

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

**EFFECTO DE LA VITAMINA E EN EL METABOLISMO RUMINAL *IN VITRO*
DE DIETAS CON ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO PROTEGIDO**

GEMMA BERENICE CRUZ ORTEGA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO


2015

La presente tesis, titulada: **EFFECTO DE LA VITAMINA E EN EL METABOLISMO RUMINAL *IN VITRO* DE DIETAS CON ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO PROTEGIDO**, realizada por la alumna Gemma Berenice Cruz Ortega. Bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

Consejero



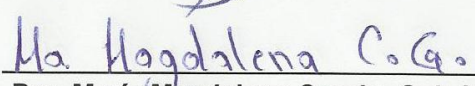
Dr. Omar Hernández Mendo

Asesor



Dr. Ricardo Bárcena Gama

Asesor



Dra. María Magdalena Crosby Galván

Asesor



Dra. Mónica Ramírez Mella

Montecillo, Texcoco, Estado de México, octubre de 2015

RESUMEN GENERAL

EFFECTO DE LA VITAMINA E EN EL METABOLISMO RUMINAL IN VITRO DE DIETAS CON ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO PROTEGIDO

Gemma Berenice Cruz Ortega, MC

Colegio de Postgraduados, 2015

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la vitamina E en la fermentación ruminal y perfil de ácidos grasos en dietas con ácido linoleico conjugado (CLA), *in vitro*. Se evaluaron cuatro tratamientos en un diseño en bloques completamente al azar: 1) testigo (dieta base + 12.3 g de CLA protegido (CLAp) /kg de alimento); 2) bajo (testigo + 1.17 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS); 3) medio (testigo + 2.33 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS); 4) alto (testigo + 3.5 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS). El CLAp contenía 10 g de *cis*-9, *trans*-11 y 10 g de *trans*-10, *cis*-12 CLA por cada 100 de CLAp. Se utilizó α -tocoferol al 50% como fuente de vitamina E, y líquido ruminal de dos becerros Holstein de 2 años de edad. Las muestras de las dietas se incubaron a 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h, para identificar los cambios en la digestibilidad de materia seca (DIVMS), producción de gas *in vitro*, concentración de N-NH₃ en rumen, producción de AGVs, y concentración de ácidos grasos de cadena larga. Los resultados se analizaron con el procedimiento GLM de SAS, usando la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para la comparación de medias. No hubo diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$) en ninguna de las variables evaluadas, a excepción de las concentraciones de ácidos grasos de cadena larga donde el ácido linoleico incrementó 31.43% con el nivel medio de vitamina E, con respecto al testigo; mientras que el linolénico incrementó 21.23 y 16.59% con el nivel medio y alto de vitamina E, respectivamente, respecto al testigo. Los niveles de vitamina E usados en el presente estudio, no afecta la fermentación ruminal, pero existe la posibilidad de modificar el metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga cuando se usan dietas con ácido linoleico conjugado protegido.

Palabras clave: Vitamina E, fermentación y ácido linoleico

ABSTRACT

EFFECT OF VITAMIN E ON THE *IN VITRO* RUMINAL METABOLISM OF DIETS WITH PROTECTED CONJUGATED LINOLEIC ACID.

Gemma Berenice Cruz Ortega, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

The objective of the present study was to evaluate the effect of vitamin E on ruminal fermentation and the fatty acids profile in diets with conjugated linoleic acid (CLA), *in vitro*. Four treatments were evaluated, using a completely random block design: 1) control (base diet + 12.3 g protected CLA (CLAp) 7kg feed); 2) low (control + 1.17 mg α -tocopheryl acetate/kg DM); 3) medium (control + 2.33 mg α - tocopheryl acetate/kg DM); high (control + 3.5 mg α - tocopheryl acetate/kg DM). The CLAp contained 10 g *cis*-, *trans*-11 and 10 g *trans*-10, *cis*-12 CLA for each 100 g CLAp. We used α -tocopheryl at 50% as a source of vitamin E, and ruminal liquid from two Holstein calves, 2-years old. The diet samples were incubated for 6, 9, 12, 24,48, and 72 h to identify the changes in the digestibility of dry matter (DIVMS), *in vitro* gas production, N-NH₃ concentration in the rumen, VFA production, and concentration of long-chain fatty acids. The results were analyzed using the GLM procedure in SAS, using the Tukey test ($P \leq 0.05$) for mean comparison. There were no differences ($P > 0.05$) among the treatments for any of the evaluated variables, with the exception of the concentration of long-chain fatty acids, where the linoleic acid increased by 31.43% with the medium level of vitamin E, with respect to the control, while linolenic acid increased by 21.23 and 16.5% with the medium and high levels of vitamin E, respectively, with respect to the control. The levels of vitamin E used in the present study do not affect ruminal fermentation; although there is a possibility of modifying the metabolism of long-chain fatty acids when using diets with protected conjugated linoleic acid.

Key words: Vitamin E, fermentation, linoleic acid.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante los estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados, por brindarme la oportunidad de realizar una maestría en el posgrado de Recursos Genéticos y Productividad – Ganadería.

A la línea de investigación 7: inocuidad, calidad de alimentos y bioseguridad por su apoyo económico y facilidades otorgadas para la realización de esta investigación.

Al fideicomiso 167304 por el apoyo económico brindado para la realización de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por permitirme terminar una etapa más de mi vida, por sus bendiciones y por darme la fortaleza para seguir adelante.

Al Dr. Omar Hernández Mendo por su paciencia, apoyo y dedicación que tuvo a lo largo de mi formación.

A los miembros del consejo particular, Dr. José Ricardo Bárcena Gama, Dra. María Magdalena Crosby Galván y Dra. Mónica Ramírez Mella, por su dedicación, colaboración, sugerencias y principalmente por su apoyo en cada etapa en la que se realizó esta investigación.

A la Dra. María Magdalena Crosby Galván y la Ing. Elsa Margarita Crosby Galván por las asesoría y apoyo incondicional para la realizar la investigación en laboratorio y principalmente por su amistad, muchas gracias.

A él Dr. José G. Herrera Haro por su apoyo desde el momento que llegamos al Colegio de Postgraduados, por su amistad y sus enseñanzas.

Debo agradecer de manera muy especial a esa personita que me impulsó a seguir adelante, a mi amor, Alejandro Ernesto Ruiz Pereyra con quien he compartido los mejores años y que pese a las adversidades siempre ha estado a mí lado. Y gracias a mi gran amor Miguel Alejandro Ruiz Cruz por llegar a mí vida, por ser mi motor y mí fortaleza cada día, los amo.

A mis papás Alfonso y Ana, por inculcarme los valores para enfrentar la vida, por guiarme en cada etapa de mi vida, por su amor incondicional y por estar siempre a mi lado. A mis hermanas Mayo, Meli y Vale por su amor, por su apoyo moral, por preocuparse siempre por mí y por darme unos sobrinos hermosos, los amo.

A mis suegros Alejandro y Leticia por el apoyo enorme que nos han brindado, por estar siempre al pendiente de nosotros y principalmente por darnos ese empujoncito para seguir adelante, gracias infinitas. Los adoro.

A mis amigos Yuridia Bautista, Liliana Valdivieso, Areli Gutiérrez, Isabel Montiel, Luis Zenteno, Jorge Vázquez, Francisco Cigarroa, Gustavo Torres, Octavio López, Danilo Granados por su amistad incondicional, por su apoyo en la realización de esta investigación y por ser parte de mi vida.

En especial quiero agradecer a Bernardino Espinoza Velasco por su apoyo total en el desarrollo de toda esta investigación, por su paciencia y principalmente te agradezco tu sincera amistad, Gracias Bro.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Planteamiento del problema..... | 2 |
| 2. Objetivos | 3 |
| Objetivo general..... | 3 |
| 3. Hipótesis | 3 |
| II. Revisión de literatura | 3 |
| 2.1. Lípidos | 3 |
| 2.2. Ácidos grasos | 4 |
| 2. 2. 1. Clasificación de los ácidos grasos | 5 |
| 2. 3. Ácido linoleico conjugado..... | 6 |
| 2. 4. Metabolismo de los lípidos en rumiantes | 7 |
| 2. 5. Vitamina E..... | 9 |
| 2. 5. 1. Propiedades | 10 |
| 2. 6. Vitamina E en rumiantes..... | 10 |
| 2. 7. Digestibilidad <i>in vitro</i> | 12 |
| 2. 8. Producción de gas | 13 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 15 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 20 |
| 4.1. Producción de gas | 20 |
| 4.2. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca | 21 |

| | |
|--|----|
| 4.3. Producción de ácidos grasos volátiles | 23 |
| 4.4. Nitrógeno amoniacal..... | 24 |
| 4.5. Perfil de ácidos grasos en el rumen | 25 |
| V. CONCLUSIÓN..... | 29 |
| VI. LITERATURA CITADA | 30 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Efecto de la vitamina E en la producción de gas <i>in vitro</i> (mL/g MS) en dietas con CLAp. | 21 |
| Cuadro 2. Efecto de la vitamina E en la digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca. | 23 |
| Cuadro 3. Efecto de la vitamina E en la producción de AGVs y concentración de nitrógeno amoniacal. | 25 |
| Cuadro 4. Efecto de la vitamina E en el perfil de ácidos grasos de cadena larga en líquido ruminal con CLAp en la dieta. | 28 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|---|
| Figura 1. Clasificación de los ácidos grasos según sus enlaces químicos modificado de Coronado <i>et al.</i> (2006)..... | 6 |
|--|---|

I. INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos son los principales constituyentes de grasas y aceites, y se clasifican de diferentes maneras, principalmente por la posición del primer doble enlace y número de estos (Pérez y Lorenzo, 2006). Banegas *et al.* (2006) consideran que la prevalencia de enfermedades relacionadas al consumo de grasas se debe básicamente al consumo de grasas saturadas *trans*. Ante esta situación, surge la necesidad de cambiar al consumo de ácidos grasos insaturados, como el ácido linoleico conjugado (CLA) (Torrejón y Uauy, 2011).

El ácido linoleico conjugado presenta propiedades benéficas a la salud como prevención del cáncer, atenuación de aterosclerosis, diabetes y efectos anti-obesidad (Gagliostro, 2004). En este sentido, Silva *et al.* (2007) encontraron que tanto la leche como productos lácteos ricos en CLA presentan una disminución considerable de los ácidos grasos saturados y un aumento de los ácidos grasos insaturados. Recientemente, se ha usado el CLA para enriquecer la leche; sin embargo, su adición representa disminución en el contenido de la grasa en la leche (Baumgard *et al.*, 2000; Piperova *et al.*, 2004; de Veth *et al.*, 2005). La grasa es uno de los nutrientes principales de la leche, son fuentes de energía, transportan vitaminas (A, D, E y K) y proporcionan los ácidos grasos esenciales necesarios. Por lo tanto, su disminución en la leche es un aspecto negativo; además, para la industria lechera, el menor contenido de grasa en la leche representa problemas debido a que no cumple con los estándares de calidad actuales. Para evitar este problema, se han adicionado dosis altas de vitamina E en la dieta de vacas lecheras para evitar la caída de la grasa en la leche, sin embargo no obtuvieron respuesta positiva (Ramírez-Mella *et al.*, 2013).

La vitamina E en rumiantes, cumple la función de antioxidante (López *et al.*, 2015), aumenta la capacidad inmune (Weiss, 1998), disminuye el conteo de células somáticas en vacas lecheras (Wei *et al.*, 2015), mejora el desempeño reproductivo (Baldi, 2005) y, Naziroğlu *et al.* (1997) mencionan que tiene efectos significativos sobre algunos parámetros de fermentación del rumen y en la concentración de la población microbiana del contenido ruminal.

Sin embargo, hay poca información disponible sobre los efectos de la vitamina E en los procesos de fermentación y producción de ácidos grasos en el rumen, aspecto de mucha importancia para entender el comportamiento productivo animal, que en el caso de producción de leche, es necesario conocer tales procesos para entender y resolver el problema de la caída de la grasa en la leche, cuando se adiciona CLA en la dieta.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la vitamina E y el perfil de ácidos grasos de dietas para vacas lecheras adicionadas con ácido linoleico conjugado, bajo condiciones *in vitro*.

1. Planteamiento del problema

Los potenciales benéficos que proporciona el CLA para la salud de los consumidores han aumentado el interés en investigaciones para mejorar los niveles de éstos ácidos grasos insaturados en la carne y los productos lácteos.

El CLA ha sido usado principalmente en vacas lactantes (Piperova *et al.*, 2004) proporcionando de esta manera mayor contenido de CLA en la leche, con la desventaja de disminuir el contenido de la grasa en leche, afectando a la industria lechera. Recientemente Ramírez-Mella *et al.* (2013) usaron vitamina E para evitar la caída de la grasa en leche; sin embargo, no encontraron efecto de la vitamina E en la caída de la grasa en leche pero sí un aumento del contenido de CLA. Se desconoce el mecanismo de acción de la vitamina E en el metabolismo ruminal de nutrientes cuando se agrega CLA protegido en la dieta, particularmente por la protección con la que se presenta el CLA en la dieta; sin embargo, este puede estar relacionado con un aumento de la población de protozoarios en el rumen y, por lo tanto, en patrones de fermentación al incrementar los niveles de vitamina E en las dietas (Naziroğlu *et al.*, 1997).

Debido a lo anterior, es necesario analizar los efectos de la vitamina E en el ambiente ruminal y la relación con el metabolismo de los ácidos grasos proporcionados por la dieta.

2. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la vitamina E en la fermentación ruminal y perfil de ácidos grasos en dietas con CLA.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la vitamina E en la digestibilidad de la materia seca, producción de gas, producción de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal en condiciones *in vitro*.
- Determinar el perfil de ácidos grasos de cadena larga en líquido ruminal

3. Hipótesis

La vitamina E afecta el metabolismo ruminal y producción de ácidos grasos insaturados en el rumen.

II. Revisión de literatura

2.1. Lípidos

Los lípidos son un grupo de sustancias que se encuentran en los tejidos vegetales y animales, que se forman básicamente por carbono, hidrógeno y en menor proporción, oxígeno; aunque en ocasiones también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno (Fuentes, 2009). Se definen más en función de sus propiedades físicas que por la presencia de funciones químicas (Atuino *et al.*, 2013). Los lípidos pueden actuar como transportadores de electrones o de substrato en reacciones enzimáticas, como componentes de las membranas biológicas, como fuente y almacén de energía (Fuentes, 2009).

La grasa de la leche y de productos lácteos contribuye al consumo de ácidos grasos (AG) esenciales, proteínas y vitaminas en la dieta humana y afecta las propiedades sensoriales de esos alimentos (Chilliard y Ferlay, 2004). Asimismo, posee un alto contenido en ácidos grasos saturados (AGS) cuyo consumo en exceso se asocia a un mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. La grasa de la leche es el componente más fácilmente modificable con el manejo nutricional de los animales, por lo que en los últimos años se ha convertido en un objetivo de investigación y de selección la obtención de leche rica en ácidos grasos saludables (Pueyrredón *et al.*, 1999).

2.2. Ácidos grasos

Los ácidos grasos (AG) son el componente principal de los lípidos, y son ácidos carboxílicos compuestos por cadenas lineales continuas que contienen entre tres a dieciocho átomos de carbono (Church *et al.*, 2003). Según su estructura química, se dividen en dos grupos importantes, los ácidos grasos saturados (AGS) y los insaturados (AGI) (Morrison, 1996).

Los AGS tienen la cadena carbonada completamente saturada con hidrógeno y por ende, no acepta la adición externa de moléculas de hidrógeno, ejemplo de ellos son los ácidos láurico, mirístico, palmítico y esteárico que son cadenas rígidas (Autino *et al.*, 2013). Por lo general, representan el 30 - 40% de la grasa total del tejido animal. Según cuál sea el ácido graso saturado será su impacto sobre el perfil lipídico. Los AGS se caracterizan por aumentar las concentraciones de colesterol total y LDL-c en sangre a los cuales se les atribuyen la elevación del riesgo de enfermedad cardiovascular, aterosclerosis e hipertensión arterial (Tudela, 1996).

Los AGI, son aquellos que poseen dobles enlaces en su estructura que los hacen susceptibles de aceptar moléculas de hidrógeno, lo cual hace que su cadena no sea tan rígida. Dentro de estos se encuentran los monoinsaturados (oleico y palmitoleico) y los poliinsaturados (linoleico y linolénico) (Bretillon *et al.*, 1999).

2. 2. 1. Clasificación de los ácidos grasos

Los ácidos grasos pueden clasificarse dependiendo de sus enlaces químicos. De las grasas, los triglicéridos son el tipo de ácido graso más abundante el cual está constituido por una molécula de glicerol y tres ácidos grasos los cuales pueden ser monoinsaturado (MUFA) o poliinsaturado (PUFA), dependiendo de la presencia o no de dobles enlaces que marcan la diferencia entre unos y otros, como se puede observar en la figura 1 (Hoyos, 2009).

Los MUFA, poseen una única instauración o doble enlace en la cadena carbonada, se encuentran principalmente en los alimentos de origen vegetal y en frutos secos como almendras y nueces. El principal MUFA es el oleico, que reduce los niveles de colesterol total y LDL-c (comúnmente colesterol malo) y aumenta el HDL-c (colesterol bueno) (Poveda *et al.*, 2005).

Los PUFA, en configuración *cis*, son denominados como ácidos grasos esenciales, debido a que no pueden ser sintetizados por los tejidos de los mamíferos pero cumplen funciones importantes dentro del organismo. Los tres principales ácidos grasos esenciales son el ácido linoleico, el ácido linolénico y el ácido araquidónico, aunque este último tiene como precursor al ácido linoleico (Church *et al.*, 2003).

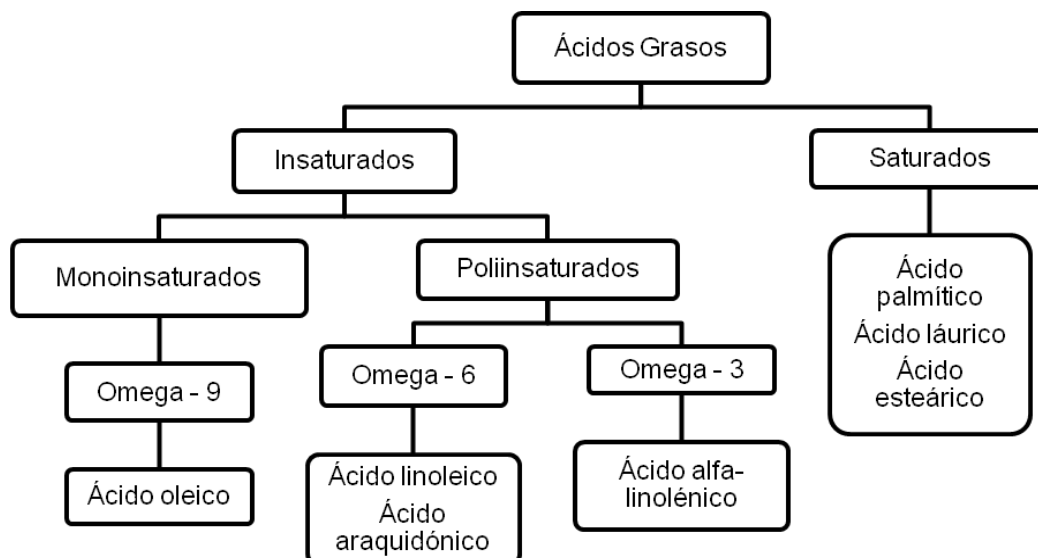


Figura 1. Clasificación de los ácidos grasos según sus enlaces químicos modificado de Coronado *et al.* (2006).

2. 3. Ácido linoleico conjugado

La leche de vaca contiene del 2 al 5% de lípidos con 70% de ácidos grasos saturados y 30% de insaturados (Jensen, 2002). De estos últimos el ácido linoleico conjugado (CLA por sus siglas en inglés), ha despertado interés de investigadores, dados sus propiedades potencialmente benéficas para la salud humana, como la prevención de aterosclerosis, cáncer, reducción de la hipertensión arterial, mejora la mineralización de huesos, la sensibilidad a insulina y la respuesta inmune (Khanal y Dhiman, 2004). El CLA es usado para referirse a una mezcla de isómeros geométricos y posicionales de ácido linoleico. Donde dos isómeros resaltan por su importancia biológica, el *cis*-9, *trans*-11, que típicamente representa de 80 al 90% del total de CLA, y el *trans*-10, *cis*-12 que está en concentraciones de 3 a 5% en la leche de vaca (Lock *et al.*, 2006).

El ácido linoleico conjugado se encuentra, principalmente, en la grasa de los ruminantes (presente en la carne, leche y derivados) aunque otras especies animales y vegetales también los contienen en cantidades considerablemente menores (Chin *et al.*, 1992). En grasa de leche de vaca predomina el C18:2 *cis*-9,

cis-11, que representa el 80-95% del CLA total (Bauman *et al.*, 2001). Las concentraciones de CLA en la grasa de la leche son muy variadas y dependen, básicamente del tipo de alimentación de las vacas, las cuales oscilan entre 3.3 y 9.9 mg/g de grasa en sistemas de alimentación a base de granos y oleaginosas, hasta 22.1 mg/g de grasa en sistemas de pastoreo (AbuGhazaleh y Jacobson, 2007; Piperova *et al.*, 2004)

Una consecuencia del uso de CLA, específicamente de aquellos suplementos que incluyen el isómero *trans*-10, *cis*-12, es la disminución de la concentración de grasa presente en la leche de vaca (Baumgard *et al.*, 2000) e incluso dosis bajas (1.25 g/d) del isómero antes mencionado pueden reducir el porcentaje de grasa en la leche de vaca por debajo de 3% (Peterson *et al.*, 2006).

Las estimaciones existentes del consumo diario de CLA (100 - 200 mg/d; Ritzenthaler *et al.*, 2001) se encuentra en general por debajo de los valores mencionados en la alimentación humana, salvo en países como Australia donde predominan sistemas de producción de carne y leche. El nivel de consumo diario de CLA aconsejable sería más fácil alcanzarlo si se lograra enriquecer naturalmente los productos de origen animal (carne, leche y derivados) (Gagliostro, 2004).

2. 4. Metabolismo de los lípidos en rumiantes

Las cualidades saludables de la carne y leche de los rumiantes para el ser humano dependen, entre otros factores, del tipo y de las proporciones de los ácidos grasos que contienen, que a su vez están estrechamente relacionada con la digestión en rumiantes (Ortega, 2012).

En el rumen se acumula el alimento ya fermentado para transportarlo hasta el omaso, y en éste, el material sólido es separado del contenido ruminal; el omaso también impulsa las partículas del alimento hacia el abomaso mediante sus contracciones. El intestino delgado juega un papel muy importante, ya que allí los lípidos son absorbidos. Al igual que las proteínas, algunos lípidos pueden escapar

de la digestión microbiana ruminal y llegar intactos al intestino para ser absorbidos (Osorio y Vinazco, 2010).

Debido a las bacterias del rumen, los lípidos incluidos en la dieta que no están protegidos de alguna manera, sufren un proceso de lipólisis y biohidrogenación (Martínez *et al.*, 2010).

La lipólisis se refiere a la liberación de los ácidos grasos de los ésteres presentes en los lípidos de los alimentos (Martínez *et al.*, 2010). Esta reacción da como resultado la rancidez hidrolítica que genera los aromas característicos de algunos alimentos, como la leche cruda. En rumiantes, el proceso de lipólisis se lleva a cabo con la participación de diversas bacterias, principalmente *Anaerovibriolipolítica* (Castillo *et al.*, 2013), a partir de esta, se hidrolizan los galactoglicéridos a glicerol, ácidos grasos y galactosa, los fosfolípidos a ácidos grasos libres, fosfato y glicerol, y los triglicéridos a ácidos grasos y glicerol.

La biohidrogenación de los ácidos grasos que componen los lípidos se inicia después de la lipólisis. Este proceso es realizado por diferentes tipos de bacterias ruminales, especialmente por *Butirivibrio fibrisolvens*, aunque en este proceso pueden participar algunos hongos y protozoos (Castillo *et al.*, 2013). Para este proceso se requiere la hidrólisis previa de las grasas, ya que solo ocurre cuando los ácidos grasos tiene el grupo carboxilo libre; por consiguiente, los mismos factores que reducen la lipólisis reducen también la biohidrogenación (Castillo *et al.*, 2012). Como resultado final de la biohidrogenación del ácido linoleico es el ácido esteárico. En el proceso se forman como productos intermedios ácidos grasos conjugados (principalmente ácido *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoico) y ácidos grasos monoinsaturados, con el doble enlace en configuración *trans* (principalmente ácido *trans*-vaccénico: *trans*-11 octadecenoico) y también pueden encontrarse isómeros diinsaturados con configuraciones *cis*, *trans* o *trans, cis* (Fellner *et al.*, 1995). La conversión del CLA en ácido *trans*-vaccénico es más rápida que la hidrogenación de éste a ácido esteárico, por lo que el ácido *trans*-

vaccénico tiende a acumularse en los productos finales de la biohidrogenación (Sosa *et al.*, 2009).

2. 5. Vitamina E

El término de vitamina E, agrupa a varios compuestos naturales de tocoferol (alfa, beta, gamma y delta), siendo el α -tocoferol el más activo de todos. Los tocoferoles son compuestos liposolubles, oleosos y resistentes a varias temperaturas. Son oxidados por el aire y se convierten en la tocoferilquinona, que no tiene actividad biológica, actuando como antioxidantes y protegen los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la oxidación e impidiendo la formación de peróxidos (Meglia *et al.*, 2006).

La forma más común de la vitamina E disponible para su suplementación animal es all-rac- α -tocoferil-acetato, que consiste en una mezcla de los ocho diferentes estereoisómeros (RRR, SRR, RRS, RSS, RSR, SSR, RSS Y SSS) y está claramente establecido que su capacidad de alterar una o más funciones ya sean fisiológicas o químicas es menor que la forma natural (RRR- α -tocoferol) (Coscojuela y López, 2011). Una unidad internacional (UI) de vitamina E es igual a 1 mg de all-rac- α -tocoferil-acetato, mientras que 1 mg de RRR- α -tocoferol es igual a 1.49 UI de vitamina E (Amazan, 2013). Estos factores de conversión se basan en estudios de animales de laboratorio, por el momento no existen estudios detallados en rumiantes. Datos más recientes provienen de trabajos en humanos y cerdos, comparando el efecto de la administración de las formas naturales y sintéticas de la vitamina E, indicando que la biodisponibilidad del RRR- α -tocoferol es prácticamente el doble que la forma sintética (Amazan, 2013).

La vitamina E actúa como un antioxidante en los tejidos y es considerada esencial para la protección de los lípidos insaturados en las membranas biológicas frente al daño oxidativo (Traber y Sies, 1996). La vitamina E es absorbida en el intestino delgado después de entrar en una mezcla micelar, que requiere la presencia de los ácidos biliares y enzimas pancreáticas para formar monoglicéridos que son incorporados en las micelas (Oliveras y Fletas, 2007).

2. 5. 1. Propiedades

La vitamina E es insoluble en agua y soluble en alcohol y otros disolventes orgánicos (éter di-etílico, acetona y cloroformo) así como en aceites vegetales (Sánchez-Pérez *et al.*, 2000).

La vitamina E es esencial para la defensa del cuerpo contra los radicales libres en las células y membranas. Numerosos estudios han presentado los efectos de vitamina E sobre las actividades fisiológicas de las células. Por ejemplo, McPherson (1994) menciona que la vitamina E por lo general mejora la calidad de la carne y de productos lácteos, esto sucede por el efecto antioxidante de la vitamina E. Febles *et al.* (2002) mencionan que la vitamina E influye de manera significativa sobre el sistema inmunológico, ya que las bajas concentraciones de vitamina E se asocian con la desestabilización de las membranas de las células del sistema inmune y con la disminución de la producción de inmunoglobulina.

2. 6. Vitamina E en rumiantes

La vitamina E (α -tocoferol), no son sintetizadas por los microorganismos del rumen, por lo que deben ser suministradas en la ración para los rumiantes (Blé-Castillo *et al.*, 2007).

Las necesidades de vitamina E en las vacas pueden ser muy variables según las circunstancias (alimentación, clima, manejo de los animales, etc.), en rumiantes la composición lipídica de la ración, principalmente en ácidos grasos poliinsaturados, condicionan las necesidades de vitamina E como consecuencia de su oxidación (Focant *et al.*, 1998).

A nivel celular la vitamina E protege las membranas celulares de la oxidación, eliminando los radicales libres que contienen oxígeno. Cuando no hay vitamina E, los radicales libre catalizan la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que constituyen los componentes estructurales de las membranas celulares (Lloyd, 1990). La vitamina E es muy inestable, oxidándose fácilmente en presencia de ácidos grasos poliinsaturados y minerales.

La degradación ruminal de la vitamina E ha sido puesta de manifiesto por Alderson *et al.* (1971) y Herdt y Stowe (1991), que señalan que la degradación es proporcional a la cantidad de cereales en la ración, pudiendo alcanzar valores del 40% de vitamina E en dietas basadas principalmente en cereales. La desaparición de la vitamina E antes de llegar al intestino no es debida a una absorción en el rumen y lo consideran prácticamente nula (Frye *et al.*, 1991).

Wilsdorf *et al.* (1984) sugieren que la vitamina E tiene un efecto de soporte en la población de protozoarios, esto mediante el incremento de su actividad y resistencia. La vitamina E se conoce como un supresor de radicales libres en ácidos grasos insaturados dentro de las membranas celulares además de poseer efectos protectores contra el daño oxidativo (McDowell, 1989; Naziroğlu *et al.* 2002).

La absorción de todas las vitaminas liposolubles está ligada a la digestión y absorción de los lípidos después de su hidrólisis abomasal (Bauer y Rasby, 2009). Las vitaminas liposolubles se incorporan a las micelas para atravesar las membranas celulares de la mucosa intestinal y posteriormente transportar a través de la linfa hasta el hígado, favoreciendo de esta manera la absorción de dichas vitaminas (Bauer y Rasby, 2009).

La formación de micelas de ácidos grasos, monoglicéridos, fosfolípidos y colesterol, se da en el intestino delgado, esto por acción de la lipasa pancreática y sales biliares (Fernández, 2007). La digestión y absorción de la vitamina E, es semejante a la vitamina A, con la diferencia de que la suplementación de la vitamina E se realiza generalmente como D, L-acetato de tocoferol que se hidrolizan en el abomaso y se absorbe en el intestino como tocoferol, el hígado no actúa como órgano de reserva y se almacena en el tejido adiposo (Sayago *et al.*, 2007).

Meglia *et al.* (2006) mencionan que la actividad ruminal no tiene ninguna influencia sobre el metabolismo de la vitamina E, donde se creía que a mayor concentración energética de la dieta mayor degradación ruminal. La vitamina E es absorbida en

intestino y transportada al hígado vía sistema linfático, en combinación con las lipoproteínas. Luego, solo α -tocoferol aparece en plasma, mientras que los demás isómeros (beta β -, gamma γ - y delta δ -) son secretados por bilis a intestino. Esto debido a que en hígado existe una proteína llamada proteína transportadora de la α -tocoferol (α -TTP), que específicamente se une a la forma α -, teniendo una elevada preferencia por el RRR-estereoisómero (Blé-Castillo *et al.*, 2007).

2. 7. Digestibilidad in vitro

La degradabilidad y la digestibilidad de los alimentos son fundamentales para establecer su valor nutritivo y para la formulación de raciones para rumiantes (Bochi-Bru *et al.*, 1999). La digestibilidad se refiere a la cantidad de alimento que desaparece en el tracto digestivo provocado por el ataque de los microorganismos anaerobios ruminales (Giraldo *et al.*, 2006) y la degradabilidad se refiere a la cantidad de alimento que se descompone en sus elementos integrantes, ocasionado mediante procesos biológicos o químicos; la diferencia es que la digestibilidad permite estimar la proporción de nutrientes presentes en el alimento.

La técnica de digestibilidad *in vitro* simula la digestibilidad del tracto digestivo del rumiante, la cual requiere la preparación de un inóculo que contengan microorganismos ruminales viables (Tilley y Terry, 1963) y son utilizados para obtener valores de digestibilidad, se caracterizan por ser menos costosos que los métodos *in vivo*, por desarrollarse en tiempo menor con respuestas eficaces y con condiciones experimentales más exactas (Castro-Montoya *et al.*, 2011).

Una desventaja de esta técnica reside en la variabilidad de sus resultados, debido a que la microflora ruminal está influenciada por el tipo y cantidad de dieta proporcionada al animal (Torres *et al.*, 2009). Las características de fermentación de los alimentos en el rumen pueden ser estudiadas por métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*.

2. 8. Producción de gas

La técnica de producción de gas se diferencia de otras técnicas *in vitro* e *in situ*, en que no solo determina la extensión y la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas liberado directamente como un producto de la fermentación, principalmente de mayor proporción molar de acetato y butirato e indirectamente desde la neutralización del fluido ruminal (Posada y Noguera, 2005). Este gas es capaz de empujar el embolo de la jeringa o de producir cierta cantidad de presión en los frascos para registrar la lectura en mililitros (mL) de gas, a diferentes horas de incubación (Williams, 2000).

La técnica de producción de gas permite determinar los efectos de compuestos secundarios en la actividad microbiana ruminal, describir la cinética de fermentación, analizar efectos asociados de diversos alimentos, examinar el efecto de aditivos en la fermentación ruminal e identificar la composición de gases de la fermentación (Villegas-Castañeda *et al.*, 2010).

Hasta hoy en día se siguen realizando estudios con la técnica de producción de gas *in vitro*, con diferentes forrajes o dietas integrales para poder conocer la cinética de degradación de diversos compuestos metabólicos (Muro, 2007).

Existen técnicas de producción de gas, desarrolladas para la evaluación de la calidad de los alimentos mediante dos criterios para medir volúmenes de gas: 1) gas colectado a presión atmosférica y su volumen se mide directamente o 2) gas acumulado medido en un contenedor con un volumen fijo y el volumen es calculado por los medios de presión.

Las técnicas de gas disponibles son: a) método de gas Hohenmheim o el método de Menke (Menke *et al.*, 1979); b) el sistema de desplazamiento de líquido (Beuvink *et al.*, 1992); c) método manométrico (Waghorn y Stafford, 1993); d) sistema de transductor de presión manual (Theodorou *et al.*, 1994), computarizado (Pell y Shofield, 1993) y la combinación del transductor de presión y el sistema de liberación de gas (Davis *et al.*, 1995; Cone *et al.*, 1996).

La técnica de producción de gas *in vitro*, debe cumplir con las siguientes características como el tipo de sustrato utilizado en la dieta (López *et al.*, 1998), la especie donadora de inóculo (Williams, 2000), el rango de pH para los microorganismos ruminales debe estar entre 6.5 a 6.8, se recomienda utilizar aditivos nutricionales para asegurar la máxima digestión (Grant y Mertens 1992), la dieta del donador ya que hay una posible relación entre producción de gas y el porcentaje de proteína (Borba *et al.*, 2000) y se debe tener control de la temperatura (39°C) ya que está modifica el volumen de gas y la presión (Schofield, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Nutrición Animal del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México (19° 20' LN, 98° 53' LO, 2250 msnm) (García, 1988).

Se evaluaron cuatro tratamientos bajo un diseño en bloques completamente al azar: 1) testigo (dieta base + 12.3 g de CLA protegido (CLAp) /kg de alimento); 2) bajo (testigo + 1.17 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS); 3) medio (testigo + 2.33 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS); 4) alto (testigo + 3.5 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS). El CLAp (Lutrell Pure®, BASF, Alemania; tamaño de partícula de 250 a 850 μ m) contenía 10 g de *cis*-9, *trans*-11 y 10 g de *trans*-10, *cis*-12 CLA por cada 100 de CLAp. Se utilizó α -tocoferol al 50% como fuente de vitamina E.

Para llevar a cabo el experimento se utilizó líquido ruminal obtenido de dos becerros de raza Holstein de 2 años de edad, canulados ruminalmente. La dieta de los animales fue alfalfa achicalada, ofrecida por la mañana (8 am) y la tarde (4 pm) en proporciones iguales. Para recolectar el líquido ruminal, se utilizó una sonda en forma de "Y" y un matraz Erlenmeyer de 500 mL a 39 °C el cual fue forrado con papel aluminio para protegerlo de la luz. Un extremo de la sonda se introdujo al rumen a través de la cánula ruminal del animal y el otro extremo de la sonda realizaba el vacío para extraer el líquido ruminal, el cual se filtró con manta de cielo y un colador de plástico, colocándose en un termo de plástico, manteniéndose a una temperatura constante de 39 °C.

La dieta base estuvo constituida por alfalfa (40%), paja de avena (40%) y concentrado comercial (20%) (Engorda cordero plus, Unión Tepexpan). Este último estuvo formulado a base de granos molidos, subproductos de granos, pastas de oleaginosas, melaza, urea, vitaminas y minerales, según etiqueta. La composición (%) de la dieta experimental fue proteína, 11.93; FDN, 36.48; FDA, 20.16 determinadas por la técnica de Van Soest *et al.* (1991) y cenizas, 5.95, determinadas por AOAC (2005).

Las variables evaluadas fueron digestibilidad *in vitro* de materia seca (DIVMS), producción de gas *in vitro*, concentración de Nitrógeno amoniacal en rumen (N-NH₃), producción de AGV, y concentración de ácidos grasos de cadena larga, particularmente de C₁₄ al C₂₀.

Previo a la digestibilidad *in vitro*, se preparó el inóculo. Para esto, fue necesario realizar las siguientes soluciones: solución buffer, solución micro mineral, solución macro mineral y solución reductora, las cuales se prepararon un día antes de montar la técnica y se mantuvieron a una temperatura constante de 39°C en baño maría. Al realizar la digestibilidad *in vitro*, se mezclaron las soluciones en un matraz volumétrico utilizando una platina magnética (Thermo Scientific Cimarec) para mantener la temperatura de las soluciones y un agitador magnético para mezclar completamente las soluciones. Una vez que las soluciones estuvieran homogéneas, se agregó el líquido ruminal y se mantuvo un flujo constante de CO₂.

Una vez listo el inóculo, se pesó 0.5 g de la dieta y se colocó en un vial de vidrio de 120 mL. Se tuvieron 36 viales por tratamiento. Posteriormente, se agregaron 50 mL del inóculo, se agregó CO₂ a flujo constante a cada vial y se taparon con tapones de hule y sellaron herméticamente con arillos metálicos; finalmente se colocaron en baño maría (Felisa Thermo) a 39°C. Se cubrió el baño maría con plástico negro para proteger los viales de vidrio de la luz directa y se incubaron a 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas. Lo anterior se realizó por triplicado y repetidos tres veces en el tiempo.

Para la DIVMS se realizó lo siguiente: los viales de vidrio fueron retirados en cada uno de los horarios de muestreo. Al sacar los viales del baño maría, se pusieron en congelación por 5 min, con el propósito de parar la acción bacteriana y después se almacenaron en refrigeración para conservar las muestras. El contenido de cada vial se colocó dentro de un tubo para centrifugar (Labcon North America de 50 mL). Previamente estos tubos se llevaron a peso constante en una estufa a 55°C, se identificaron y se pesaron en una balanza analítica. Las muestras se

centrifugaron a 13, 148 x g durante 10 min. Posteriormente se tomaron 2 mL del sobrenadante para la determinación de AGV. Después se eliminó el sobrenadante y los tubos se mantuvieron en una estufa a 35°C por dos días con la finalidad de eliminar la humedad en su totalidad. Una vez hecho lo anterior, se pesaron para obtener por diferencia la materia seca residual.

La producción de gas se determinó a las 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación, utilizando los mismos viales para DIVMS. Para ello se utilizó un aparato de desplazamiento de agua (Fedorak y Hrudehy, 1983), que consta de un soporte universal, un embudo cónico, una bureta de 100 mL y dos mangueras de látex de aproximadamente 1 m de longitud y 0.5 de diámetro de 3/8 de pulgada, una de las dos mangueras se conectó con una aguja calibre 16 (aguja rosa para inyectar bovino). La producción de gas se midió por el desplazamiento de agua en la bureta, lo cual sucede al perforar los viales con la aguja.

Para medir el nitrógeno amoniacal en rumen (N-NH₃), se utilizó la técnica de McCullough (1967). Se colocaron 4 mL del medio de cultivo (líquido que contenían los viales de la DIVMS) en tubos de vidrio. Inmediatamente se agregó 1 mL de ácido metafosfórico (al 25%) y se centrifugó durante 10 min a 20, 784 x g a 24°C. Se tomaron 20 µL del sobrenadante, depositándolos en tubos de vidrio de 10 mL, adicionando 1 mL de fenol y 1 mL de hipoclorito de sodio. Los tubos se incubaron a 37°C en baño maría durante 30 min y se le agregaron 5 mL de agua destilada. Finalmente las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro (Cary 1-E, UV-visible, Marca Varían) a 630 nm.

La producción de ácidos grasos volátiles (AGV) se midió usando la técnica descrita por Erwin *et al.* (1961). Para la preparación de las muestras para AGV, fue necesario colocar el contenido de los viales en tubos de polipropileno, los cuales se centrifugaron a 11, 180 x g durante 10 min y se tomaron 4 mL del sobrenadante, colocándolos en tubos de 16 mL y se les agregó 1 mL de ácido metafosfórico al 25% peso/volumen. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12, 879 x g durante 10 min, el sobrenadante se pasó a un vial de 1 mL y se

guardó en refrigeración para su análisis posterior. Para el análisis, las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, Clarus 500, con puerto de inyección 7386 y muestreador automático), de columna capilar HP-FFAP con longitud de 30 m, diámetro interno 0.25 mm y película de 0.25 micras. La temperatura empleada para el inyector fue de 210°C y para el detector 230°C con flujo de hidrógeno de 35 mL/minuto y flujo de aire de 350 mL/minuto. Empleando Nitrógeno como gas acarreador a 14 mL/minuto. La rampa inicial del horno fue de 80°C/minuto, luego de 150°C/1.5 minuto, la corrida para cada muestra fue de 5 minutos.

Para determinar los ácidos grasos de cadena larga en el líquido ruminal, se modificaron las técnicas establecidas por Palmquist y Jenkins, (2003); Jenkins (2010) y Cesaro *et al.* (2013). Para esto, las muestras de líquido ruminal se secaron en estufa a 35°C durante 2 días, ya que las muestras no deben contener más del 90% de humedad, se extrajo la materia seca del tubo y fueron trituradas para obtener partículas más pequeñas. Después se pesó 0.50 g de muestra seca del líquido ruminal y se colocó en tubos de polipropileno, se añadieron 2 mL de metóxido de sodio (0.5 M en metanol) y se taparon los tubos para mezclar lentamente en el vortex. Después, los tubos se pusieron a baño maría a 50°C durante 10 min, posteriormente se retiraron del baño y se dejaron enfriar por 5 min. Se añadieron 3 mL de ácido clorhídrico metanólico al 5% (1.37 M), y se incubaron en un baño a 80°C durante 10 min. Se dejaron enfriar por 7 min, se les añadieron 3.5 mL de hexano y 5 mL de carbonato de potasio al 6% (0.43 M), se agitaron y centrifugaron por 5 min a 769 x g. Después se extrajo la fracción de hexano (capa superior) y se pasó a otro tubo de polipropileno, se le añadieron 0.5 g de sulfato de sodio y 0.1 g de carbón activado y se centrifugaron a 277 x g durante 5 min. Finalmente se extrajo la primera fase de hexano, y se filtró con un acrodisco (Thermo Scientific, titan 44513-NN, filtro verde de 17 mm y membrana nylon de 0.45 µm) para asegurar una muestra más limpia. Por último se colocó en un vial y se almacenó en congelación hasta su análisis por cromatografía de gases.

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases (HP 6890). La inyección fue manual, se mantuvo el inyector a una temperatura de 250°C, detector de ionización de flama a una temperatura de 235°C. La rampa de temperatura se inició a 140°C a una velocidad de 10 min en un tiempo de 2.95 min después se fue incrementando a 3°C por min con una temperatura final de 210°C, con un decremento de 0.7°C por min a una temperatura final de 235°C. Se mantuvo un flujo de aire a 330 mL/seg y flujo de hidrogeno a 33 mL/seg. Para la separación de los ácidos grasos de cadena larga se utilizó una columna capilar fused Silica (SP-2560, 100 m x 0.25 mm x 0.2 µm film thickness, Supelco serie 53308-02), un estándar FAME Mix C₄-C₂₄, nom. Cat. 18919-1AMP, marca Supelco y como gas acarreador se utilizó helio a 0.6 mL/seg con una velocidad de 14 mL/seg y se mantuvo el gas de compensación a 18 mL/seg. Los ácidos grasos fueron determinados por porcentajes de área, comparando los tiempos de retención de los ácidos grasos y el estándar, con un tiempo de corrida de 62 min/muestra.

Los datos fueron analizados con el procedimiento GLM de SAS (9.0) y se utilizó la prueba de Tukey (P≤0.05) para la comparación de medias (Steel y Torrie, 1996).

El modelo experimental utilizado fue $Y_{ij} = \mu + i + \beta_j + \epsilon_{ij}$ $i = 1, 2, \dots, t$ $j = 1, 2, \dots, t$

Donde: Y_{ij} = variable respuesta en tratamiento ij = repetición; μ = media general; i = efecto de tratamiento; β_j = efecto del bloque; ϵ_{ij} = error aleatorio.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Producción de gas

No hubo diferencias en la producción de gas (Cuadro 1) por efecto de la vitamina E en dietas con CLAp en ninguno de los horarios evaluados, lo cual coincide con lo reportado por Tagliapietra *et al.* (2013) en incubaciones hechas con paja o grano de maíz adicionadas con vitamina E. Sin embargo, a medida que incrementaron las horas de incubación, la producción de gas tuvo un comportamiento exponencial, incrementando de 37.50 mL/g MS a las 6 horas, a 368.57 mL/g MS a las 72 horas, equivalente a un incremento de 983%. Este comportamiento es debido básicamente a la rápida fermentación de los carbohidratos en las primeras horas de incubación, que varía según el tipo de sustratos (contenido de paredes celulares) (Ivan *et al.*, 2005) y la población microbiana predominantes (bacterias y protozoarios) (Dehority, 2003). Por ejemplo, cuando la fermentación inicia con mayor cantidad de materia seca incubada, tiene que ser degradada para producir la misma cantidad de gas (López *et al.*, 1998). Al respecto Tagliapietra *et al.* (2013) reportaron mayor producción de gas en incubaciones hechas con grano de maíz (sustrato almidonoso; 147 mL/g MS) que con paja (sustrato fibroso; 83 mL/g MS). Esto lleva a pensar que el nivel de vitamina E usado en el presente estudio, no fue suficiente para producir cambios significativos en la producción de gas, como lo reporta Hou *et al.* (2013), quienes adicionando 2 mg/80mL de vitamina E en dietas con alta concentración de soya, no encontraron efecto significativo en la producción de gas. Tagliapietra *et al.* (2013) tampoco reportaron cambios en la producción de gas a pesar de usar altas dosis de vitamina E (8 mg/g de sustrato). Es importante señalar que con el nivel alto de vitamina E, a las doce horas de incubación, se registró un incremento del 7.26 % en la producción de gas con respecto al testigo, similar a lo reportado por Hou *et al.* (2013) a las 24 horas (6.4%); sin embargo, en ningún caso fue estadísticamente significativo. Este panorama de resultados parece indicar que se deben más al tipo de fibra de la dieta evaluada, que al efecto de incluir CLAp y vitamina E a la dieta, toda vez que en la presente investigación se utilizó una dieta

a base de sustratos fibrosos, disminuyendo la fermentación y la biohidrogenación de los ácidos grasos en el rumen (Li & Meng, 2006).

Cuadro 1. Efecto de la vitamina E en la producción de gas *in vitro* (mL/g MS) en dietas con CLAp.

| Tratamiento** | Horario de incubación (horas) | | | | | |
|---------------|-------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | 6 | 9 | 12 | 24 | 48 | 72 |
| Testigo | 37.50 | 83.83 | 134.83 | 207.70 | 288.1 | 368.57 |
| Bajo | 37.46 | 85.50 | 138.83 | 212.70 | 291.27 | 371.63 |
| Medio | 38.36 | 86.76 | 149.93 | 218.70 | 294.43 | 377.10 |
| Alto | 39.66 | 89.50 | 144.63 | 220.26 | 301.43 | 384.77 |
| P | 0.728 | 0.757 | 0.554 | 0.496 | 0.720 | 0.676 |
| EEM* | 0.75 | 1.82 | 3.83 | 3.14 | 4.09 | 6.24 |

*Error estándar de la media. No hay diferencias significativas ($P > 0.05$). **Testigo (dieta base + 12.3 g de CLAp/kg de alimento); Bajo (testigo + 1.17 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS); Medio (testigo + 2.33 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS); Alto (testigo + 3.5 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS).

4.2. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca

No hubo diferencias ($P > 0.05$) en cuanto a los valores de DIVMS en ninguno de los horarios de incubación (Cuadro 2) por efecto de adicionar vitamina E en dietas suplementadas con CLAp. Al respecto, hay poca información relacionada con el efecto de la vitamina E en la DIVMS en rumiantes, aunque de acuerdo con Hino *et al.* (1993) el uso de antioxidantes, incluyendo α -tocoferol a las dietas de rumiantes mejora la digestibilidad de la fibra especialmente cuando se suplementa con grasas o aceites. Contrario a lo que se esperaba, se observó que la digestibilidad *in vitro* de materia seca disminuye ligeramente, aunque no significativamente, con

el incremento de las concentraciones de vitamina E, siendo que a un nivel de concentración alto de vitamina E, a las nueve horas de incubación, se observó una disminución del 8.7% en la DIVMS. Este efecto se ha reportado anteriormente en incubaciones que incluyen aceites insaturados (Hino *et al.*, 1993; Hou *et al.*, 2013; Toral *et al.*, 2008). En este estudio, la disminución de la DIVMS pudo deberse a que, además de vitamina E, se incluyeron 12.3 g de CLAp en la dieta. Al no obtener resultados a nivel *in vitro*, podemos suponer que la vitamina E administrada a la dieta pudo haber modificado su estructura debido a factores como la oxidación, ya que es muy inestable en presencia de minerales y ácidos grasos poliinsaturados (Church *et al.*, 2003), y consecuentemente, perdió su potencial. Adicionalmente, dicha oxidación pudo haberse fortalecido debido a que los lípidos son hidrolizados extensamente en rumen por las lipasas microbianas, dando lugar a la liberación de ácidos grasos de cadena larga, donde el CLA puede estar involucrado, inhibiendo la actividad bacteriana (Harfoot y Hazlewood, 1997). Este comportamiento indica también que dado que el CLA estuvo protegido, su efecto interactivo con la vitamina E fue nulo.

Cuadro 2. Efecto de la vitamina E en la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (%DIVMS).

| Tratamiento** | Horario de incubación (horas) | | | | | |
|----------------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 6 | 9 | 12 | 24 | 48 | 72 |
| Testigo | 66.72 | 74.02 | 74.40 | 77.14 | 76.66 | 80.07 |
| Bajo | 62.29 | 72.88 | 74.37 | 77.52 | 76.36 | 77.35 |
| Medio | 65.29 | 70.50 | 75.07 | 81.46 | 77.74 | 82.64 |
| Alto | 61.84 | 67.54 | 71.47 | 76.04 | 80.41 | 78.15 |
| P | 0.592 | 0.446 | 0.658 | 0.208 | 0.484 | 0.250 |
| EEM* | 1.42 | 1.48 | 1.05 | 0.95 | 0.99 | 0.99 |

*Error estándar de la media. No hay diferencias significativas ($P>0.05$). **Testigo (dieta base + 12.3 g de CLAp/kg de alimento); Bajo (testigo + 1.17 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS); Medio (testigo + 2.33 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS); Alto (testigo + 3.5 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS).

4.3. Producción de ácidos grasos volátiles

En el Cuadro 3 se presenta la producción *in vitro* de ácidos grasos volátiles. En ninguno de los niveles de inclusión de vitamina E hubo diferencias ($P>0.05$) entre tratamientos, resultados que contrastan con los obtenidos por Naziroğlu *et al.* (2002), quienes al incluir 0.4 y 0.8 mg de vitamina E en 100 mL de líquido ruminal incrementaron la concentración de los ácidos acético y propiónico y disminuyeron butírico, mientras que Hou *et al.* (2013) reportaron incrementos en acético y AGV totales, y disminución de butírico con 0.5, 1 y 2 mg de vitamina E en 80 mL de líquido ruminal. Cabe señalar que la concentración de vitamina E utilizada en los estudios anteriores es mayor a la utilizada en éste, lo cual podría explicar los resultados obtenidos. Incluso Hidiroglou y Lessard (1976) observaron incrementos

en ácidos acético, butírico y valerato en un estudio *in vivo* al dosificar semanalmente 1000 UI de vitamina E corderos.

Con respecto a la proporción de acético/propiónico (Cuadro 4), tampoco hubo diferencias ($P>0.05$) entre tratamientos. Sin embargo, Hou *et al.* (2013) sí reportan incrementos significativos en la relación acético/propiónico al incrementar de 3 a 3.85 con 2 mg de vitamina E en 80 mL de líquido ruminal en incubaciones *in vitro*. Esta relación es importante ya que a partir del ácido acético se originan aproximadamente el 50% de los ácidos grasos y en forma especial la grasa en leche, la producción de leche puede aumentarse como resultado de un aumento en la absorción de ácido acético a través del rumen pero no es así con el aumento de ácido propiónico y butírico (Annison y Linzell, 1964).

Dado que la producción de AGVs no fue diferente entre tratamientos, confirma la protección efectiva del CLA, ya que cuando éstos no se protegen, existe ligera inhibición de la actividad microbiana al incluir aceites en la dieta, reduciendo así la concentración total de AGVs en el rumen (Toral *et al.*, 2008)

4.4. Nitrógeno amoniacal

No hubo diferencia ($P>0.05$) en la concentración de nitrógeno amoniacal con los diferentes niveles de vitamina E (Cuadro 3), resultado contrario a lo reportado por Naziroğlu *et al.* (2002) quienes al incluir 0.4 y 0.8 mg de vitamina E en 100 mL de líquido ruminal observaron incrementos en las concentraciones de nitrógeno amoniacal. Contrariamente, Hou *et al.* (2013) no observaron cambios en las concentraciones de nitrógeno amoniacal y producción total de gas al adicionar 2.0 mg de vitamina E en 80mL de líquido ruminal. Los resultados de este estudio pueden deberse a las concentraciones bajas de vitamina E utilizadas. La vitamina E ha demostrado mejorar la actividad de los protozoarios del rumen (Naziroglou *et al.*, 2002), como los ciliados que obtienen su nitrógeno de la ingestión y digestión de las bacterias, esto, mejorando los niveles de nitrógeno amoniacal en líquido ruminal. Aunque en este estudio no se realizó el conteo de protozoarios, los resultados aquí reportados, indican que se puede mejorar el metabolismo del

nitrógeno aumentando el número de protozoarios en el rumen. Esto sería de mucha importancia, toda vez que el CLAp no interfiere en el metabolismo del nitrógeno amoniacal, debido que no hay efecto en el amoníaco ni AGVs procedentes de la desaminación de los aminoácidos de las proteínas de la dieta (Soto, 2005).

Cuadro 3. Efecto de la vitamina E en la producción de AGVs y concentración de nitrógeno amoniacal.

| Variables | Tratamiento** | | | | EEM* | P |
|---|---------------|--------|--------|--------|------|-------|
| | Testigo | Bajo | Medio | Alto | | |
| AGV total (mmol/L) | 60.865 | 57.889 | 58.498 | 59.312 | 1.42 | 0.897 |
| Acético (%) | 70.985 | 71.205 | 70.891 | 70.956 | 0.17 | 0.931 |
| Propionico (%) | 19.387 | 19.288 | 19.449 | 19.399 | 0.09 | 0.954 |
| Butírico (%) | 9.626 | 9.502 | 9.658 | 9.643 | 0.08 | 0.909 |
| Proporción acético/propiónico | 3.668 | 3.712 | 3.651 | 3.665 | 0.02 | 0.900 |
| Nitrógeno amoniacal (mg N dL⁻¹) | 19.520 | 18.131 | 19.429 | 19.483 | 0.60 | 0.827 |

*Error estándar de la media. No hay diferencias significativas ($P>0.05$). **Testigo (dieta base + 12.3 g de CLAp/kg de alimento); Bajo (testigo + 1.17 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS); Medio (testigo + 2.33 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS); Alto (testigo + 3.5 mg de acetato de α -tocoferol/kg de MS).

4.5. Perfil de ácidos grasos en el rumen

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de la producción de ácidos grasos de cadena larga en líquido ruminal. La inclusión de diferentes niveles de vitamina E

en la dieta, no modificó la concentración de la mayoría de los ácidos grasos de cadena larga, a excepción de los ácidos linoleico y linolénico, los cuales aumentaron 31% y 21%, respectivamente, con el nivel medio de vitamina E. Al respecto, Zened *et al.* (2012) reportan incremento en el ácido oleico pero disminución en el ácido linoleico en un experimento *in vitro* usando 30 mg de vitamina en 40 mL de líquido ruminal; además reportan incremento en las concentraciones de CLA (*cis*-9, *trans* 11 y *trans*-10, *cis*-12) y de otros ácidos grasos *trans* por efecto de la vitamina E. En este sentido, Hou *et al.* (2013) encontraron que al adicionar vitamina E además de afectar los parámetros de fermentación ruminal, modifica la concentración de CLA y la acumulación de compuestos intermediarios de la biohidrogenación ruminal. Desafortunadamente en este estudio no se evaluaron ni el CLA ni otros ácidos grasos *trans*, pero es objetivo de este grupo de investigación trabajar en ello dado los beneficios que estos ácidos grasos tienen para la salud del ser humano, por su efecto anticancerígeno y antiobesogénico (Haro *et al.*, 2006). Sin embargo, es interesante resaltar que el contenido de linoleico y linolénico incrementaron con la adición de vitamina E. Esto es importante debido a que ambos ácidos grasos son precursores de CLA en el rumen (Kramer *et al.*, 2004). Algunos autores han concluido que la vitamina E puede alterar la hidrogenación ruminal de los ácidos grasos poliinsaturados y, en consecuencia, modificar el perfil de lípidos en la leche (Bell *et al.*, 2006; Kay *et al.*, 2005; Pottier *et al.*, 2006) y carne (Juárez *et al.*, 2010, 2011).

El total de los ácidos grasos saturados e insaturados en líquido ruminal tampoco tuvieron efecto significativo por la inclusión de vitamina E a la dieta suplementada con CLAp, hecho que coincide con Pottier *et al.* (2006) que utilizaron dietas suplementadas con aceites y vitamina E. No obstante, numéricamente hubo una disminución del 2.91% de los ácidos grasos saturados con el nivel alto de vitamina E respecto al testigo. A este respecto, se ha reportado que la vitamina E tiene efecto en el perfil de ácidos grasos en animales para carne. Por ejemplo, Chen *et al.* (2010) reportaron disminución de los ácidos grasos saturados y un aumento de

los ácidos grasos insaturados en grasa muscular de ovinos suplementados con 500 mg/kg de vitamina E en la dieta, situación que no se reflejó en los resultados del presente estudio, ya que la dosis usada fue de 3.5 mg/kg de vitamina E en la dieta.

A la fecha se han realizado pocas investigaciones del efecto de la vitamina E en la formación de ácidos grasos en líquido ruminal. Church *et al.* (2003) sugieren que el efecto de la vitamina E no se limita al rumen, y que actúa a nivel intestinal, particularmente si se considera que la absorción de vitaminas es similar a la de los lípidos por sus características liposolubles. Hipotéticamente la vitamina E mejora las condiciones de las bacterias ruminales involucradas en la degradación de fibras, mecanismo que no se conoce con certeza. Por lo que es interesante conocer los efectos de la vitamina E en el rumen específicamente en la producción de ácidos grasos, particularmente los isómeros del CLA, que son de suma importancia para la salud humana (Coronado *et al.*, 2006).

Cuadro 4. Efecto de la vitamina E en el perfil de ácidos grasos de cadena larga en líquido ruminal con CLAp en la dieta.

| Ácidos grasos cadena larga (%) | Vitamina E (UI) | | | | | EEM* | P |
|-----------------------------------|-----------------|----------|---------|---------------------|--------|-------|---|
| | Testigo | Bajo | Medio | Alto | | | |
| Mirístico | 3.2952 | 3.2836 | 3.2236 | 3.2337 | 0.10 | 0.676 | |
| Pentadecanoico | 5.0696 | 5.2563 | 4.6091 | 4.5738 | 0.21 | 0.619 | |
| Palmítico | 29.4722 | 29.7183 | 28.9265 | 28.4955 | 1.12 | 0.560 | |
| Palmitoleico | 2.5405 | 2.5382 | 2.2730 | 2.3679 | 0.09 | 0.130 | |
| Heptadecanoico | 1.7638 | 1.7596 | 1.4530 | 1.5019 | 1.09 | 0.367 | |
| Estéarico | 29.5292 | 28.8158 | 28.0820 | 29.2763 | 1.13 | 0.479 | |
| Eládico | 6.4272 | 6.0971 | 7.1585 | 6.7808 | 0.29 | 0.143 | |
| Oleico | 4.0322 | 4.0864 | 4.7602 | 4.5224 | 1.15 | 0.512 | |
| Linoleico | 2.4371b | 2.7835ab | 3.2031a | 3.0977ab | 0.22 | 0.856 | |
| Araquídico | 0.30170 | 0.35428 | 0.36075 | 0.33120 | 0.17 | 0.455 | |
| Linolénico | 1.8523b | 2.0465ab | 2.2457a | 2.1597 ^a | 0.04 | 0.084 | |
| Otros | 12.9130 | 13.2607 | 13.7988 | 14.2501 | 0.59 | 0.196 | |
| Σ Saturados | 69.432 | 69.188 | 66.655 | 67.412 | 2.816 | 0.545 | |
| Σ Insaturados | 17.2893 | 17.5517 | 19.6405 | 18.9285 | 0.4851 | 0.053 | |
| Proporción de AGS/AGI | 4.0158 | 3.9418 | 3.3937 | 3.5614 | 2.7246 | 0.368 | |

a, b Medias con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes (P<0.05). EEM: Error estándar de la media. Testigo (dieta base + 12.3 g de CLAp/kg de alimento); Bajo (testigo + 1.17 mg de acetato de α-tocoferol/kg de MS); Medio (testigo + 2.33 mg de acetato de α-tocoferol/kg de MS); Alto (testigo + 3.5 mg de acetato de α-tocoferol/kg de MS).

V. CONCLUSIÓN

Los niveles de vitamina E usados en el presente estudio, no afecta la fermentación ruminal, pero existe la posibilidad de modificar el metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga como el ácido linoleico y linolénico, cuando se usan dietas con ácido linoleico conjugado protegido. Estos resultados evidencian la posibilidad de modificar el metabolismo en el rumen de los ácidos grasos, objetivo a considerar en futuras investigaciones, dado que dicho conocimiento ayudaría a explicar la respuesta en el desempeño productivo del animal.

VI. LITERATURA CITADA

- Abughazaleh, A. A., y B. N. Jacobson. 2007. The effect of pH and polyunsaturated C18 fatty acid source on the production of vaccenic acid and conjugated linoleic acids in ruminal cultures incubated with docosahexaenoic acid. *Anim Feed Sci Tech.* 136: 11 – 22.
- Alderson, N.E., J. R. Mitchell., G. E. Little., R. E. Warner. & R. E. Tucker. 1971. Pre-intestinal disappearance of vitamin E in ruminants. *J. Nut.* 101: 655 – 660.
- Amazan, D. 2013. Estudio de eficacia de una fuente de vitamina E natural (D-A-tocoferol) en ganado porcino. Tesis doctoral. Universidad complutense de Madrid. pp. 3 – 179.
- Anisson, E. F. and J. Linzell. 1964. The oxidation and utilization of glucose and acetate by the mammary gland of the goat in relation to their over-all metabolism and to milk formation. *J. Physiol.* 175: 372 – 335.
- AOAC, (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official methods of analysis. 18th edition. Gaithersburg, MA, USA. Chapter 32: 2.
- Atuino, J. C., G. Romanelli, y D. M. Ruiz. 2013. Introducción a la química orgánica. Primera edición. La plata. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. pp. 291.
- Baldi, A. 2005. Vitamin E in dairy cows. *Elsevier* 98: 117 – 122.
- Banegas, J. R., F. Villar., A. Graciani. Y F. Rodríguez-Artalejo. 2006. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España. *El Servier.* 6: 3G – 12G.
- Bauer, D., I. Rush, y R. Rasby. 2009. Minerales y vitaminas en bovinos de carne. Capítulo 4. *S. Argentino de Producción Animal.* pp 1 – 18.
- Bauman, D., B. L. Corlbaumgard, y J. Griinari. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. *In: Recet advances in Animal Nutrition.* pp 221 – 250.

- Baumgard, L.H., B.A. Corl, D.A. Dwyer, A. Saebo, and D.E. Bauman. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 278: R179 - R184.
- Bell, J.A., Griinari, J.M., Kennelly, J.J., 2006. Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 89: 733 – 748.
- Blé-Castillo, J. L., J. C. Díaz-Zagoya, y J. D. Méndez. 2007. Suplementación con vitamina E, ¿benéfica o dañina?. *Gac. Méd. Méx.* 144: 147 – 154.
- Bretillon L., J. M. Chardigny., S. Grégoire., O. Berdeaux., y J. L. Sébédio. 1999. Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities *in vitro*. *INRA*. 34: 965 – 969.
- Beuvink, J. M. W., S. F. Spoeltra, and R. J. Hogendorp. 1992. An automated method measuring time-course of gas production of feedstuffs incubated whit buffered rumen fluid. *Netherland J. of Agri Sci.* 40: 401 – 407.
- Bochi-Brum, O.; Carro, D.; Valdés, C.; González, J. y López, S. 1999. Digestibilidad *in vitro* de forrajes y concentrados: efecto de la ración de los animales donantes de líquido ruminal. *Arch. Zoot.*, 48 (1): 51 – 61.
- Borba, A. E., P. M. Goncalves., C. F. Vouzela., O. A. Rego, and A. F. Borba. 2000. Effect of donor feeding in the use of alternative sources of inocula in the prevision of digestibility by the gaas production method. *Rev Portuguesa de Zootecnia*. 1: 43 – 50 pp.
- Castillo, J. A., M. Olivera., M. L. Pabón., y J. E. Carulla. 2012. Reducción de la biohidrogenación del ácido linoleico y alfa linólenico por la adición de diferentes proporciones de ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico. *Rev. Colombiana de Química*. 41: 395 – 408.

- Castillo, V. J., A. M. Olivera. Y F. J. Carulla. 2013. Descripción del mecanismo bioquímico de la biohidrogenación en el rumen de ácidos grasos poliinsaturados: una revisión. Rev. U. D. Act. Y Div. Cient. 16 (2): 459 – 468.
- Cesaro, G., F. Tagliapietra., L. Grigoletto., A. Cecchinato., D. Dannenberger., G. Bittante., and S. Schiavon. 2013. Fecal simple preparation methods for gas chromatography analysis of fatty acids of ruminants fed different amounts of rumen protected conjugated linoleic acids (CLA). Anim Feed Sci and Tech 183: 184 – 194.
- Castro-Montoya, J. M., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2011. Chemical composition of rumen microbial fraction and fermentation parameters as affected by tannins and saponins using an in vitro rumen fermentation system. Can. J. Anim. Sci. 91: 433 – 448.
- Cone J. W., Van Gelder A. H., Visscher G. J. W, Oudshoorn L. 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. Anim Feed Sci Technol 61 pp. 113 – 128.
- Coronado, M., S. Vega., R. Gutiérrez., B. Garzía., y G. Díaz. 2006. Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud. REB 25 (3): 72 – 79.
- Coscojuela, P. y R. López. 2011. La vitamina E natural y la sintética. Departamento técnico previa feed extract, S. L. p.p 1 – 4. www.produccion-animal.com.ar
- Chilliard, Y., and A. Ferlay. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. Reprod Nutr Dev. 44: 467 – 492.
- Chen, X. J., H. L. Mao, and J. X. Liu. 2010. Effects of dietary corn oil and vitamin E supplementation on fatty acid profiles and expression of acetyl CoA carboxylase and stearoyl-CoA desaturase gene in Hu sheep. Anim Sci J. 81: 165 – 171.

- Chin S.F., J.M. Storkson, W. Liu, J.K. Albright, and M.W. Pariza. 1992. Conjugated linoleic acid (9, 11- and 10, 12- octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid. *J. of Nutri* 124: 694 – 701.
- Church, C. D., W. G. Pond, and K. R. Pond. 2003. *Fundamentos de nutrición y alimentación de animales*. Editorial Limusa Wiley. México. pp. 253 – 258.
- Davis, D. R., Theodorou, M. K., Baughan, J., Brooks, A. E. and Newbold, J. R. 1995. An automated pressure evaluation system (APES) for determining the fermentation characteristics of ruminant feeds *Annal. Zootech.* 44: 1 – 36.
- Dehority, B.A. 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press. pp. 19 – 43.
- deVeth, M.J., S.K. Gulati, N.D. Luchini, and D.E. Bauman. 2005. Comparison of calcium salts and formaldehyde-protected conjugated linoleic acid in inducing milk fat depression. *J. of Dairy Sci* 88: 1685 - 1693.
- Erwin, E. S., G. J. Marco., E. Emery. 1961. Volatile fatty acids analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44:1768 – 1771.
- Febles, C., Soto, C., Saldaña, A., García B., 2002. Funciones de la vitamina E. *Rev Cubana Estomatol* 1: 28 – 32.
- Fedorak, P. M. and S. E. Hrudey. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ. Tech. Lett.* 4: 425 – 432.
- Fernández Navarro, J. R. 2007. *Suplementación de la dieta con aceite de pescado rico en ácidos grasos poliinsaturados n-3. Estrategias a practicar para potenciar su consumo*. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Fellner, V., F. D. Sauer, and J. K. G. Kramer. 1995. Steady-state rates of linoleic acid biohydrogenation by ruminal bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 78: 1815 – 1823.

- Focant, M., E. Mignolet., M. Marique., F. Clabots., T. Breyne., D. Dalemans., and Y. Larondelle. 1998. The effect of vitamin E supplementation of cow diets containing rapeseed and linseed on the prevention of milk fat oxidation. *J. Dairy Sci.* 81: 1095 – 1101.
- Fuentes A. M. 2009. Modificación del perfil de ácidos grasos de la leche a través de la manipulación en vacas lecheras: el papel del rumen. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Frye, T. M., S. M. Williams, y T. W. Graham. 1991. Vitamin deficiencies in cattle. *Food Animal Practice* 7: 217.
- Gagliostro, G. A. 2004. Control nutricional del contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche y su presencia en alimentos naturales funcionales. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol 24 (3 – 4): 113 – 136.
- García E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. Enriqueta García de Miranda, México D.F. 217 pp.
- Giraldo, L. A., L. A. Gutiérrez, J. Sánchez, y P. A. Bolívar. 2006. Relación entre presión y volumen para el montaje de la técnica *in vitro* de producción de gas en Colombia. Universidad nacional de Colombia sede Medellín. Vol. 18. Núm. 6.
- Grant, R, J. and D. R. Mertens 1992. Development of buffer systems for pH control and evaluation of pH effects on fiber digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 75: 1581 – 1587.
- Harfoot, C. G. y Hazlewood, G. P. 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P. N., Stewart, C. S. (Eds.). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Chapman & Hall, London, UK, pp. 382 – 426.
- Haro, A. M., A. Reyes, y C. Cabrera-Vique. 2006. Ácido linoleico conjugado: interés actual en nutrición humana. *Med Clin (Barc)*. 127 (13): 508 – 515.

- Hertd, T.H. y H. D. Stowe. 1991. Fat-soluble vitamin for dairy cattle. The Veterinary Clinic of North America Food Animal Practice 7: 391 – 415.
- Hidiroglou, M., and J. R. Lessard. 1976. The effect of selenium or vitamin E supplementation on volatile fatty acid content of rumen liquor in sheep fed a purified diet. Int. J. Vit. Nutr. Res. 46: 458 – 463.
- Hino, T., A. Naotomo, and O. Hisao. 1993. Effects of β -Carotene and α -Tocopherol on rumen bacteria in the utilization of long-chain fatty acids and cellulose. J. Dairy Sci. 76: 600 – 605.
- Hou, J., F. Wang, Y. Wang, and F. Liu. 2013. Effect of vitamin E on the concentration of conjugated linoleic acids and accumulation of intermediates of ruminal biohydrogenation. Small Ruminant Res. 111: 63 – 70.
- Hoyos, G. A. 2009. Análisis del perfil de ácidos grasos, vitamina E y situación actual del etiquetado nutricional en aceites vegetales de mayor comercialización por almacenes de grandes superficies (supermercados) en Bogota, Barranquilla y Medellín. Tesis doctoral. pp 17 – 119.
- Ivan, S. K., Grant, R.J., Weakley, D. & Beck, J. 2005. Comparison of a corn silage hybrid with high cell wall content and digestibility with a hybrid of lower cell-wall content on performance of Holstein cows. J. Dairy. Sci. 88: 244
- Jenkins, T. C. 2010. Technical note: common analytical errors yielding inaccurate results during analysis of acids in feed and digesta sample. J. Dairy Sci. 93: 1170 – 1174.
- Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. J. of Dairy Sci. 85: 295 – 350.
- Juárez, M., M. E. R. Dugan, J. L. Aalhus, N. Aldai, J. A. Basarab, V. S. Baron, and T. A. McAllister. 2010. Dietary vitamin E inhibits the *trans* 10-18:1 shift in beef backfat. Can. J. Anim. Sci. 90: 9 – 12.

- Kay, J.K., Roche, J.R., Kolver, E.S., Thomson, N.A., Baumgard, L.H. 2005. A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *J. Dairy Res.* 72: 322 – 332.
- Khanal, R. C., y T. R. Dhiman. 2004. Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A Review. *Pakistan J. Nutr.* 3: 72 – 81.
- Kramer, K. G., C. Cruz-Hernandez, Z. Deng, J. Zhou, G. Jahreis, y M. Dugan. 2004. Analysis of conjugated linoleic acid and *trans* 18: 1 isomers in synthetic and animal products. *Am. J. Nutr.* 79: 1137S – 1145S.
- Li, Y. & Q. Meng. 2006. Effect of different types of fibre supplemented with sunflower oil on ruminal fermentation and production of conjugated linoleic acids *in vitro*. *Archiv of Anim Nutri.* 60 (5): 405 – 411.
- Lock, A.L., K.J. Harvatine, J.K. Drackley, and D.E. Bauman. 2006. Concepts in fat and fatty acid digestion in ruminants. *Proc. Intermountain Nutr. Conf.* pp. 85 – 100.
- Lloyd, J. K. 1990. The importance of vitamin E in human nutrition. *Acta Pediatr Scand* 79: 6 – 11.
- López, S., M. D. Carro, J. S. Gonzáles, and F. J. Ovejero. 1998. Comparison of *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Anim. Feed Sci. technol.* 73: 99 – 113.
- López, A. G. E., M. T. Sumaya, M. Spanopoulos, M. Balois, R. Sánchez y E. Jiménez. 2015. Inclusion of natural antioxidant compounds in fish feeds to counteract oxidative stress. *Bio Ciencias* 3 (2): 68 – 78.
- Martínez, L. A., H. M. Pérez., A. L. Pérez. Y C. G. Gómez. 2010. Digestion de los lípidos en los rumiantes. *Interciencia.* 35: 240 – 246.
- Meglia, G. E., S. K. Jensen, C. Lauridsen., y K. P. Waller. 2006. Alpha-tocopherol concentration and stereoisomer composition in plasma and milk from dairy cows fed natural or synthetic vitamin E around calving. *J. Dairy Res.* 73: 227 – 234.
- McCullough H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clinic Chemys.* 17: 297 – 304.

- McDowell, L. R., 1989: Vitamins in Animal Nutrition. Comparative Aspects to Human Nutrition: Vitamin E, pp. 93 – 131. Academic Press, London.
- McPherson, A. 1994. Selenium vitamin E and biological oxidation. In: Recent advances in animal nutrition. De. Garnsworthy, P.C. Cole, D.J. Nottingham University Press. pp 3 – 30.
- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, D. and Schneider W. 1979. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J. Agric. Sci. 92: 217 – 222.
- Morrison, R. T. B., R. N. 1996. Lípidos. Gorduras e Esteróides. *In*: Química Orgânica. Pp. 1255 – 1259.
- Muro, R. A. 2007. Cinética de degradación ruminal de tres fuentes de forraje mediante la técnica de digestibilidad *in vitro* por producción de gas (tesis de doctorado). Chihuahua: Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Naziroğlu, M., M. Aksakal, M. Cay, and S. Celik, 1997. Effects of vitamin E and selenium on some rumen parameters in lambs. Acta Vet. Hungarica. 45: 447 – 456.
- Naziroğlu, M., Güler, T., Yüce, A., 2002. Effect of vitamin E on ruminal fermentation *in vitro*. J. Vet. Med. A: Physiol. Pathol. Clin. Med. 49: 251 – 255.
- Olivares, J. L. y J. Fleeta. 2007. “Vitaminas liposolubles en la nutrición infantil” en Bueno, M; Sarría, A. y J. Pérez González (comp.), Nutrición en pediatría. Tomo I, tercera edición. Madrid, Monza/Ergón.
- Ortega, P. R. 2012. Perfil de ácidos grasos en forrajes alternativos para la alimentación de bovinos en ecosistemas áridos y perfil de ácidos grasos en la leche de vacas de distintos grupos raciales en diferentes sistemas de alimentación. Tesis doctoral. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S. C. pp. 1- 86.
- Osorio, J. H., y J. Vinazco. 2010. El metabolismo lipídico bovino y su relación con la dieta, condición corporal, estado productivo y patologías asociadas. Biosalud. 9: 56 – 66.

- Palmquist, D. L., and T. C. Jenkins. 2003. Challenges with fats and fatty acid methods. *J. Anim. Sci.* 81:3250 – 3254.
- Pell, A. N. and P. Schofield. 1993. Computerized monitoring of gas to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 76: 1063 – 1073.
- Pérez, P. M. P. y D. E. Lorenzo. 2006. Tesis ácidos grasos poliinsaturados: relación con el funcionamiento de los diferentes órganos, y su implicación en el proceso de pérdida de memoria en el envejecimiento. U. A. B. Madrid.
- Peterson, G., Aguilar, D., Mesa, M., Jáuregui, P., Díaz, H., Simi, M., Tavella, M. 2006. Ácidos grasos *trans* en alimentos consumidos habitualmente por los jóvenes en Argentina. *Arch Pediatr Urug.* 77: 59 – 66.
- Piperova, L. S., U. Moallem, B. B. Teter, J. Sampugna, M. P. Yurawecz, K. M. Morehouse, D. Luchini, and R. A. Erdman. 2004. Changes in milk fat in response to dietary supplementation with calcium salts of *trans*-18:1 or conjugated linoleic fatty acids in lactating dairy cows. *J. of Dairy Sci.* 87: 3836 – 3844.
- Posada, S. L., y R. R. Noguera. 2005. “*in vitro* gas production technique: a tool for evaluation of ruminant feeds”. *Livestock research for rural development.* 17 (4). www.scopus.com
- Pottier, J., Focant, M., Debier, C., De Buysser, G., Goffe, C., Mignolet, E., Froidmont, E., Larondelle, Y. 2006. Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. *J. Dairy Sci.* 89: 685 – 692.
- Poveda, E., P. Ayala, M. Rodríguez, E. Ordóñez, C. Baracaldo, W. Delgado, M. Guerra. 2005. Efecto del suplemento de aceites vegetales sobre el perfil lipídico en ratas wistar. *Biomédica* 25: 101 – 109.
- Pueyrredón, P., A. Rovirosa, M. E. Torres, R. Uicich. 1999. Ácidos grasos *trans*: actualización y situación Argentina. *Revista de la Sociedad Argentina de Nutrición* 10: 61 – 68.
- Ramírez-Mella M., O. Hernández-Mendo, E. J. Ramírez-Bribiesca, R. D. Améndola-Massiotti, M. M. Crosby-Galván y J. A. Burgueño-Ferreira. 2013. Effect of vitamin E on milk composition of grazing dairy cows supplemented with

- microencapsulated conjugated linoleic acid. *Trop Anim Health Prod* 45: 1783 – 1788.
- Ritzenthaler, K.L., Mcguire, M.K., Falen, R., Shultz, T.D., Dasgupta, N. y Mcguire, M.A. 2001. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *J. Nutr.* 131: 1548 – 1554.
- Sánchez-Pérez, A., M. M. Delgado-Zamarreno, M. Bustamante-Rangel, and J. Hernandez-Mendez. 2000. Automated analysis of vitamin E isomers in vegetable oils by continuous membrane extraction and liquid chromatography-electrochemical detection. *Journal of Chromatography a.* 881(1-2): 229 – 241.
- Sayago, A., M. I. Marín., R. Aparicio., y M. T. Morales. 2007. Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y aceites.* 58: 74 – 86.
- Silva H. E., M. M. Suarez, R. G. Herrera, T. Nakano, L. Ozimek y I. Verdalet. 2007. Alto contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche y productos derivados al incorporar semillas de girasol a la dieta vacuna. Implicaciones sobre el riesgo trombo/aterogénico. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 57: 173 – 178.
- Schofield, P. 2000. Gas production methods. In: farm animal metabolism and nutrition. Wallingford (UK). CAB international. pp 450.
- Sosa, V. A. R., M. M. Laguna, y F. I. J. Laguna. 2009. Contenido de ácidos grasos y conjugado del ácido linoleico en carne de bovinos. *Red. Vet.* 10: 1 – 84.
- Soto, P. J. M. 2005. Hidróxido de sodio en la digestibilidad y los indicadores bioquímicos ruminales. *Red Vet.* 6 (2): 1 – 32.
- Steel, R. G. D., y J. H. Torrie. 1996. Bioestadística: principios y procedimientos. Segunda edición. McGraw-Hill. México, D. F. 622 pp.
- Tagliapietra, F., M. Cattani., H. H. Hansen., G. Bittante. Y S. Schiavon. 2013. High doses of vitamin E and vitamin C influence *in vitro* rumen microbial activity. *Anim Feed Sci and Techn.* 183: 210 – 214.
- Tilley J., y Terry R. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br Grass Soc.* 18: 104 – 111.

- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S. and McAllan, A.D.B. and France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185 – 197.
- Toral, P. G., A. Belenguer, P. Frutos, and G. Hervás. 2008. Effect of the supplementation of a high-concentrate diet with sunflower and fish oils on ruminal fermentation in sheep. *Small Ruminant Research* 81: 119 – 125.
- Torrejón, C. y Uauy R. 2011. Calidad de grasa, arterioesclerosis y enfermedad coronaria: efectos de los ácidos grasos saturados y ácidos grasos *trans*. *Rev. Med. Chile.* 139: 924 – 931.
- Torres, G. G., T. F. Arbaiza., F. C. Carcelén. Y O. A. Lucas. 2009. Comparación de las técnicas *in situ*, *in vitro* y enzimática (celulasa) para estimar la digestibilidad de forrajes en ovinos. *Rev. Inv. Vet.* 20: 5 – 9.
- Traber, M. G. and Sies, H. 1996. Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annual Reviews in Nutrition* 16: 321 – 347.
- Tudela, V. 1996. El colesterol: lo bueno y lo malo. Primera edición. Fondo de cultura económica. México D. F.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson., y B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583 – 3597.
- Villegas-Castañeda, M., M. Meneses-Mayo, L. A. Miranda-Romero y O. Loera-Corral. 2010. Producción de gas *in vitro* y desaparición de la materia seca del cultivo sólido con hongos ligninolíticos. *Agrociencias.* 44: 917 – 929.
- Waghorn, G. C., and K. J. Stafford. 1993. Gas production and nitrogen digestion by rumen microbes from deer and sheep. *New Zeland J. Agric. Res.* 4: 493 – 497.
- Williams, B. A. 2000. Cumulative gas production techniques for forage evaluation. In: *Forage evaluation in ruminant nutrition* (Eds. Givens, D. I., Owen., Omend H.M. y Axford R.F.E) Wallingford. UK. CAB. International. pp. 475.
- Wilsdorf, V. G., W. Heinze, and B. Kregel. 1984: Studies into action of sulphamerazine, sulphur, selenium, and/ or vitamin E on rumen infusoria of cattle. *Mh. Vet-Medical* 39: 700 – 703.

- Wei, C., S. X. Lin., J. L. Wu., G. Y. Zhao., T. T. Zhang, and W. S. Zheng. 2015. Effects of supplementing vitamin E on *in vitro* rumen gas production, volatile fatty acid production, dry matter disappearance rate, and utilizable crude protein. *J. Anim Sci.* 60 (8): 335 – 341.
- Weiss, W. P. 1998. Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: A review. *J. Dairy Sci.* 81: 2493 – 2501.
- Zened, A., A. Troegeler-Meynadier., T. Najar., and F. Enjalbert. 2012. Effects of oil and natural or synthetic vitamins E on ruminal and milk fatty acid profiles in cows receiving a high-starch diet. *J. Dairy Sci.* 95: 5916 – 5926.