n-hexane and 7 ml H₂O

4. Acidify to pH 3-4 with 37% HCl (aprox. 0.35 ml)
5. Centrifuge (1 h at 900 x g)
6. Collect the hexane phase, then evaporate
7. Dissolve residue in 0.5 mL CH₃CN/0.14% CH₃COOH (vol/vol)

References

Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Volume 2, Edited by Jean-Louis Sebedio, William W. Christie and Richard Adlof. Pag. 95. Published by AOCS Press Champaign, Illinois, USA.

Banni, S., G. Carta, M. S. Contini, E. Angioni, M. Deiana, M. A. Dessi, M. P. Melis, and F. P. Corongiu. 1996. Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products, and lamb tissues. *Nutritional Biochemistry*. 7:150-155.

Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226; 497-509.

Anexo 2

MODIFIED DIRECT METHYLATION PROCEDURE

By Juan J. Loor, Ph. D., Post-doctoral Research Associate, Equipe DAN-TALL, INRA-URH, 2001-2002

Suitable sample types: Feedstuffs (silage, hay, fresh grass/legume, mixed concentrate, seeds, grains) ruminal contents, ruminal bacteria, duodenal contents, ileal contents, feces.

Original procedure: Sukhija, P. and D. Palmquist, 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. J. Agric. Food Chem. 36:1202-1206.

Reference to cite modified procedure: J. Loor, K. Ueda, A. Ferlay, Y. Chilliard, and M. Doreau. 2002. Patterns of biohydrogenation and duodenal flow of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) are altered by dietary fiber level and linseed oil in dairy cows. J. Dairy Sci 85 (Suppl. 1):1255 (Abst.).

PROCEDURE:

1. Weigh samples into tubes with a minimum capacity of 60 mL that could be heated in a water bath (or heating block) and centrifuged at 2000-3000 *g*. The chosen amount of sample to be methylated does not need to be fixed and can vary according to the "nature" of the sample. The following quantities have been used successfully at INRA- DAN to determine total fatty acid concentrations:

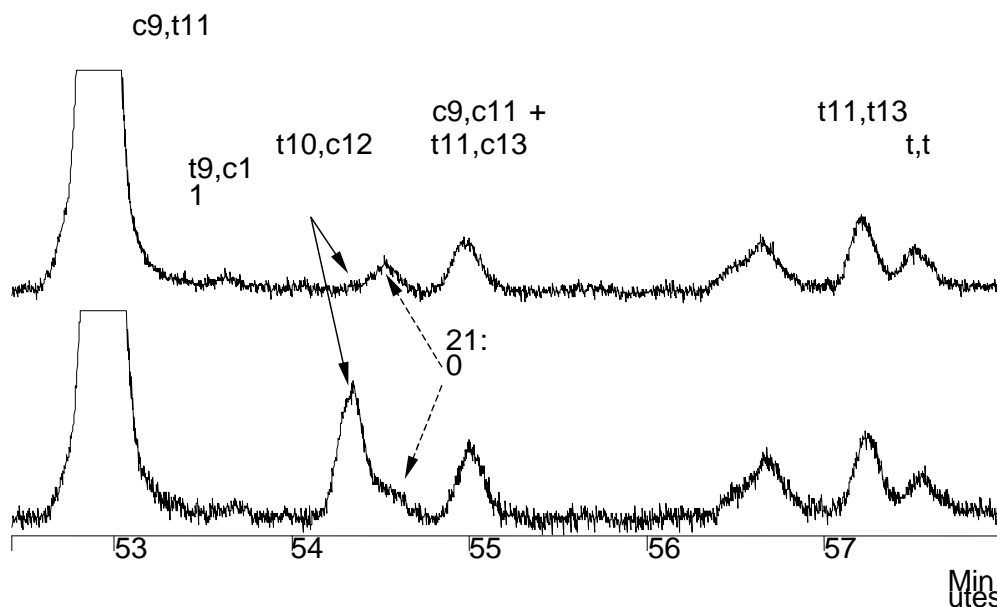
<u>Sample type</u>	<u>Quantity</u>
Grass hay g	0.7-1
Mixed concentrate, soybean meal g	0.7-0.8
From cows fed 0 or 3% oil:	
ruminal bacteria, duodenal contents, feces	0.5-0.8
g Grass silage	0.8-1 g
Whole ruminal fluid (from cows fed 2.5 or 5% oil)* g	0.3-0.4

*A homogeneous sample of ruminal fluid or ruminal bacteria from oil-fed cows contains substantial amounts of lipid such that minimal amounts (0.3-0.5 g) of sample can be used for methylation. If larger amounts are used, chromatographic separation of *trans*- and *cis*-18:1 isomers would require small injection volumes, high split ratios, or both. The sample also may have to be diluted prior to injection. A similar analogy could be

used when trying to decide the amount of sample needed for methylation of fatty acids from samples such as ruminal bacteria, duodenal contents, high-lipid feed ingredients, etc.

2. Add a suitable amount of internal standard (free acid or methyl ester) contained in 0.5 to 1 mL of solvent (i.e. hexane, benzene, toluene). Fatty acids such as 19:0, 17:0, 17:1, and 21:0 are not recommended as internal standards because they are already

present in samples (in variable amounts depending on diet) of ruminant origin. In the 100 m CPSil-88 capillary column, 19:0 elutes in between the 18:1 isomers and may compromise the identification of *trans*16-18:1 and *cis*15-18:1. *Trans*10,*cis*12-CLA elutes (and sometimes co-elutes) immediately before 21:0:



**Chromatograms illustrating the separation of conjugated linoleic acids (CLA) in milk fat from cows fed the high-concentrate diet. Top chromatogram is from a pooled sample (n = 4) taken on wk 4 of the study, and the bottom chromatogram is from a pooled sample (n = 4) taken on d 5 of a continuous infusion of *trans*10,*cis*12-CLA (5 g/d) conducted during an additional wk (Lor et al., 2002) for all dietary treatments.

Although present in small amounts (particularly in ruminants fed fish oil or by-products), tricosanoic acid (23:0) can be used as internal standard in samples of ruminant origin as it does not elute in the 18:1 or CLA region.

At INRA-DAN, we currently use 23:0-methyl ester as internal standard. We prefer using the methyl ester form to avoid risks of incomplete methylation if the free acid is used.

The acid is dissolved in hexane to make a standard solution containing 0.2 mg/0.5 mL (~0.2-0.4% of total fatty acids in sample). We add 0.5 mL of this solution to each sample.

3. Add 6 mL of chloroform followed by 9 mL of 0.78N HCl-methanol (made by adding 6.5 mL 37% HCl to 93.5 mL methanol immediately before methylations; do not store this mixture !!) to each sample. Cap tubes (Teflon-lined caps) very tightly and slowly shake in a circular motion by hand to ensure the whole sample is thoroughly wet. Avoid too much sample left on the wall of the tube

4. Heat samples in a dry block or water bath at 65-70 °C for 2.5 h. This range of temperature, compared with heating at 80°C or higher, was shown to be adequate to minimize (~5% isomerization of cis9,trans11-CLA compared with 60°C for 1 h) isomerization of cis9,trans11-CLA and trans10,cis12-CLA (Park et al., 2001). However, formation of artifacts (~5% compared with room temperature conditions) could still occur at this temperature and may appear in your chromatogram as poorly resolved peaks. We have obtained such artifacts (or unknown/ghosts peaks) in the CLA region close to trans11,trans13-CLA.

After samples are initially heated, fumes will be produced and pressure will start building up inside the tube. It is extremely important that tubes are COMPLETELY sealed during heating or methyl esters will be lost. It is recommended that tubes are checked for leaks every 2-5 min during the first 30 min of heating, then every 10 min until the end of the heating period.

5. Let samples cool at room temperature.

6. Add 15 mL 6% K₂CO₃ to each sample to neutralize the pH. Low pH of samples will damage highly-polar columns such as the CPSil-88.

7. Add 10 mL of hexane to each sample, and then shake vigorously by hand for 10-20 seconds. Centrifuge at 2000-3000g, 4 °C, for 10 min. Collect the top hexane layer into a clean tube. Repeat this step one more time.

8. The combined hexane containing methyl esters is evaporated completely under N₂ gas, or until about 2 mL remain in tubes, in a water bath or heating block at 35-40 °C. If dried to completion, 2 mL fresh hexane is added to the sample to reconstitute the methyl esters. Gently mix the hexane along the wall of the tube to ensure methyl esters go into solution.

“Cleaning” step and elution of methyl esters

9. The portion of hexane containing the methyl esters is dispensed into a Pasteur pipette filled with Florisil (an adsorbent) to retain solid particles and pigments while allowing the complete recovery of methyl esters by eluting them with hexane-diethyl ether (95:5 v/v).

Preparation of the Florisil column:

Portions of glass wool are used to seal the bottom of a Pasteur pipette (preferably the long pipettes). After ensuring that a good plug is in place, dispense the Florisil into the pipette up to about 2-3 cm from the top.

The Florisil column is placed into a flask/beaker and rinsed with 5 mL of hexane before dispensing the sample containing the methyl esters.

10. Place the pipette-Florisil column into a 20 mL tube into which methyl esters will be collected. Dispense the hexane containing the methyl esters into the Florisil column. Rinse the initial tubes that contained the hexane-methyl esters two times with 3 mL hexane and dispense it into the Florisil column.

Elute methyl esters from the column with 10-15 mL hexane-diethyl ether (95:5 v/v).

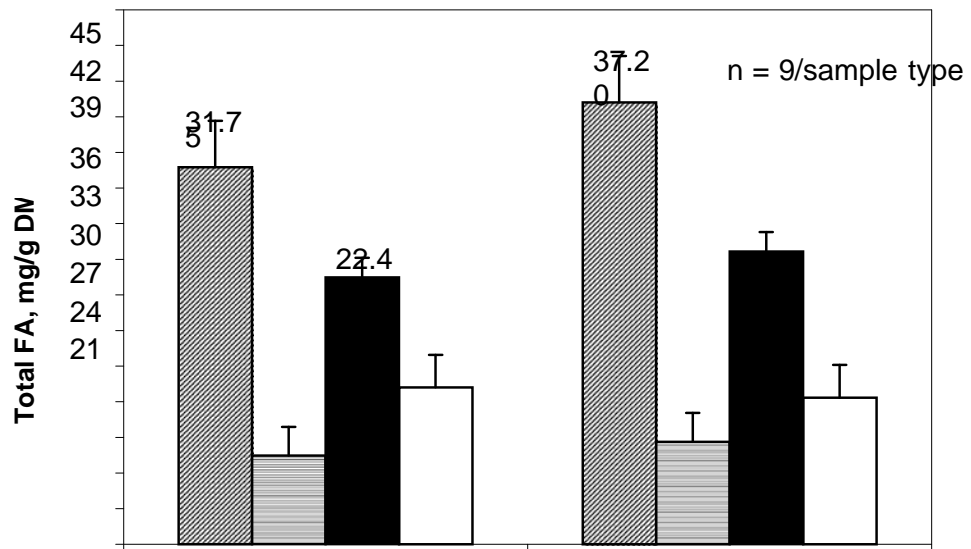
10. Evaporate methyl esters completely under N₂ gas. Reconstitute methyl esters with 1 mL hexane, vortex, and transfer this volume into a GC crimp vial. Add another 0.5 mL into the original tube, vortex, and transfer the hexane into the GC vial. The sample is ready for chromatographic analysis.

Comments on the suitability of the procedure

As part of one of the “work packages” of the “Healthy Beef” project (under the auspices of the European Union), the direct methylation procedure reported by Sukhija and Palmquist (1988) was compared with the traditional Folch extraction followed by a two- step methylation with sodium methoxide and HCl-methanol to determine differences in recovery of total fatty acids and fatty acid profiles. Partners that took place in the “ring test” included, the Institute of Grassland and Environmental Research (IGER), INRA, and the University of Ghent (RUG).

Results (summarized in the figure below) indicate that the direct methylation procedure of Sukhija and Palmquist was superior in the recovery of total fatty acids from duodenal, fecal, and ruminal samples compared with the Folch lipid-extraction and methylation. Both methods yielded similar values for total fatty acids in grass silage. Overall, these observations were in line with previous comparisons obtained by Sukhija and Palmquist (1988), Lepage and Roy (1984), and Lepage and Roy (1986).

The current modified procedure allows for direct extraction-methylation of fatty acids from a wide range of samples without prior purification and extraction.



References:

Sukhija, P. and D. Palmquist, 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. J. Agric. Food Chem. 36:1202-1206.

Lepage, G. and C. Roy. 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. J. Lipid Res. 25:1391-1396.

Lepage, G and C. Roy. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one- step reaction. J. Lipid Res. 27:114-120.

Lor, J. J., A. Ferlay, M. Doreau, and Y. Chilliard. 2002. Intestinal supply of *trans*10,*cis*12-18:2 lowers milk fat output in Holstein cows fed a high- or low-fiber diet with two levels of linseed oil. J. Dairy Sci. 85(Suppl. 1):1189.

Park, Y., K. Albright, Z. Cai, and M. Pariza. 2001. Comparison of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial (Trimethylsilyl)diazomethane. J. Agric. Food Chem. 49:1158-1164.