



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Cinética de biohidrogenación *in vitro* de ácidos grasos poliinsaturados en fluido ruminal**

**Julián Andrés Castillo Vargas**

Universidad Nacional de Colombia

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

Bogotá, Colombia

2012



# **Cinética de biohidrogenación *in vitro* de ácidos grasos poliinsaturados en fluido ruminal**

**Julián Andrés Castillo Vargas**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Producción Animal**

Directora:

Dra. Martha Lucia Pabón Restrepo

Codirectores:

Dr. Juan Evangelista Carulla Fornaguera

Dra. Martha Olivera Angel

Línea de Investigación:

Nutrición Animal

Grupo de Investigación en Nutrición Animal

Universidad Nacional de Colombia

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

Bogotá, Colombia

2012



*El hombre encuentra a Dios detrás de cada  
puerta que la ciencia logra abrir.*

*Albert Einstein*

## Agradecimientos

A Dios y mi familia, por darme las fuerzas y el aliento para continuar.

A la profesora Martha Pabón, por sus valiosos y constantes aportes, como también por la excelente dirección de este trabajo.

Al profesor Juan Carulla, por sus acertadas sugerencias y acompañamiento durante el desarrollo del trabajo de investigación.

A la profesora Martha Olivera por sus sugerencias pertinentes durante la realización del presente trabajo.

A la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia y el Fondo de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia por la financiación del proyecto.

Al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia por su acompañamiento en el procesamiento de las muestras.

A todas las personas que aunque no fueron nombradas en las líneas anteriores, aportaron para que esta investigación fuera una realidad.

## Resumen

Se evaluó el efecto de la combinación de diferentes relaciones de ácido linoléico, alfa-linolénico, eicosapentaenóico y docosahexaenóico con kikuyo, sobre sus cambios de proporción y tasas de conversión a sus principales intermediarios y productos, usando un sistema *in vitro*. Se encontró que las tasas de los pasos iniciales de la biohidrogenación del ácido linoléico pero no del alfa-linolénico, fueron diferentes cuando este ácido estaba en forma pura o en mezcla. La isomerización de ácido linoléico a ácido linoléico conjugado y la reducción de ácido linoléico conjugado a ácido *trans*-vaccénico se incrementaron, con mayores proporciones de alfa-linolénico en las mezclas. La combinación de ácido docosahexaenóico y eicosapentaenóico en relación (75:25) produjo una disminución de ácido esteárico y acumulación de ácido *trans*-vaccénico y C<sub>18:2</sub> *trans*-11, *cis*-15, lo cual sugiere que el ácido docosahexaenóico y eicosapentaenóico tienen acción inhibitoria sobre los últimos pasos de la biohidrogenación.

**Palabras clave:** ácido linoléico, ácido  $\alpha$ -linolénico, ácido docosahexaenóico, ácido eicosapentaenóico, ácido *trans*-vaccénico, biohidrogenación, *in vitro*.

## Abstract

The effect of the combination of different relationships of linoleic acid, alpha linolenic acid, eicosapentanoic and docosahexaenoic with kikuyu on their changes of proportion and conversion rates to their main intermediates and products were evaluated using an *in vitro* system. It was found that the initial steps of the biohydrogenation of linolenic acid were different from the ones of linoleic acid when this acid was in pure form or in a mixture. The isomerization of linoleic acid to conjugated linoleic acid and the reduction of conjugated linoleic acid to *trans*-vaccenic acid were increased with higher proportions of alfa-linolenic acid in the mixtures. The combination of docosahexanoic acid and eicosapentanoic acid using 75:25 ratio resulted in a decrease of stearic acid and accumulation of *trans*-vaccenic acid and C<sub>18:2</sub> *trans*-11 *cis*-15 suggesting that docosahexanoic acid and eicosapentaenoic acid have a inhibitory action on the last steps of biohydrogenation.

**Keywords:** alpha-linolenic acid, biobydrogenation, docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid, *in vitro*, linoleic acid, *trans*-vaccenic acid.

# Contenido

	<u>Pág</u>
Resumen .....	VII
Abstract .....	VIII
Lista de figuras .....	XI
Lista de tablas .....	XIII
Lista de abreviaturas .....	XIV
Introducción .....	16
<b>1. Capítulo 1. Proceso de biohidrogenación en el rumen: mecanismo y perspectiva de la adición de ácidos grasos poliinsaturados, sobre la síntesis de lípidos bioactivos .....</b>	<b>21</b>
1.1 Resumen .....	21
1.2 Introducción .....	21
1.3 Bioquímica del proceso de lipólisis .....	22
1.4 Bioquímica del proceso de biohidrogenación .....	24
1.4.1 Generalidades .....	24
1.4.2 Descripción del mecanismo de la biohidrogenación.....	25
1.5 Ácido linoléico conjugado (ALC): Perspectivas para el incremento de su concentración en leche, a partir de la combinación de ácidos grasos poliinsaturados .....	32
1.5.1 Ácido linoléico conjugado y sus efectos benéficos para la salud humana .....	32
1.5.2 Biosíntesis endógena de ALC.....	33
1.5.3 Efecto de los aceites vegetales y de pescado, sobre la concentración de ALC y ATV en leche y fluido ruminal.....	34
1.6 Indicios de interacción entre el ácido linoléico, $\alpha$ -linolénico, EPA y DHA durante el proceso de biohidrogenación.....	36
1.7 Conclusiones.....	38
1.8 Bibliografía.....	38
<b>2. Capítulo 2. Una aproximación a la cinética y termodinámica de la biohidrogenación ruminal del ácido linoléico, alfa-linolénico y sus combinaciones en un sistema <i>in vitro</i> .....</b>	<b>47</b>
2.1 Resumen .....	47

2.2	Introducción .....	48
2.3	Materiales y métodos .....	49
2.3.1	Forraje .....	50
2.3.2	Mezclas de ácidos grasos .....	50
2.3.3	Composición de ácidos grasos .....	51
2.3.4	Análisis de la termodinámica de los procesos de biohidrogenación, mediante química computacional .....	52
2.4	Análisis estadístico .....	52
2.4.1	Estimación de tasas de isomerización y biohidrogenación .....	52
2.4.2	Estimación de tasas de acumulación para el ATV.....	52
2.5	Resultados .....	53
2.5.1	Cinética de biohidrogenación del ALi y ALn, de sus intermediarios y del producto principal .....	53
2.5.2	Tasas de isomerización y biohidrogenación para el ALi, ALn y sus principales intermediarios .....	58
2.5.3	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca .....	59
2.6	Discusión de resultados .....	60
2.6.1	Tasas de isomerización y biohidrogenación para el ALi, ALn y sus principales intermediarios .....	60
2.6.2	Acumulación de los principales intermediarios.....	62
2.6.3	Indicios de procesos de desaturación de los AG en el rumen .....	63
2.6.4	Efecto de la relación ALi:ALn sobre la digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca de kikuyo .....	66
2.7	Conclusiones .....	66
2.8	Bibliografía .....	67
<b>3.</b>	<b>Capítulo 3. Efecto de la adición de diferentes proporciones de EPA y DHA sobre la biohidrogenación <i>in vitro</i> del ácido linoléico y alfa-linolénico.....</b>	<b>73</b>
3.1	Resumen .....	73
3.2	Introducción .....	74
3.3	Materiales y métodos.....	75
3.3.1	Tratamientos e incubación.....	75
3.3.2	Forraje .....	76
3.3.3	Mezclas de ácidos grasos .....	77
3.3.4	Composición de ácidos grasos .....	77
3.4	Análisis estadístico .....	78
3.5	Resultados y discusión .....	78
3.5.1	Efecto de la adición de EPA y DHA sobre la cinética de biohidrogenación del ALi y ALn, como de sus intermediarios y productos .....	78
3.5.2	Efecto de la combinación del EPA y del DHA, sobre su cinética de desaparición .....	79
3.5.3	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca .....	81
3.6	Conclusiones .....	82
3.7	Bibliografía .....	83
<b>4.</b>	<b>Capítulo 4. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>90</b>
4.1	Conclusiones .....	90
4.2	Recomendaciones .....	91

## Lista de figuras

	<u>Pág</u>
<b>Figura 1-1:</b> Hidrólisis del triglicérido trilinoleil .....	23
<b>Figura 1-2:</b> Rutas principales de la biohidrogenación del ácido linoléico y alfa-linolénico en el rumen, junto con los grupos de microorganismos implicados.....	26
<b>Figura 1-3:</b> Mecanismo propuesto por Kepler et al., (1971), para la conversión de ácido linoléico en ALC.....	27
<b>Figura 1-4:</b> Mecanismo de reacción de las isomerasas de <i>Butirivibrio fibrisolvens</i> (IBF), <i>Propionobacterium filicina</i> (IPF) y <i>Propionobacterium acnés</i> (IPA).....	27
<b>Figura 1-5:</b> Biohidrogenación de ácidos grasos insaturados en el rumen, a pH bajo.....	28
<b>Figura 1-6:</b> Mecanismo de reacción de la isomerasa de ácidos grasos poliinsaturados de <i>Propionobacterium acnés</i> .....	29
<b>Figura 1-7:</b> Estructura de: (a) alfa-tocoferolquinol; (b) alfa-tocoferolquinolquinona.....	31
<b>Figura 1-8:</b> Esquema de transferencia electrónica de dos moléculas de alfa-tocoferolquinol, para la reducción del enlace <i>cis</i> del sistema conjugado.....	31
<b>Figura 1-9:</b> Estructura química de los isómeros de ácido linoléico conjugado y del ácido linoléico. Los ácidos grasos son el (A): C <sub>18:2</sub> <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12, (B): C <sub>18:2</sub> <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 y (C): C <sub>18:2</sub> <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12.....	32
<b>Figura 1-10:</b> Biosíntesis de ALC a partir de ATV, por la Estearoil CoA desaturasa.....	33
<b>Figura 2-1:</b> Cambios en la proporción de ALi y ALn para los tratamientos evaluados, durante 16 horas de incubación.....	55
<b>Figura 2-2:</b> Cambios en la proporción de ALC y C <sub>18:2</sub> <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 para los tratamientos evaluados, durante 16 horas de incubación.....	56
<b>Figura 2-3:</b> Cambios en la proporción de ATV y C <sub>18:0</sub> para los tratamientos evaluados, durante 16 horas de incubación.....	57
<b>Figura 2-4:</b> Modelo de la biohidrogenación ruminal <i>in vitro</i> del ácido linoléico y del ácido $\alpha$ -linolénico desde las 0 hasta las 16 horas de incubación en: T <sub>1</sub> (100:0), T <sub>2</sub> (75:25), T <sub>3</sub> (50:50), T <sub>4</sub> (25:75) y T <sub>5</sub> (0:100).....	58
<b>Figura 2-5:</b> Descripción termodinámica para los pasos principales de la biohidrogenación de ácido linoléico y ácido $\alpha$ -linolénico. Los valores sobre las flechas representan para cada proceso el cambio de energía libre de Gibbs ( $\Delta G_{rxn}$ ) en cal/mol a 37°C.....	63
<b>Figura 2-6:</b> Relación de las sumatorias de cambios de proporción de ALi y	

XII Cinética de biohidrogenación *in vitro* de ácidos grasos poliinsaturados en fluido ruminal

---

ALn vs cambios de C<sub>18:0</sub> para los tratamientos..... **65**

## Lista de tablas

	<u>Pág</u>
<b>Tabla 1-1:</b> Efecto de la suplementación con aceites vegetales, sobre los niveles de ALC en la leche.....	34
<b>Tabla 2-1:</b> Análisis proximal y perfil de ácidos grasos del forraje.....	50
<b>Tabla 2-2:</b> Proporciones de ácidos grasos de las mezclas usadas en los tratamientos.....	51
<b>Tabla 2-3:</b> Tasas de acumulación del ATV (%/h) para los tratamientos evaluados.....	54
<b>Tabla 2-4:</b> Tasas de conversión para los tratamientos evaluados.....	59
<b>Tabla 2-5:</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca del kikuyo para los diferentes tratamientos evaluados.....	59
<b>Tabla 3-1:</b> Análisis proximal y perfil de ácidos grasos del forraje.....	76
<b>Tabla 3-2:</b> Mezclas de ácidos grasos usadas en los tratamientos.....	77
<b>Tabla 3-3:</b> Cambios en la proporción de intermediarios de la BH del ALi y ALn para los tratamientos evaluados, durante 16 horas de incubación.....	80
<b>Tabla 3-4:</b> Cambios en la proporción del EPA y el DHA para los tratamientos evaluados, a diferentes tiempos de incubación.....	81
<b>Tabla 3-5:</b> Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca del kikuyo para los diferentes tratamientos evaluados.....	81



## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
<b>ALi</b>	Ácido linoléico
<b>ALn</b>	Ácido alfa-linolénico
<b>ATV</b>	Ácido <i>trans</i> -vaccénico
<b>ALC</b>	Ácido linoléico conjugado
<b>C<sub>18:0</sub></b>	Ácido esteárico
<b>AOI</b>	Ácido oléico
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenóico
<b>DHA</b>	Ácido docosahexaenóico
<b><math>\Delta G_f</math></b>	Energía libre de formación
<b>BH</b>	Biohidrogenación
<b>DIVMS</b>	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la material seca
<b>pH</b>	Potencial de hidrogeniones
<b>PC</b>	Proteína cruda
<b>Cen</b>	Cenizas
<b>EE</b>	Extracto etéreo
<b>FDN</b>	Fibra en detergente neutro
<b>FDA</b>	Fibra en detergente ácido
<b>CG-FID</b>	Cromatografía de gases acoplada a detector de ionización en llama
<b><math>\Delta G_{rxn}</math></b>	Cambio de energía libre de reacción
<b>AIC</b>	Akaike Information Criterion
<b>t</b>	Geometría <i>trans</i>
<b>c</b>	Geometría <i>cis</i>
<b>M</b>	Concentración molar

## Introducción

El mejoramiento de la calidad composicional de la grasa de la leche bovina, ha ganado un creciente interés, debido a la presencia de un compuesto potencialmente benéfico para la salud humana, el cual es el Ácido Linoléico Conjugado ( $C_{18:2}$  *cis*-9, *trans*-11, ALC). El ALC pertenece a una familia de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoléico ( $C_{18:2}$  *cis*-9, *cis*-12, ALi). El ALC es el isómero mayoritario en la grasa láctea y representa entre el 80-90% del total de isómeros (Parodi, 1977; Chin *et al.*, 1992; Sehat *et al.*, 1998). Entre los efectos benéficos que el ALC presenta para la salud humana, está su actividad anticancerígena (Cesano *et al.*, 1998; Palombo *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2003) y la reducción de riesgo de preeclampsia en mujeres primigrávidas (Herrera *et al.*, 2004).

El ALC se obtiene a partir de la biohidrogenación (BH) parcial ruminal del ALi (Harfoot y Hazlewood, 1997; Bauman *et al.*, 1999) y a partir de síntesis endógena en la glándula mamaria, por la deshidrogenación entre los carbonos 9 y 10 del ácido *trans*-vaccénico ( $C_{18:1}$  *trans*-11, ATV), por acción de la Esteroil CoA desaturasa (ECD) (Griinari y Bauman, 1999). Además, el ATV es un intermediario de la BH del ácido alfa-linolénico ( $C_{18:3}$  *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15, ALn). El 91% del ALC es sintetizado endógenamente (Kay *et al.*, 2004).

Cuando se suplementa la dieta con aceites vegetales, se incrementan las concentraciones de ALC y ATV en grasa láctea (Harvatine y Bauman, 2006). Los aceites vegetales, se encuentran mayoritariamente compuestos por ALi, ALn y ácido oleico ( $C_{18:1}$  *cis*-9, AOI) (Rojas *et al.*, 2005). Gran parte de la literatura afirma, que los aceites vegetales ricos en ALi en comparación a ALn, generan los niveles más altos de ALC en grasa láctea y de ATV en fluido ruminal (Polan *et al.*, 1964; Agazzi *et al.*, 2004, Palmquist y Griinari, 2006). Así, los resultados anteriores indicarían que el ALi es el principal precursor de ALC (Polan *et al.*, 1964; Agazzi *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha encontrado que el ALn produce hasta cuatro veces más ATV que el ALi (Jouany *et al.*, 2007). En consecuencia, el ALn también presenta potencialidad para incrementar los niveles de ALC en grasa láctea y de ATV en fluido ruminal, no siendo claro si el ALi o ALn, es el principal precursor de ALC en grasa láctea.

Las concentraciones de ALC y ATV en leche y fluido ruminal, se pueden incrementar aún más, cuando se combinan aceites vegetales y de pescado (Shingfield *et al.*, 2006; AbuGhazaleh y Holmes, 2007; Brown *et al.*, 2007; Cruz-Hernandez, *et al.*, 2007). El uso

de aceites de pescado sin combinación con aceites vegetales, también incrementa la concentración de ALC en grasa láctea. Este efecto es generado por los niveles de ácido eicosapentaenóico ( $C_{20:5}$  *cis*-5, *cis*-8, *cis*-11, *cis*-14, *cis*-17, EPA) y docosahexaenóico ( $C_{22:6}$  *cis*-4, *cis*-7, *cis*-10, *cis*-13, *cis*-16, *cis*-19, DHA) que los aceites de pescado poseen (Rojas *et al.*, 2005). El efecto del EPA y DHA en el proceso de BH, se centra principalmente en su acción inhibitoria sobre el último paso de la BH del ALi y ALn, es decir en la conversión de ATV en  $C_{18:0}$  (Chilliard *et al.*, 1999; AbuGhazaleh y Jenkins, 2004). Algunos autores como Chow *et al.*, (2004) proponen una posible acción diferencial del EPA y DHA durante el proceso de BH.

La Literatura reporta que el impacto del EPA y DHA sobre los otros pasos de la BH es reducido (Klein y Jenkins, 2011), pero se ha encontrado que los ácidos grasos pueden inhibir también las isomerasas, dado que según lo encontrado por Wasowska *et al.*, (2006), estos producen la acumulación de ALi y ALn.

Así, los hallazgos expuestos permiten proponer la posible interacción del ALi, ALn, EPA y DHA durante el proceso de BH. Sin embargo, no existen investigaciones publicadas que permitan confirmar o rechazar esta hipótesis. De esta manera, en el presente trabajo se evaluó mediante ensayos *in vitro*, el efecto de la combinación de kikuyo y diferentes relaciones de ALi, ALn, EPA y DHA puros sobre su desaparición y la proporción de sus intermediarios y producto principales, como también sobre sus tasas de paso. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la combinación de los ácidos grasos, sobre la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) del kikuyo.

El documento se enmarca en cuatro capítulos. En el primero se presenta una revisión general referente al proceso de biohidrogenación en el rumen del ALi y ALn y el efecto de los aceites vegetales y de pescado, sobre los niveles de ALC y ATV en grasa láctea y fluido ruminal. En el capítulo dos, se dan a conocer los resultados de la evaluación del efecto de la incubación en fluido ruminal, de una cantidad constante de ácidos grasos poliinsaturados (ALi, ALn) con relaciones variables entre ellos, sobre sus velocidades de conversión y saturación, BH y proporción de sus principales intermediarios y productos, con énfasis en ALC, ATV y  $C_{18:0}$ . Adicionalmente se calculan para los principales pasos de la BH, los cambios de energía libre de Gibbs ( $\Delta G_{rxn}$ ) usando química computacional. Se propone la existencia de un sinergismo de la isomerización del ALi en ALC, cuando se realiza la sustitución parcial de ALi por ALn.

En el capítulo tres, se presentan los resultados de la evaluación del efecto de la combinación de diferentes relaciones de EPA:DHA y una relación de ALi:ALn de 75:25, sobre la proporción de los principales intermediarios de la BH del ALi y ALn, con énfasis en ALC, ATV y  $C_{18:0}$ , en fluido ruminal. Se propone que la acción inhibitoria del EPA y DHA se da en los pasos metabólicos intermedios y finales, pero no en los iniciales de la BH del ALi y ALn. Además, se presenta una evidencia de que ciertos ácidos grasos  $C_{18:1}$  *trans* presentan mecanismos o son metabolizados por reductasas diferentes con relación a otros. En el capítulo cuatro, se presentan conclusiones y recomendaciones generales orientadas al desarrollo de trabajos futuros que enriquezcan el campo de investigación abordado en este trabajo.

## Bibliografía

ABUGHAZALEH AA y Holmes LD. Diet supplementation with fish oil sunflower oil to increase conjugated linoleic acid levels in milk fat of partially grazing dairy cows. J Dairy Sci 2007; 90: 2897-2904.

ABUGHAZALEH AA y Jenkins TC. Disappearance of Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic acids from cultures of mixed ruminal microorganisms. J Dairy Sci 2004; 87: 645-651.

AGAZZI A, Bayourthe C, Nicot MC, Troegeler-Meynadier A, Moncoulon R y Enjanbert E. In situ ruminal biohydrogenation of fatty acids from extruded soybeans: effects of dietary adaptation and of mixing with lecithin or wheat Straw. Anim Feed Sci Technol 2004; 117: 165-175.

BROWN W, AbuChazaleh AA y Ibrahim S. Conjugated linoleic acid in milk fat of grazing dairy cows fed fish oil and linseed oil. Research J Dairy Sci 2007; 1: 6-12.

CESANO A, Visonneau S, Scimeca JA, Kritchevsky D y Santoli D. Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. Anticancer Res 1998; 18:1429-1434.

CHILLIARD Y, Chardigny JM, Chabrot J, Ollier A, Sebedio JL y Doreau M. Effects of ruminal or postruminal fish oil supply on conjugated linoleic acid (CLA) content of cow milk fat. Proc Nutr 1999; 58:70A (Abstr.).

CHIN SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL y Pariza MW. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. J Food Compos Anal 1992; 5:185-197.

CHO HJ, Kim WK, Kim EJ, Jung KC, Park S, Lee HS, Tyner AL, Park JH. Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2003; 284:G996-1005.

CHOW TT, Fievez V, Moloney AP, Raes K, Demeyer D y Smet S. Effect of fish oil in vitro hydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediated. Anim Feed Sci Technol 2004; 117: 1-12.

CRUZ-HERNANDEZ C, Kramer JKG, Kennelly JJ, Glimm DR, Sorencen BM, Okine EK, et al. Evaluating the conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in milk fat of dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. *J Dairy Sci* 2007; 90: 3786-3801.

PALMQUIST DL y Griinari JM. Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oils in the diet. *Anim Feed Sci Technol* 2006; 131: 358–369.

GRIINARI JM y Bauman DE. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: Yurawecs MP, Mossoba MM, Kramer JK, Pariza MW, Nelson GJ, editors. *Advanced in conjugated linoleic acids reseach*, Vol. 1 Champaign (IL): AOCS Press. 1999. p. 180-200.

HARVATINE K y Bauman DE. SREBP1 and Thyroid Hormone Responsive Spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced fat depression and treatment with CLA. *J Nutr* 2006; 136: 2468-2474.

HERRERA JA, Shahabudin AKM, Faisal M, Ersheng G, Wei J, Lixia D, Gandaho T y Lopez P. Efectos de la suplementación oral con Calcio y ácido linoléico conjugado en primigrávidas de alto riesgo. *Colombia médica* 2004; Vol. 35. No. 1.

JOUANY JP, Lassalas B, Doreau M, Glasser F. Dynamic features of the rumen metabolism of linoleic acid, linolenic acid and linseed oil measured in vitro. *Lipids* 2007; 42: 351-360.

KAY JK, Mackle TR, Auldism MJ, Thomson NA y Bauman DE. Endogenous Synthesis of cis-9, trans-11 Conjugated linoleic Acid in Dairy Cows Fed Fresh Pasture. *J. Dairy Sci* 2004; 87:369–378.

KLEIN CM y Jenkins TC. Docosahexaenoic acid elevates trans-18:1 isomers but is not directly converted into trans-18:1 isomers in ruminal batch cultures. *J Dairy Sci.* 2011; 94(9):4676-83.

PALOMBO JD, Ganguly A, Bistrrian BR y Menard MP. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Lett* 2002; 177:163-172.

PARODI PJ. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J Dairy Sci* 1977; 60: 1550-1553.

POLAN CE, McNeill JJ y Tove SB. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *J Bacteriol* 1964; 88:1056-1064.

ROJAS CI, Pabón M, Carulla J. In: Pabón M y Ossa J. *Bioquímica, nutrición y alimentación de la vaca*. Editorial Biogénesis. 2005. p. 91-110.

SEHAT NJ, Kramer KG, Mossoba MM, Yurawecs MO, Roach JAG, Eulitz K, Morehouse KM y Ku Y. Identification of conjugated linoleic acids isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids* 1998; 33:963-971.

SHINGFIELD KJ, Reynolds CK, Lupoli B, Toivonen V, Yurawecz MP y Beever DE. Examination of the perspective of milk fatty acids composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *J Dairy Sci* 2006; 89: 714-732.

WASOWSKA I, Maia MR, Niedźwiedzka KM, Czauderna M, Robeiro JM, Devillard E, et al. *Br J of Nutr* 2006; 95: 1199-1211.

# 1. Capítulo 1. Proceso de biohidrogenación en el rumen: mecanismo y perspectiva de la adición de ácidos grasos poliinsaturados, sobre la síntesis de lípidos bioactivos

## 1.1 Resumen

El metabolismo de lípidos en el rumen, se inicia con la hidrólisis de triglicéridos, galactolípidos, fosfolípidos y sulfolípidos, liberándose los respectivos ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Nuevos trabajos demuestran que el mecanismo de producción de ácido linoléico conjugado ( $C_{18:2}$  *cis*-9 *trans*-11, ALC) involucra un desplazamiento prototrópico y que la producción del isómero  $C_{18:2}$  *trans*-10 *cis*-12 a partir del ácido linoléico ( $C_{18:2}$  *cis*-9, *cis*-12, ALi), se da por la intervención del cofactor  $FAD^+$ . El segundo paso en la biohidrogenación (BH) es realizado por la enzima *cis*-9 *trans*-11 octadecanoato reductasa, la cual utiliza como electrodonor el alfa-tocoferolquinol, produciéndose el ácido *trans*-vaccénico ( $C_{18:1}$  *trans*-11, ATV), el cual es transformado posteriormente en  $C_{18:0}$ .

La inclusión de aceites vegetales ricos en ALi en la dieta de rumiantes, incrementa la concentración de ALC y ATV en leche y en fluido ruminal, lo cual indicaría que el ALi es mejor precursor que el ALn en la producción de ALC y ATV. Sin embargo, existen otros reportes que muestran que el ALn produce una concentración de ATV cuatro veces superior a la del ALi, generándose así posiciones encontradas hacia cual de los ácidos grasos (ALi o ALn) es el mejor precursor. La combinación de aceite de pescado, ácido eicosapentaenóico (EPA) o docosahexaenóico (DHA) con aceites vegetales ricos en ALi produce mayores concentraciones de ALC y ATV en leche que cuando se usa sólo aceite vegetal, lo cual sugiere un efecto positivo del EPA y DHA en el proceso de BH del ALi y ALn.

## 1.2 Introducción

Los ácidos grasos poliinsaturados, particularmente el ALi y ALn, se encuentran en cantidades significativas en forrajes y suplementos lipídicos (Bauman *et al.*, 1999). Estos

ácidos grasos se incluyen en la dieta de rumiantes, con miras a modificar la calidad y el perfil de ácidos grasos de la leche y la carne. La composición de ácidos grasos en leche y carne de rumiantes, se caracteriza por la presencia de una mayor concentración de ácidos grasos saturados que insaturados (Bauman *et al.*, 1999), debido al proceso de BH en el rumen. Es por esto que el conocimiento del mecanismo de la BH, se constituye como un punto crítico a considerar, cuando se trata de modificar la proporción entre saturados e insaturados en la leche y en la carne.

Se han estudiado de manera extensiva, diversos factores que afectan el proceso de biohidrogenación del ALi y ALn, como también estrategias nutricionales que muestran resultados positivos en el incremento de ATV y ALC en leche y fluido ruminal (Harfoot y Hazlewood, 1997). Sin embargo, el número de trabajos publicados, donde se describa bioquímicamente el mecanismo de la BH en el rumen, es reducido.

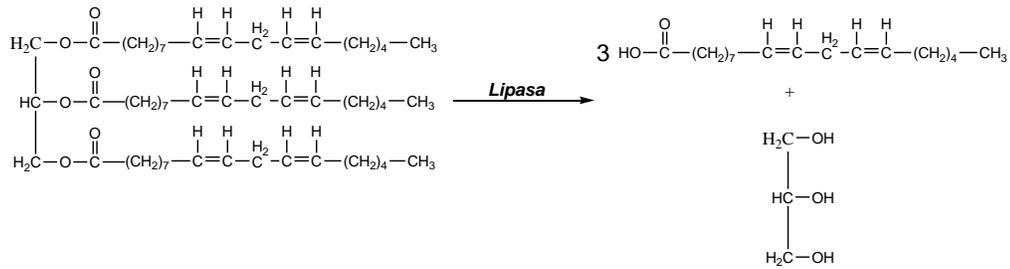
Con este capítulo se pretende brindar un panorama general acerca del mecanismo de BH en el rumen, revisando aspectos químicos propios del proceso. Un mayor conocimiento del proceso de BH, podría permitir el diseño de estrategias nutricionales que incrementen el paso a nivel tisular de ácidos grasos poliinsaturados, con miras a mejorar la calidad nutricional de los derivados lácteos y cárnicos, de rumiantes.

### 1.3 Bioquímica del proceso de lipólisis

Para animales que emplean el sistema de pastoreo como sistema de alimentación predominante, la composición de lípidos dietarios que ingerirán, estará formada principalmente por galactolípidos (mono y digalactosildiglicéridos) y en una menor proporción de sulfolípidos (sulfoquinovosildiglicérido) y fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina, fosfatidil glicerol y fosfatidil etanolamina). Por el contrario, aquellos animales que reciben mayoritariamente cereales o concentrados que contienen aceites vegetales, ingerirán mayoritariamente triglicéridos (Harfoot y Hazlewood, 1997).

El proceso general de la digestión de los lípidos en rumiantes, inicia con la masticación de los alimentos, produciéndose la liberación y posterior exposición de los lípidos contenidos en la matriz alimenticia, gracias a lo cual actúan las lipasas microbiales, las cuales darán inicio a un proceso de hidrólisis enzimática (Dawson *et al.*, 1974). Dicho proceso que precede a la biohidrogenación (Garton *et al.*, 1961), se define como una ruptura química de los enlaces tipo éster o fosfodiésterer, que involucra la incorporación de una molécula de agua y que se encuentra mediado en este caso por la acción enzimática (Figura 1-1).

**Figura 1-1:** Hidrólisis del triglicérido trilinoleil.



En rumiantes, el proceso de lipólisis lo realiza principalmente la especie bacteriana *Anaerovibrio lipolítica*, por la acción de sus lipasas asociadas a sus estructuras membranosas externas, presentándose así un mecanismo lipolítico estrictamente extracelular (Hobson y Summers, 1966 y 1967). Las lipasas tienen una actividad máxima enzimática a pH=7,4 entre 20-22 °C, que se potencializa con el incremento de la concentración de CaCl<sub>2</sub> y BaCl<sub>2</sub> y que se inhibe con la presencia de ZnCl<sub>2</sub> y HgCl<sub>2</sub> (Henderson, 1971). Aunque el proceso lipolítico no se puede atribuir enteramente a la especie mencionada, ya que existen reportes de otros microorganismos con actividad lipolítica (Latham *et al.*, 1972; Hazlewood y Dawson, 1975), esta especie se puede considerar como la más relevante e importante en la lipólisis. Por otro lado, el papel de otro tipo de microorganismos que hacen parte del ambiente ruminal, como lo son los protozoos, es bastante reducido y con resultados muy variables. Además, el papel de los hongos es nulo (Harfoot y Hazlewood, 1997).

A partir de la lipólisis, 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 (Garton *et al.*, 1961; Dawson *et al.*, 1974).

El glicerol se incorpora rápidamente a la glicólisis para la producción de piruvato, el cual es posteriormente transformado en propionato mediante el proceso de fermentación anaerobia (Gartón *et al.*, 1961). Por su parte, la galactosa es rápidamente fermentada y en consecuencia transformada en ácidos grasos volátiles y los ácidos grasos, sufrirán el proceso de biohidrogenación (Dawson *et al.*, 1974; Hazlewood *et al.*, 1976).

Los monogalactosildiglicéridos se hidrolizan más rápidamente que los digalactosildiglicéridos (Dawson y Hemington, 1974, Dawson *et al.*, 1974), los diglicéridos se hidrolizan más rápidamente que los triglicéridos (Harfoot y Hazlewood, 1997), la velocidad de lipólisis aumenta cuando se incrementa el grado de insaturación de los ácidos grasos, con la excepción de los aceites de pescado (Harfoot y Hazlewood, 1997) como también, muy pocas especies bacterianas tienen la capacidad de hidrolizar triglicéridos con ácidos grasos de cadena larga (Jenkins, 1993).

## 1.4 Bioquímica del proceso de biohidrogenación

### 1.4.1 Generalidades

Luego de la lipólisis, se da inicio al proceso de biohidrogenación de los ácidos grasos que componen los lípidos de los recursos alimenticios (Garton *et al.*, 1961). Hace aproximadamente 81 años, se halló por primera vez, que los lípidos que forman los tejidos de rumiantes eran más saturados, que aquellos que formaban los de los no rumiantes (Banks y Hilditch, 1931). De esta manera, por muchos años se creyó que el proceso de biohidrogenación de los lípidos consumidos en los forrajes, ocurría en los tejidos. En la actualidad, se sabe que esto es totalmente errado, puesto que se tiene conocimiento que este proceso ocurre mayoritariamente en el rumen por acción de los microorganismos, y en una pequeña proporción en ciertas regiones del tracto intestinal (Harfoot y Hazlewood, 1997; Lee y Jenkins, 2011).

Desde que se descubrió el papel de los microorganismos en el proceso de biohidrogenación, se ha tratado de establecer que especies son responsables de dicho proceso (Wright, 1959 y 1960), el rol de la distribución física del ambiente ruminal (Hungate, 1966) y de la dieta (Legay-Carmier *et al.*, 1989), entre otros aspectos como la regulación del consumo (Jiang *et al.*, 1996) y la manipulación del ambiente ruminal (Fellner *et al.*, 1997). Wright (1959 y 1960), indagó por primera vez el papel de los microorganismos en el proceso de BH, más específicamente si las bacterias o los protozoos ciliados eran los responsables de dicho proceso, siendo concluido posteriormente que las bacterias son los microorganismos más importantes en el proceso de BH, como lo muestran los trabajos de Dawson y Kemp, (1969) y Singh y Hawke (1979). Lo anterior se ha replanteado, puesto que se ha demostrado recientemente a partir de estudios *in vitro* con fracciones bacteriales (FB) y protozoarias (FP), que las FP producen concentraciones mayores de ALC y ATV en comparación a las FB, cuando se usa aceite de girasol, aceite de canola y aceite de linaza, en orden descendente (aceite de girasol>aceite de canola>aceite de linaza) (Váradyová *et al.*, 2008). A su vez también, algunos hongos celulolíticos, como el *Neocallimastix frontalis*, tienen la propiedad de producir pequeñas cantidades de ALC a partir de ALi (Maia *et al.*, 2007).

En otros estudios, se evaluó como la interacción de la distribución física y la fauna microbiana, afectaba el proceso de BH, haciéndose una descripción preliminar de esta en el trabajo de Hungate, (1966), el cual menciona que la distribución de las bacterias en el ambiente ruminal está lejos de ser uniforme y que aproximadamente la mitad, se encuentran dispersas en la porción líquida del rumen y las restantes se encuentran adheridas a las partículas de alimento, estableciéndose una clasificación, como bacterias adheridas a las superficies (BAS) y bacterias asociadas a la porción líquida (BAL). Los resultados de experimentos realizados con contenidos ruminales fraccionados (Viviani y Borgatti, 1967; Hawke y Silcock, 1970), apuntan a que la presencia de partículas tiene un efecto benéfico en el proceso de BH, hallándose una mayor rapidez de esta, en presencia de partículas que en su ausencia. Trabajos posteriores, permitieron indagar aun más el papel de las partículas en el proceso de biohidrogenación, como los realizados por Harfoot *et al.*, (1973a,b). Ellos mostraron que casi en su totalidad, el proceso de BH del ALi en el rumen, ocurrió por la adhesión del ALi a las partículas de

alimento, no detectándose cambios perceptibles en las células que se encontraban en la porción líquida. Legay-Carmier *et al.*, (1989), hallaron la distribución de bacterias en el rumen de vacas cuya dieta era suplementada con aceite de soya, encontrándose que al menos el 70% eran BAS y solo un 7% BAL. El restante 23% eran bacterias pobremente adheridas a la superficie o que se transferían constantemente de partículas al medio líquido ruminal. Bauchart *et al.*, (1990), mostraron que existe “preferencia” por parte de los ácidos grasos a incorporarse a las partículas de alimento y que la concentración total de los ácidos grasos que se adherían a las BAS era casi del doble, con respecto al del BAL. Así, todo apunta a que luego del proceso de lipólisis y de la liberación de ácidos grasos, estos se van adhiriendo a las partículas sólidas de alimento y van siendo hidrogenados de manera preferencial por las BAS, pudiéndose generar competencia entre las partículas y las bacterias.

### 1.4.2 Descripción del mecanismo de la biohidrogenación

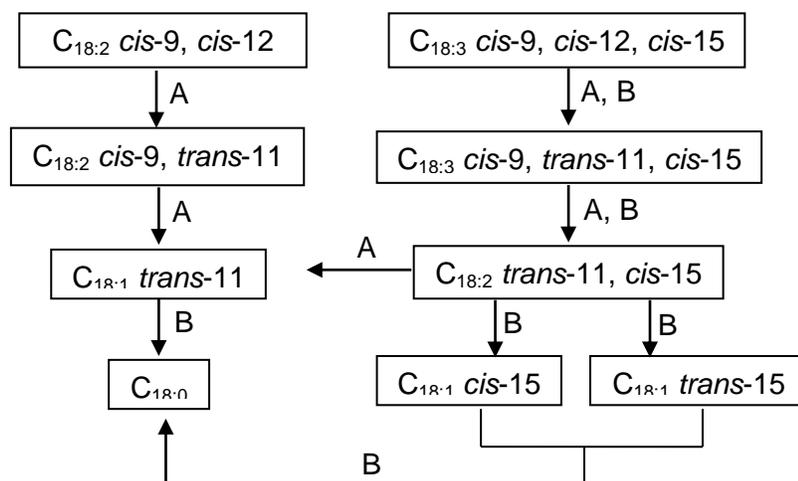
Como se mencionó, la lipólisis se constituye como un paso inevitable antes de la BH. Así mismo, al igual que para el proceso de lipólisis, las bacterias son las principales responsables del proceso de BH, aunque los hongos y protozoos pueden presentar también importancia (Harfoot y Hazlewood, 1997; Maia *et al.*, 2007; Váradyová *et al.*, 2008). Por muchos años, se pensó que la única especie responsable del proceso de BH, era *Butyrivibrio fibrisolvens* (Kepler *et al.*, 1966), sin embargo, investigaciones posteriores mostraron la existencia de otros microorganismos con la potencialidad para biohidrogenar.

Sachan y Davis, (1969), estudiaron la especie *Borrelia* B25, hallando que esta fue inefectiva en la biohidrogenación de AOI pero altamente efectiva en la del ALi, donde el producto principal fue el ATV. Kemp *et al.*, (1975), hallaron cinco especies bacteriales capaces de biohidrogenar en el rumen de ovejas, siendo una de estas caracterizada como *Ruminococcus albus*, dos como *Eubacterium* y las otras dos restantes, como *Fusocillus*. La especie *Fusocillus* fue capaz de biohidrogenar el AOI y ALi hasta C<sub>18:0</sub> y el ALn hasta C<sub>18:1 cis-15</sub>. Por otro lado, la especie *R. albus* y las dos de *Eubacterium* no biohidrogenaron el AOI pero si convirtieron el ALi y ALn a una mezcla de ácidos octadecenóicos, donde el ATV fue el isómero predominante. Harfoot y Hazlewood (1997) en su revisión, muestran una gran variedad de microorganismos que participan en el proceso de BH.

La identificación de los intermediarios químicos producidos y de los diferentes microorganismos ruminales que participan en el proceso de BH ruminal, ha permitido establecer como ocurre en parte dicho proceso. En la actualidad, se sabe que este involucra varios pasos bioquímicos, con velocidades, intermediarios y especies bacteriales características (Bauman *et al.*, 1999). Lourenço *et al.*, (2010) en su revisión presenta una descripción general del amplio número ácidos grasos generados a partir de la BH del ALi y ALn. Este trabajo se centrará en la descripción de las rutas principales.

Para los pasos principales, Kemp y Lander, (1984), dividieron las bacterias en dos grupos, considerando las reacciones químicas en que intervenían y los productos de la BH generados. El grupo A es el responsable de transformar el ALi hasta el ATV. Por su parte, el grupo B transforma el ATV en C<sub>18:0</sub>. Para el ALn, la BH es algo más compleja e involucra en todos los pasos a los dos grupos de bacterias (Figura 1-2). Ambos mecanismos, presentan como paso inicial la isomerización del enlace *cis*-12, de lo cual resulta la formación de un intermediario químico que presenta en su estructura un sistema conjugado con isomería geométrica *cis*-9, *trans*-11 (Harfoot y Hazlewood, 1997).

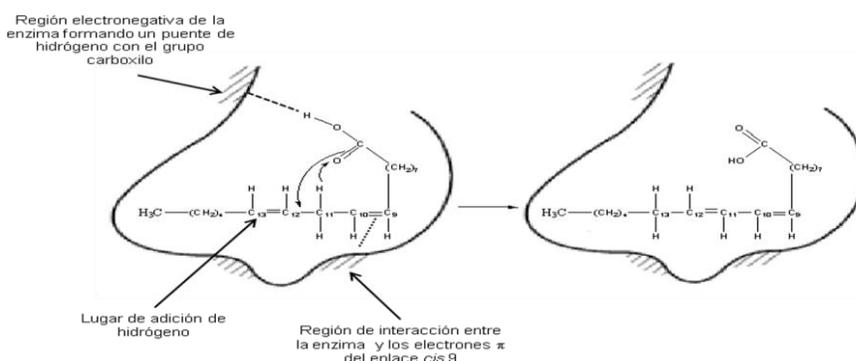
**Figura 1-2:** Rutas principales de la biohidrogenación del ácido linoléico y alfa-linolénico en el rumen, junto con los grupos de microorganismos implicados (Harfoot y Hazlewood, 1997)



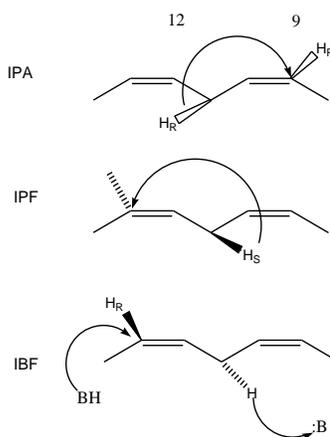
A partir de estudios con *Butirivibrio fibrisolvens*, se ha establecido que el primer paso es realizado por la enzima linoleato isomerasa (EC 5.2.1.5), cuya actividad reside en la membrana de las bacterias (Kepler y Tove, 1967). Kepler *et al.*, (1971), propusieron por primera vez un mecanismo de reacción, definiendo que existen dos sitios de interacción entre la molécula de ALi y la enzima, los cuales son el sistema de electrones  $\pi$  (*cis*-9, *cis*-12) y el grupo carboxilo. Al presentarse la interacción de tales regiones con la enzima, se produce una conformación definida de la molécula de ALi y así, se puede transferir un protón de una tercera región donante de la enzima al carbono 13, haciendo que este adquiera una configuración D, con lo cual se produce un compuesto con el sistema conjugado *cis*-9, *trans*-11 (Figura 1-3). Así, Kepler *et al.*, (1971) demostraron que para que se lleve a cabo el proceso de biohidrogenación, el grupo carboxilo debe estar libre en la estructura. Cuando la linoleato isomerasa fue incubada con ALi en presencia de <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O, un átomo de <sup>2</sup>H fue incorporado para la formación del ALC en una configuración R (grado de marcación, 88%) apuntando lo anterior, a que el mecanismo de isomerización era de desplazamiento prototrópico. Así mismo, mediante el uso de ALi deuterado en la posición 11 como sustrato para esta enzima, se mostró que el mecanismo de isomerización de la linoleato isomerasa de *Butirivibrio fibrisolvens* involucra la remoción del hidrógeno ubicado en el carbono 11 y su transferencia en la misma molécula, ya que no se detectó su pérdida (Liavonchanka y Feussner, 2008).

En la actualidad, los mecanismos mejor conocidos, son para las isomerasas producidas por *Butirivibrio fibrisolvens* (IBF), *Propionobacterium filicina* (IPF) y *Propionobacterium acnes* (IPA) (Liavonchanka y Feussner, 2008) (Figura 1-4), de lo que se tiene conocimiento para el ALi, que la IPA transfiere un hidrógeno del carbono 11 con estereoquímica R al carbono 9 con la misma estereoquímica. Por su parte, la IPF transfiere un hidrogeno del carbono 11 con estereoquímica S a la posición 13, cuya estereoquímica se desconoce en la actualidad y para la IBF, ocurre el proceso inverso, es decir la estereoquímica del protón retirado de la posición 11 es desconocida pero la de aquel agregado en el carbono 13 se sabe que presenta estereoquímica R (Liavonchanka *et al.*, 2006).

**Figura 1-3:** Mecanismo propuesto por Kepler *et al.*, (1971), para la conversión de ácido linoléico en ALC (Harfoot y Hazlewood, 1997).



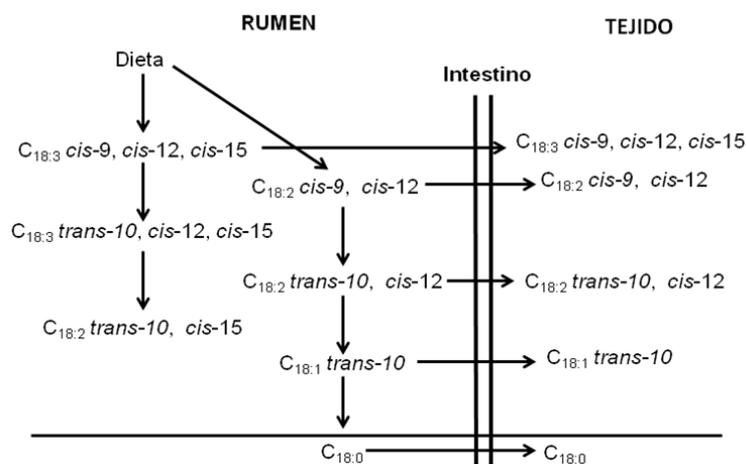
**Figura 1-4:** Mecanismo de reacción de las isomerasas de *Butirivibrio fibrisolvens* (IBF), *Propionobacterium filicina* (IPF) y *Propionobacterium acnes* (IPA). Los dobles enlaces se indican con los números y las líneas punteadas indican que la estereoconfiguración de los hidrógenos transferidos no se encuentra confirmada. (Liavonchanka y Feussner, 2008).



Liavonchanka *et al.*, (2006), estudiaron la estructura y mecanismo de la isomerasa de ácidos grasos poliinsaturados de *Propionobacterium acnes*, estableciendo que el proceso catalítico de conversión del ALi en C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12 (el cual se produce cuando se

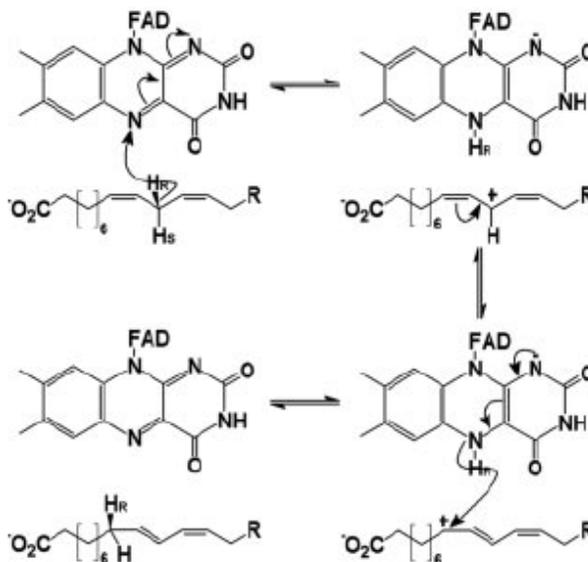
administran dietas altas en concentrado) (Figura 1-5), se realiza por medio del cofactor Flavin Adenin Dinucleótido (FAD<sup>+</sup>), mediante la abstracción de un hidruro del carbono 11 del ALi en configuración R, produciéndose un carbocatión estabilizado por resonancia, en el cual se realiza la isomerización del doble enlace *cis* de la posición 9, a la posición 10 con geometría *trans*, lo cual produce un segundo carbocatión cuya carga se ubica en el carbono 9, posición a la cual es transferido el hidruro inicialmente removido, produciéndose el isómero C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12 (Figura 1-6) (Liavonchanka y Feussner, 2008).

**Figura 1-5:** Biohidrogenación de ácidos grasos insaturados en el rumen, a pH bajo (Rojas et al., 2005).



Termodinámicamente, la isomerización de ALi en C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12 es un proceso que demanda energía, esto porque se requiere la ruptura de un enlace C-H, como paso previo a la isomerización del doble enlace. Se sabe que para la formación del intermediario alílico, se requiere una cantidad aproximada de -16,7 kJ.M<sup>-1</sup>, haciendo de esta reacción, un proceso termodinámicamente irreversible (Liavonchanka y Feussner, 2008). Aunque no se tiene claro como es suministrada esta energía para las IBF e IPF, para la IPA se sabe que la activación y transferencia del hidrógeno de la posición 11, es mediada por el FAD<sup>+</sup>.

**Figura 1-6:** Mecanismo de reacción de la isomerasa de ácidos grasos poliinsaturados de *Propionobacterium acnes* (Liavochanka *et al.*, 2006).



De la Figura 1-4 es claro, que la IBF a diferencia de la IPA, realiza un intercambio de un protón entre el solvente y el isómero  $C_{18:2}$  *cis*-9, *trans*-11 formado. Teniendo en cuenta lo anterior, Liavonchanka y Feussner, (2008) propusieron que la geometría del sitio activo de la *trans*-10, *cis*-12 isomerasa, podría ser diferente del de la *cis*-9, *trans*-11 isomerasa. Dicha afirmación es argumentada por los autores, por la posible presencia en el sitio activo de las isomerasas, de agua o residuos de aminoácidos polares. Así, la protonación del ALi en la posición 13 podría ser mediada por el nitrógeno 5 del FAD<sup>+</sup>, considerando que al formar un grupo amino terciario, este tiene la capacidad de intercambiar rápidamente protones con el solvente. Este posible mecanismo, presenta fuertes indicios experimentales, ya que se ha demostrado la incorporación de deuterio ( $^2H$ ) en el isómero  $C_{18:2}$  *cis*-9, *trans*-11, durante la isomerización de ALi en incubaciones *in vitro* (Wallace *et al.*, 2007).

Kemp *et al.*, (1984a), evaluaron la biohidrogenación de isómeros geométricos de ácidos grasos de 18 carbonos, que presentaban en diferentes posiciones dos dobles enlaces conjugados, empleando de manera independiente los grupos bacteriales A y B. De todos los isómeros posibles, el único que no fue alterado, fue el isómero *cis*-14, *cis*-17. Además, se halló que solo los isómeros *cis*-2, *cis*-5 y *cis*-9, *cis*-12, fueron los únicos compuestos que se isomerizaron en sus correspondientes estructuras *cis*, *trans*, antes de ser biohidrogenados. McKain *et al.*, (2010) evaluaron el proceso de biohidrogenación de diferentes isómeros posicionales y geométricos del ALC y AOI en óxido de deuterio ( $D_2O$ ) al 37,4%, mediante el uso de *Butirivibrio fibrisolvens* JW11, *Butirivibrio proteoclastus* P-18 y *Propionobacterium acnes*. Teniendo en cuenta, que el enriquecimiento con deuterio de los intermediarios formados, durante la incubación de los isómeros geométricos con insaturaciones en la posiciones 9 y 11 fue alrededor de la mitad del de los isómeros  $C_{18:2}$  *trans*-10, *cis*-12 y AOI, los autores sugieren que la reducción de los isómeros geométricos 9, 11 ocurrió mediante un mecanismo diferente en comparación a los otros ácidos grasos insaturados.

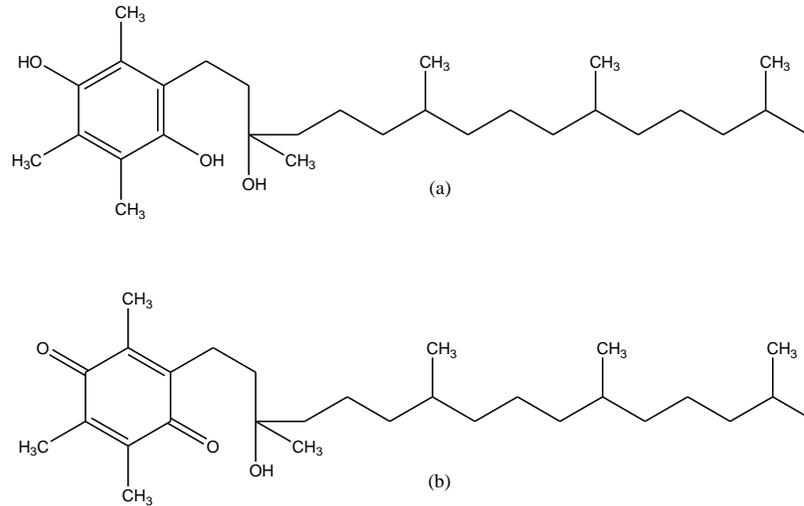
Wallace *et al.*, (2007), investigaron el mecanismo de formación de los isómeros del ALC a partir de ALi, mediante contenido ruminal de ovejas y cultivos de microorganismos puros de *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Clostridium proteoclasticum*, estableciendo para las dos especies, que los isómeros del ALC, C<sub>18:2</sub> *trans*-9, *trans*-11 y C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12 eran los que se producían en mayor cantidad, hallándose en cantidades traza, el C<sub>18:2</sub> *trans*-9, *cis*-11, C<sub>18:2</sub> *cis*-9, *cis*-11 y C<sub>18:2</sub> *cis*-10, *cis*-12. A partir de marcación isotópica y mediante espectrometría de masas, concluyeron que los isómeros geométricos del ALC que presentaban insaturaciones en las posiciones 10 y 12 son sintetizados por un mecanismo que difiere de la síntesis de los isómeros 9, 11. Estos autores sugieren para el mecanismo de biosíntesis del ALC, que el proceso de isomerización se inicia con la abstracción del H del carbono 11 del ALi, formándose un radical termodinámicamente inestable, en el cual se produce la translocación con cambio de geometría *cis* a *trans* del doble enlace, de la posición 12 a la posición 11, con lo cual se forma un radical cuyo electrón desapareado se ubica en el carbono 13. Finalmente, un átomo de hidrógeno es proporcionado por una molécula de agua al carbono 13, con lo cual se produce el ALC. Los autores no proponen un posible compuesto que abstraiga el protón ubicado en el carbono 11.

A partir de su mecanismo propuesto, Wallace *et al.*, (2007), afirman que las diferencias en concentración halladas para los isómeros del ALC, se podrían sustentar en la formación de intermediarios energéticamente menos favorables, esto porque la isomería geométrica juega un papel importante en la estabilidad termodinámica de los compuestos orgánicos. Lo anterior es claramente coincidente con los resultados hallados por Kemp *et al.*, (1984a) y podría dar una explicación parcial a una gran variedad de resultados en donde se ha evaluado la cinética de BH de ALi y ALn y la producción de intermediarios y productos (Troegeler-Meynadier *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2007; Carriquiry *et al.*, 2008).

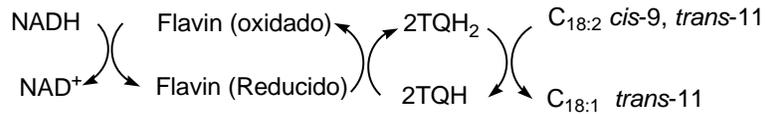
El segundo paso en el proceso de biohidrogenación, conlleva a la reducción del enlace *cis*-9 del sistema conjugado, para producir el ATV a partir del ALi y el C<sub>18:2</sub> *trans*-11, *cis*-15 a partir del ALn. Este paso conlleva la adición de dos hidrógenos al enlace *cis*-9 del sistema de dieno conjugado *cis*-9, *trans*-11, siendo realizado este proceso por la enzima *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoato reductasa (EC 1.3.1.-), la cual ha sido aislada y purificada de *Butyrivibrio fibrisolvens* (Hughes *et al.*, 1982). La enzima es una glicoproteína con 10 moles de fucosa y 12 de galactosa por mol de enzima y que presenta Fe<sup>3+</sup> coordinado, el cual es indispensable para su actividad enzimática, el cual se encuentra involucrado directamente en el proceso de reducción.

El segundo paso, ha sido estudiado para la especie *Butyrivibrio fibrisolvens* (Rosenfeld y Tove, 1971). Yamazaki y Tove, (1979), aislaron a partir de *Butyrivibrio fibrisolvens*, un electrodonor para la biohidrogenación del enlace *cis*-9, siendo este posteriormente identificado como alfa-tocoferolquinol (TQH<sub>2</sub>) (Figura 1-7) (Hughes y Tove, 1980a), sugiriendo estos a partir de otro trabajo (Hughes y Tove, 1980b), que dos moléculas de (TQH<sub>2</sub>) son oxidadas a dos semiquinonas (TQH), aportando así cada una, un electrón para la reducción del enlace *cis* del sistema conjugado (Figura 1-8).

**Figura 1-7:** Estructura de: (a) alfa-tocoferolquinol; (b) alfa-tocoferolquinolquinona (Harfoot y Hazlewood, 1997).



**Figura 1-8:** Esquema de transferencia electrónica de dos moléculas de  $\alpha$ -tocoferolquinol, para la reducción del enlace *cis* del sistema conjugado (Harfoot y Hazlewood, 1997).



Estudios *in vitro* usando ALi marcado, muestran que la isomerización del enlace *cis*-12, se acompaña de la rápida biohidrogenación del ALC hasta ATV. La hidrogenación del ATV (tercer paso) ocurre más lentamente y por lo tanto este se acumula y puede aumentar su disponibilidad para absorción en el intestino (Singh y Hawke, 1979, Moate *et al.*, 2008). Lo anterior, fue confirmado por Kemp *et al.*, (1984b), los cuales evaluaron la habilidad de la especie *Fusocillus* (perteneciente al grupo B) para hidrogenar diferentes isómeros de ácidos octadecenoicos, hasta C<sub>18:0</sub>. Empleando diferentes isómeros *cis*, desde el *cis*-2 hasta el *cis*-13 (excepto el *cis*-3) y todos los isómeros *trans*, desde el *trans*-2 hasta el *trans*-13 (excepto el *trans*-3 y *trans*-4), estos hallaron para los isómeros *cis*, del *cis*-3 al *cis*-11, que se registraron conversiones en C<sub>18:0</sub>, en un rango entre 73 y 79% y para los isómeros *trans*, aproximadamente el 45% de los isómeros *trans*-8, *trans*-9 y *trans*-10 fue hidrogenado, siendo el resto de isómeros convertidos en una proporción muy baja. Así, la reducción del ATV parece ser el paso determinante de la biohidrogenación de ALi y ALn y por lo tanto, este intermediario se puede acumular en el rumen (Moate *et al.*, 2008), aumentándose así su disponibilidad para su absorción a nivel intestinal.

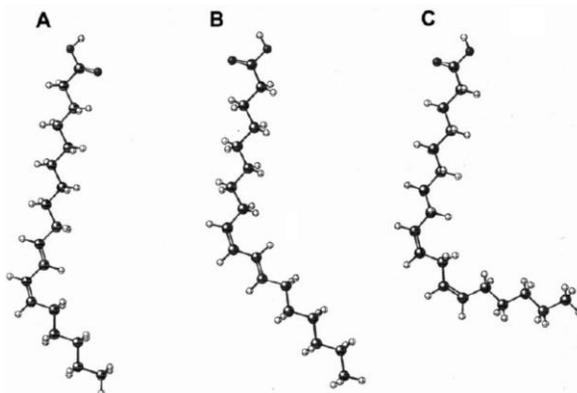
## 1.5 Ácido linoléico conjugado (ALC): Perspectivas para el incremento de su concentración en leche, a partir de la combinación de ácidos grasos poliinsaturados

### 1.5.1 Ácido linoléico conjugado y sus efectos benéficos para la salud humana

El ALC pertenece a una familia de isómeros posicionales y geométricos del ALi. La característica química más notoria de este compuesto, es la presencia de enlaces químicos dobles alternos con sencillos, esto es, doble, sencillo, doble (O'Shea *et al.*, 1998; Bauman *et al.*, 1999). La presencia de ácidos grasos con enlaces dobles conjugados en los productos alimenticios derivados de rumiantes, fue demostrada por primera vez por Booth *et al.*, (1935).

Se han identificado 20 isómeros del ALC diferentes, con varias posiciones de los dobles enlaces en la cadena carbonada y configuración geométrica, esto es en las posiciones 7-9, 10-12, 12-14, 11-13 y 8-10, con geometrías *cis-trans*, *trans-cis*, *cis-cis* y *trans-trans* (Sehat *et al.*, 1998). Se halló, que el isómero mayoritario de dicha familia, era el ALC (Figura 1-9), el cual representa entre el 80-90% de los isómeros totales (Parodi *et al.*, 1977; Chin *et al.*, 1992; Sehat *et al.*, 1998). Bajo ciertas condiciones alimentarias, tales como una administración de dietas altas en concentrado y bajas en fibra, el perfil de isómeros conjugados puede ser alterado, incrementando la concentración en grasa láctea del isómero C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12 (Griinari y Bauman, 1999).

**Figura 1-9:** Estructura química de los isómeros de ácido linoléico conjugado y del ácido linoléico. Los ácidos grasos son el (A): C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12, (B): C<sub>18:2</sub> *cis*-9, *trans*-11 y (C): C<sub>18:2</sub> *cis*-9, *cis*-12.



El ALC y C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12 presentan diferentes actividades biológicas (Martin y Valeille, 2002), siendo atribuidas a uno u otro isómero. Se ha encontrado que el C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12 tiene un efecto positivo en la reducción de la grasa corporal (Martin y Valeille, 2002; Terpstra, 2004) y en la reducción de la diabetes tipo II (Khanal, 2004),

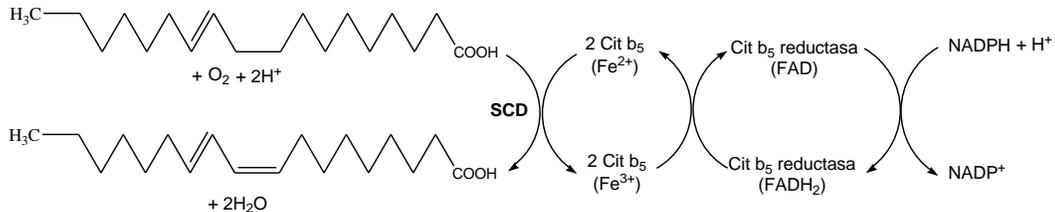
donde el ALC no tiene efecto (Martin y Valeille, 2002). Tricon *et al.*, (2004) sugiere que el ALC presenta mayor actividad anticancerígena en comparación al C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12 y Herrera *et al.*, (2004) encontró que el ALC, reduce el riesgo de preeclampsia, en mujeres primigrávidas.

### 1.5.2 Biosíntesis endógena de ALC

De manera alterna al proceso de BH, la biosíntesis de ALC se realiza por acción de la enzima Estearoil CoA desaturasa (ECD) en glándula mamaria, la cual convierte el ATV en ALC (Ntambi, 1995). El sistema de la desaturación, es un complejo multienzimático formado por NADH-citocromo b5 reductasa, citocromo b5, AcilCoA sintetasa y la terminal ECD (Ntambi, 1995; Yahyaoui *et al.*, 2002). La reacción de la ECD introduce un doble enlace *cis* entre los carbonos 9 y 10 de los ácidos grasos (Figura 1-10).

Estearoil CoA y pamitoil CoA son los sustratos más afines con la enzima y sus productos de desaturación, AOI y ácido palmitoléico, son los componentes más importantes de fosfolípidos y triglicéridos, particularmente para el mantenimiento de la fluidez de la membrana celular (Bauman *et al.*, 1999). En ovejas y vacas en crecimiento, la actividad de la ECD es mayor en el tejido adiposo, estableciéndose esto a partir de la expresión de RNA mensajero y de la actividad de la ECD (Wahle, 1974; St. John *et al.*, 1991).

**Figura 1-10:** Biosíntesis de ALC a partir de ATV, por la Estearoil CoA desaturasa (Nelson y Cox, 2004).



Así, el tejido adiposo es el sitio principal para la biosíntesis de ALC en rumiantes en crecimiento. Para hembras lactantes, la glándula mamaria es el sitio más importante para la síntesis endógena de ALC (Bickerstaffe y Annison, 1972; Kinsella, 1972).

Se ha hallado que el 91% del ALC es sintetizado endógenamente (Kay *et al.*, 2004), hecho que sugiere que esta vía es aquella responsable en su mayoría, por los niveles de ALC en grasa láctea. Sin embargo en trabajos recientes, se ha establecido que su síntesis endógena a partir de ATV, fue equivalente a aproximadamente al 21% de la respuesta por absorción (Shingfield *et al.*, 2006). Lo anterior, plantea la importancia de no sólo incrementar los niveles de ATV en fluido ruminal, sino también de ALC.

### 1.5.3 Efecto de los aceites vegetales y de pescado, sobre la concentración de ALC y ATV en leche y fluido ruminal

Los aceites vegetales incrementan la concentración de ALC en grasa láctea. Entre los más utilizados, se tiene el aceite de soya, aceite de girasol, aceite de linaza, aceite de maíz, aceite de canola y de maní, hallándose las mayores concentraciones de ALC cuando se usa el aceite de girasol (Chouinard *et al.*, 2001; AbuGhazaleh *et al.*, 2003; Matsushita *et al.*, 2007; Rego *et al.*, 2009). En general, se ha establecido que aceites ricos en ALi, generan los niveles más altos de ALC en grasa láctea (Palmquist y Griinari, 2006).

A partir de la suplementación con aceite de girasol, se obtuvo una concentración promedio de ALC de 24,4 mg/g de grasa láctea (Kelly *et al.*, 1998) y 29,4 mg/100 g de leche (Matsushita *et al.*, 2007), siendo seguida muy de cerca cuando se usó aceite de soya, con 22,4 mg/g de grasa láctea (Kay *et al.*, 2004) y 25,7 mg/100g de leche (Matsushita *et al.*, 2007). Sin embargo, la suplementación con aceite de linaza, produjo concentraciones de ALC en grasa láctea inferiores a las de los aceites mencionados (19,5 mg/g de grasa) (Kay *et al.*, 2004), a pesar de que contiene una concentración alta de ALn, precursor importante para la síntesis endógena de ALC (Tabla 1-1).

**Tabla 1-1:** Efecto de la suplementación con aceites vegetales, sobre los niveles de ALC en la leche (Rojas *et al.*, 2005).

Aceite	Ácidos grasos g/100g de aceite			ALC en leche mg/g de grasa		
	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>			
Canola	58,5	23,0	7,7	13,2 <sup>c</sup>		
Maní	51,5	30,2	---	13,3 <sup>a</sup>		
Soya	21,1	50,1	9,0	25,7 <sup>d</sup>	20,4 <sup>b</sup>	22,5 <sup>c</sup>
Girasol	21,2	69,4	---	24,4 <sup>a</sup>	29,4 <sup>d</sup>	
Linaza	22,7	15,4	51,4	16,7 <sup>a</sup>	16,9 <sup>b</sup>	19,5 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Kelly *et al.*, 1998; <sup>b</sup>Dhiman *et al.*, 2000; <sup>c</sup>Chouinard *et al.*, 2001; <sup>d</sup>Matsushita *et al.*, 2007 (mg/100g de leche).

Estudios *in vitro* también respaldan la ventaja de los aceites vegetales, sobre los niveles de ALC. Al suplementar con aceites con altos contenidos de ALi, se aumenta la concentración de ATV y se disminuye la de C<sub>18:0</sub> (Polan *et al.*, 1964; Harfoot *et al.*, 1973, Agazzi *et al.*, 2004). AbuGhazaleh y Jacobson (2007), afirmaron a partir de ensayos *in vitro*, que la BH de ALi fue más eficiente que la de ALn, en la producción de ATV, lo cual podría explicar el porque se registran niveles más altos de ALC, cuando se utiliza aceite de girasol y de soya, en comparación al de linaza.

Harfoot *et al.* (1973) reportaron que altos niveles de ALi inhiben la biohidrogenación del ATV producido y Moate *et al.*, (2008) hallaron que el ATV es un inhibidor competitivo de la BH de ALC a ATV, como también que si su concentración excede las 517 ppm en fluido ruminal, este auto inhibe su BH hasta C<sub>18:0</sub>. Lo anterior aumentaría su cantidad de

paso hacia el tejido mamario y así se incrementaría la concentración ALC de manera endógena.

De esta manera el ALi es el principal precursor de ALC y un inhibidor competitivo de la biohidrogenación de ATV (Polan *et al.*, 1964; Agazzi *et al.*, 2004). Sin embargo, existen reportes en donde se ha hallado que la biohidrogenación de ALn produce una mayor concentración de ATV, que el ALi. Jouany *et al.* (2007) encontraron que la biohidrogenación de ALn produjo aproximadamente cuatro veces más ATV que la de ALi, frente a lo cual los autores argumentaron que los caminos de BH de ALn fueron menos diversos que los del ALi, esto porque para la BH del ALi, el 50% correspondió a las sumatoria de las concentraciones de ALC y ATV y el 50% restante, a otros intermediarios no hallados en la ruta habitual hasta su conversión hasta C<sub>18:0</sub>. Los resultados para la BH del ALn fueron menos diversos, correspondiendo a la sumatoria de ALC y ATV, entre el 60 y el 75% de los intermediarios totales.

De esta manera, es claro que el ALn también presenta potencialidad para incrementar los niveles de ALC en grasa láctea y de este último, junto con ATV en fluido ruminal, habiendo así posiciones encontradas con relación a cual de los dos ácidos grasos, es el principal precursor de ALC en grasa láctea.

Los aceites de pescado aumentan la concentración de ALC en la grasa láctea. Sus principales componentes, son el EPA, cuya concentración puede variar entre el 4 y el 32% y el DHA, el cual puede variar entre el 2 y el 25%. Dicha variación, depende de la especie, las condiciones geográficas y estacionales (Rojas *et al.*, 2005).

En cuanto a si el EPA y DHA, son o no biohidrogenados o biotransformados en el rumen, han existido posiciones encontradas. Doreau y Chilliard, (1997) propusieron que su baja transferencia desde la dieta hasta grasa láctea, se podría atribuir a que son altamente biohidrogenados en el rumen. Por el contrario, Ashes *et al.*, (1992) reportaron una biohidrogenación despreciable de EPA y DHA, cuando aceite de pescado era incubado en fluido ruminal durante 24 horas. A pesar de la existencia de dichos resultados contradictorios, reportes más recientes de Gulati *et al.*, (1999) y AbuGhazaleh y Jenkins, (2004) indican que estas discrepancias se deben, a los niveles de EPA y DHA usados en los ensayos.

Gulati *et al.*, (1999) reportaron una disminución en la desaparición de EPA y DHA, cuando aceite de pescado era incubado a niveles superiores de 1 mg/mL en un sistema *in vitro*. AbuGhazaleh y Jenkins, (2004) hallaron que al aumentar los niveles de EPA y DHA en incubaciones *in vitro*, se presentaba una disminución en su desaparición, siendo esta mayor para el EPA que para el DHA. Frente a esto, dichos autores especulan acerca de la posible existencia de diferentes isomerasas para los ácidos grasos o de la existencia de una sola, con diferentes afinidades.

En la actualidad no se posee un conocimiento completo acerca de los mecanismos de BH o biotransformación del EPA y DHA en el rumen, aunque algunos autores proponen a

partir de estudios *in vitro*, que la desaparición de los mismos se puede deber por su transformación en otros isómeros de 20 y 22 carbonos poliinsaturados, a causa de las reacciones de isomerización, a la biohidrogenación de sus dobles enlaces o a una reducción de su cadena hidrocarbonada (AbuGhazaleh y Jenkins, 2004; Kairenius et al., 2011).

Chilliard *et al.*, (1999) demostraron que la suplementación con aceite de pescado, incrementó la concentración de ATV en fluido ruminal y con ello, un mayor flujo del mismo hacia el intestino. Aparentemente según Chow *et al.*, (2004), el aceite de pescado inhibe el paso final de la biohidrogenación de ALi y ALn, esto por las concentraciones altas de ATV y C<sub>18:2</sub> *trans*-11, *cis*-15 y bajas de C<sub>18:0</sub>. Estos proponen además que la adición de aceite de pescado a dietas que contienen ALi y ALn, podría incrementar la acumulación y flujo duodenal de ATV, con lo cual potencialmente aumentaría la síntesis endógena de ALC. AbuGhazaleh y Jenkins, (2004) hallaron que tanto EPA como DHA, incrementan la concentración de ATV en fluido ruminal (DHA más que EPA), frente a lo cual argumentan que esto se debe a la inhibición de la reductasa de los microorganismos ruminales y a su vez, que no se puede descartar que dichos compuestos contribuyan a la formación de ATV.

En otros estudios, se ha hallado que el EPA y DHA actúan no solo inhibiendo las reductasas, sino también las isomerasas. Wasowska *et al.*, (2006) hallaron mediante ensayos *in vitro*, que la combinación de aceite de pescado, ALi y ALn, causó la acumulación de intermediarios conjugados de ALi y ALn, por lo cual se podría pensar que el efecto de dichos ácidos sobre el proceso de biohidrogenación es más global, decreciendo la velocidad de todos los pasos generadores de intermediarios y productos.

Así, los resultados hasta el momento, muestran la intervención del EPA y DHA en el proceso de biohidrogenación de ALi y ALn, donde su efecto apunta a la inhibición de reductasas y potencialmente de isomerasas de microorganismos ruminales, quedando abierta la posibilidad de un efecto modificador de las tasas de conversión y concentraciones de intermediarios y productos, generados a partir de la BH del ALi y ALn.

## **1.6 Indicios de interacción entre el ácido linoléico, $\alpha$ -linolénico, EPA y DHA durante el proceso de biohidrogenación.**

El conocimiento actual acerca del proceso de biohidrogenación de ALi y ALn y de su conversión en ALC y ATV, es bastante amplio, aunque aún no completo (Chow *et al.*, 2004; AbuGhazaleh y Jacobson, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007). A partir de estudios con cepas puras, se logró establecer que un amplio número de especies de bacterias ruminales, tenían la capacidad de biohidrogenar al ALi y ALn en diferentes proporciones, generándose en consecuencia, diferentes concentraciones de ALC y ATV (Harfoot y

Hazlewood, 1997; Maia *et al.*, 2007). Aunque se consideraba que las bacterias ruminales, eran las principales productoras de ALC y ATV, siendo los protozoos y los hongos de menor importancia (Harfoot y Hazlewood, 1997), en la actualidad se ha establecido a partir de estudios *in vitro* con fracciones bacteriales (FB) y protozoarias (FP), que para las FP, se producen concentraciones mayores de ALC y ATV en comparación a las FB (Váradová *et al.*, 2008). A su vez también, algunos hongos celulolíticos, como el *Neocallimastix frontalis*, tienen la propiedad de producir pequeñas cantidades de ALC a partir de ALi (Maia *et al.*, 2007).

Estudios realizados por Kemp *et al.*, (1984a) con los grupos bacteriales A y B, plantearon la importancia de la existencia del sistema de electrones  $\pi$ , *cis*-9, *cis*-12 en su conversión al isómero *cis*-9, *trans*-11, lo cual es claramente coherente con el mecanismo de isomerización del ALi, propuesto por Kepler *et al.*, (1971) trece años antes en su modelo, en donde se resalta la importancia de dicho sistema, al permitir este junto con el grupo carboxilo, la interacción del ALi con la enzima linoleato Isomerasa, responsable de la isomerización de ALi en el rumen.

En la actualidad, ya se dispone de indicios sólidos a partir de *Butirivibrio fibrisolvens*, de esta reacción de isomerización (Wasowska *et al.*, 2006; Liavonchanka *et al.*, 2006; Wallace *et al.*, 2007; Liavonchanka y Feussner, 2008), como también de la conversión de ALC en ATV, por la enzima *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoato reductasa, en donde el sistema de electrones  $\pi$ , también tiene un papel importante (Yamazaki y Tove, 1979).

En vista de que el ALi y ALn poseen en su estructura un sistema de electrones  $\pi$ , *cis*-9, *cis*-12, entonces se podría pensar en la existencia de posibles fenómenos de sinergismo o antagonismo entre los mismos, sobre la producción de ALC y ATV. Lo anterior, presenta una estrecha relación con los resultados hallados recientemente por Jouany *et al.*, (2007) y Troegeler-Meynadier *et al.*, (2003).

Troegeler-Meynadier *et al.*, (2003) evaluaron de manera *in vitro*, el efecto del pH y de las cantidades de ALi y ALn sobre su BH y concentración de ATV y ALC, a partir de aceite de soya y mezclas de aceite de colza, linaza, soya y de semilla de uva. Estos encontraron que para cantidades iguales de ALi, su BH disminuyó a un pH<6,0 y que dicho decrecimiento en su cantidad de desaparición, fue del 23% después de seis horas de incubación a pH cercano a 7,0, cuando se incrementaba la cantidad de ALn de 10 a 180 mg, sugiriendo estos que con el incremento de ALn, se podría llevar a cabo la inhibición de la isomerización de ALi.

Jouany *et al.*, (2007) midieron la cinética de biohidrogenación *in vitro* de ALi, ALn y de los ácidos grasos en aceite de linaza, mezclando los recursos con dietas compuestas de 45% de heno y 55% de grano de cebada (registrándose en dicha dieta, cantidades bajas de ALi y ALn). Se encontró, que la velocidad de desaparición del ALi fue menor que la del ALn (en la dieta suplementada con este último), frente a lo cual propusieron que esto podría ser debido a una incorporación preferencial de ALi por las bacterias (lo que lo protegería de la biohidrogenación) o también, a diferencias en la afinidad de las isomerasas microbiales, por los dos ácidos poliinsaturados.

Aunque en estudios recientes, se ha hecho la caracterización de los factores en el ambiente ruminal que modifican la concentración de ALC (Choi *et al.*, 2009) y como la presencia de los ácidos grasos poliinsaturados puede ser potencialmente tóxica para los microorganismos ruminales (Maia *et al.*, 2007), estudios en donde se evalúe el efecto de diferentes relaciones de ALi y ALn puros con concentración total constante, sobre la concentración de ALC y ATV en fluido ruminal, no han sido reportados aún, como tampoco, donde se determine el efecto de la combinación de ALi y ALn y relaciones variables de EPA y DHA.

Así, un mejor conocimiento acerca de la interacción de los ácidos grasos poliinsaturados y su efecto en la concentración de ALC y ATV en fluido ruminal, podría encaminar al diseño de suplementos dietarios basados en ácidos grasos, que permitan manipular el proceso de biohidrogenación en una manera más eficiente y a su vez, la obtención de derivados lácteos de origen animal más saludables desde el punto de vista de la nutrición humana y que ejerzan protección al sistema cardiovascular, contra la diabetes tipo II y contra el cáncer.

## 1.7 Conclusiones

Aunque el número de trabajos referentes a dilucidar el mecanismo de la BH de ácidos grasos poliinsaturados es muy reducido, se han realizado estudios que permiten dilucidar aspectos básicos del mecanismo de la BH del ALi. La evaluación del efecto de la combinación de ALi, ALn, EPA o DHA puros y/o provenientes de aceites vegetales o de pescado, sobre la producción de ácidos grasos poliinsaturados, ha generado resultados variables, lo cual se debe posiblemente a las condiciones de los ensayos o a posibles interacciones entre los ácidos grasos. De esta manera, se hace necesaria la realización de trabajos donde se evalúen relaciones variables pero de cantidad total constante, de ácidos grasos poliinsaturados, para así dilucidar los efectos reales de su combinación. El conocimiento de tales efectos, se podría constituir como un punto de partida para proponer posibles estrategias nutricionales encaminadas a incrementar la concentración de ácidos grasos bioactivos en leche y carne.

## 1.8 Bibliografía

ABUGHAZALEH AA, Shingoethe DJ, Hippen AR y Kalscheur KF. Conjugated linoleic acid 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* 2003; 86: 3648-3660

ABUGHAZALEH AA y Jenkins TC. Disappearance of Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic acids from cultures of mixed ruminal microorganisms. *J Dairy Sci* 2004; 87: 645-651.

ABUGHAZALEH AA y Jacobson BN. The effect of pH and polyunsaturated C18 fatty acid source on the production of vaccenic acid and conjugated linoleic acid in ruminal cultures incubated with docosahexaenoic acid. *Anim Feed Sci Technol* 2007; 136: 11-22.

AGAZZI A, Bayourthe C, Nicot MC, Troegeler-Meynadier A, Moncoulon R y Enjanbert . In situ ruminal biohydrogenation of fatty acids from extruded soybeans: effects of dietary adaptation and of mixing with lecithin or wheat Straw. *Anim Feed Sci Technol* 2004; 117: 165-175.

ASHES JR, Siebert BD, Gulati SK, Cuthbertson AZ y Scott TW. Incorporation of n-3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. *Lipids* 1992; 27:629–631.

BANKS A y Hilditch TP. The Glyceride structure of beef talows. *Biochem J* 1931; 25: 1168-1182.

BAUCHART D, Legay-Carmier F, Doreau M y Gaillard B. Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipid supplemented diet. *Br J Nutr* 1990; 63: 563-578.

BAUMAN DE, Baumgard LH, Corl BA y Griinari JM. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Science*. 1-15. <http://jas.fass.org/cgi/reprint/77/E-Suppl/1-ae.pdf>.

BICKERSTAFFE R y Annison AR. The effect of intravenous infusions of sterculic acid on milk fat synthesis. *Br J Nutr* 1972; 27: 561-570.

BOOTH RG, Kon SK, Dann WJ y Moore T. A study of seasonal variation in butter fat. A seasonal spectroscopic variation in the fatty acid fraction. *Biochem J* 1935; 29:133-137.

CHILLIARD Y, Chardigny JM, Chabrot J, Ollier A, Sebedio JL y Doreau M. Effects of ruminal or postruminal fish oil supply on conjugated linoleic acid (CLA) content of cow milk fat. *Proc Nutr* 1999; 58:70A (Abstr.).

CHOI N, Park HG, Kim JH, Hwang H, Kwon KH, Yoon JA, et al. Characterization of environmental factors in Conjugated Linoleic Acid Production by mixed rumen bacteria. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 9263-9267.

CHOUINARD PY, Corneau L, Butler BR, Chilliard Y, Drackley J K y Bauman DE. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentration in milk fat. *J Dairy Sci* 2001; 84:680-690.

CHOW TT, Fievez V, Moloney AP, Raes K, Demeyer D y Smet S. Effect of fish oil in vitro rumen lipolysis, apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediated. *Anim Feed Sci Technol* 2004; 117: 1-12.

DAWSON RMC y Kemp P. The effect of defaunation on the phospholipids and on the hydrogenation of unsaturated fatty acids in the rumen. *Biochem J* 1969; 115: 351-352.

DAWSON RMC y Hemington N. Digestion of grass lipids and pigments in the sheep rumen. *Br J Nutr* 1974; 32: 327-340.

DAWSON RMC, Hemington N, Grime D, Lander D y Kemp P. Lipolysis and hydrogenation of galactolipids and the accumulation of phytanic acid in the rumen. *Biochem J* 1974; 144:169-171.

DHIMAN TR, Satter LD, Pariza MW, Galli MP, Albright K y Tolosa MX. Conjugated linoleic acid (ALC) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J Dairy Sci* 2000; 83: 1016-1027.

DOREAU M y Chilliard Y. Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. *Reprod Nutr Dev* 1997; 37:113-124.

FELLNER V, Sauer FD y Kramer JKG. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. *J Dairy Sci* 1997; 80: 921-928.

GARTON GA, Lough AK y Vioque E. Glyceride Hydrolysis and Glycerol Fermentation by Sheep Rumen Contents. *Microbiol* 1961; 25: 215-255.

GRIINARI JM y Bauman DE. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: Yurawecs MP, Mossoba MM, Kramer JK, Pariza MW, Nelson GJ, editors. *Advanced in conjugated linoleic acids reseach*, Vol. 1 Champaign (IL): AOCS Press. 1999. p. 180-200.

GULATI SK, Ashes JR y Scott TW. Hydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their incorporation into milk fat. *Anim Feed Sci Technol* 1999; 79: 57-64.

HARFOOT CG, Noble RC y Moore RC. Food particles as a site for biohydrogenation of unsaturated fatty acids in the rumen. *Biochem J* 1973a; 132: 829-832.

HARFOOT CG, Noble RC y Moore RC. Factors influencing the extend of biohydrogenation of linoleic acid by rumen microorganism in vitro. *J Sci Food Agric* 1973b; 24: 961-970.

HARFOOT CG, Hazlewood GP. Lipid metabolism in the rumen. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson and C. S. Stewart, ed. Chapman and Hall, London, UK. 1997. p.382-426.

HAWKE JC y Silcock WR. In vitro rate of lipolysis and biohydrogenation in rumen contents. *Biochim Biophys Acta* 1970; 218: 201-212.

HAZLEWOOD GP y Dawson RMC. Isolation and properties of a phospholipid-hydrolysing bacterium from ovine rumen fluid. *J Gen Microbiol* 1975; 89: 163-174.

HAZLEWOOD GP, Kemp P, Lander D y Dawson RMC. C18 unsaturated fatty acid biohydrogenation patterns of some rumen bacteria and their ability to hydrolyse exogenous phospholipids. *Br J Nutr* 1976; 35: 293-297.

HENDERSON C. A Study of the Lipase Produced by *Anaerovibrio Lipolytica*, a Rumen Bacterium. *J Gen Microbiol* 1971; 65: 81-89.

HERRERA JA, Shahabudin AKM, Faisal M, Ersheng G, Wei J, Lixia D, Gandaho T y Lopez P. Efectos de la suplementación oral con Calcio y ácido linoléico conjugado en primigrávidas de alto riesgo. *Colombia médica* 2004; Vol. 35. No. 1.

HOBSON PN y Summers R. Effect of growth rate on the lipase activity of a rumen bacterium. *Nature* 1966. 209:736-737.

HOBSON PN y Summer R. The continuous culture of anaerobic bacteria. *J Gen Microbiol* 1967; 47: 53-65.

HUGHES PE y Tove SB. Identification of an endogenous electron donor for biohydrogenation as  $\alpha$ -tocopherolquinol. *J Biol Chem* 1980a; 255: 4447-4452.

HUGHES PE y Tove SB. Identification of deoxy- $\alpha$ -tocopherolquinol as another endogenous electron donor for biohydrogenation. *J Biol Chem* 1980b; 255: 11802-11806.

HUGHES PJ, Hunter WJ y Tove SB. Biohydrogenation of Unsaturated Fatty Acids. Purification and properties of cis-9,trans-11-octadecadienoate reductase. J Biol Chem 1982; 257(1): 3643-3649.

HUNGATE RE. The rumen and its microbes. New York academic press, New York, NY, 1966 USA.

JENKINS TC. Lipid metabolism in the rumen. J Dairy Sci 1993; 76: 3851-3863.

JIANG J, Bjoerck L, Fonden R y Emanuelson M. Occurrence of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: Effects of feed and dietary regimen. J Dairy Sci 1996; 79: 438-445.

KAIRENIUS P, Toivonen V y Shingfield KJ. Identification and Ruminal Outflow of Long-Chain Fatty Acid Biohydrogenation Intermediates in Cows Fed Diets Containing Fish Oil. Lipids 2011; 46: 587-606.

KAY JK, Mackle TR, Auldish MJ, Thomson NA y Bauman DE. Endogenous Synthesis of cis-9, trans-11 Conjugated linoleic Acid in Dairy Cows Fed Fresh Pasture. J. Dairy Sci 2004; 87:369-378.

KELLY ML, Kolver ES, Bauman DE, Van Amburgh ME y Muller LD. Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating dairy cows. J Dairy Sci 1998; 81:1630-1636.

KEMP P y Lander DJ. The hydrogenation of the series of methylene-interrupted cis,cis-octadecadienoic acids by pure cultures of six rumen bacteria. Br J Nutr 1984; 52: 171-177.

KEMP P, Lander DJ y Holman RT. The hydrogenation of the series of methylene-interrupted cis, cis octadecadienoic acid by pure cultures of rumen bacteria. Br J Nutr 1984a; 52: 171-177.

KEMP P, Lander DJ y Gunstone FD. Hydrogenation of some cis and trans octadecenoic acid to stearic acid by a rumen *Fusocillus* sp. Br J Nutr 1984b; 52: 165-170.

KEMP P, White RW y Lander DJ. The hydrogenation of insaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. J Gen Microbiol 1975; 90: 100-114.

KEPLER CR, Hirons KP, McNeill JJ y Tove SB. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* 1966; 241(6): 1350-1354.

KEPLER CR y Tove SB. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids III. Purification and properties of a linoleato  $\Delta^{12}$ -cis,  $\Delta^{11}$ -trans isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* 1967; 242: 5686-5692.

KEPLER CR, Tucker WP y Tove SB. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. V. Stereospecificity of proton addition and mechanism of action of linoleic acid  $\Delta^{12}$ -cis,  $\Delta^{11}$ -trans- isomerase from *butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* 1971; 246: 2765-2771.

KHANAL RC. Potential health benefits of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 17(9):1315–1328.

KINSELLA JE. Stearoyl CoA as a precursor of oleic acid and glycolipids in mammary microsomes from lactating bovine: possible regulatory step in milk triglyceride synthesis. *Lipids* 1972; 7: 349-355.

LATHAM MJ, Storry JE y Sharpe ME. Effect of low-roughage diets on the microflora and lipid metabolism in the rumen. *App Microbiol* 1972; 24: 871-877.

LEE Y y Jenkins TC. Biohydrogenation of Linolenic Acid to Stearic Acid by the Rumen Microbial Population Yields Multiple Intermediate Conjugated Diene Isomers. *J Nutr* 2011; 141(8): 1445-1450.

LEGAY-CARMIER F y Bauchart D. Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-bean oil. *B J Nutr* 1989; 61: 725-740.

LIAVONCHANKA A, Hornung E, Feussner I y Rudolph MG. Structure and mechanism of the *Propionibacterium acnes* polyunsaturated fatty acid isomerase. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2006. 103: 2576–2581.

LIAVONCHANKA A y Feussner I. Biochemistry of PUFA Double Bond Isomerases Producing Conjugated Linoleic Acid. *ChemBioChem* 2008; 9: 1867 – 1872.

LOURENÇO M, Ramos-Morales E y Wallace RJ. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 2010; 4(7): 1008–1023.

MAIA MRG, Chaudhary LC, Figueres L Wallace RJ. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *A van Leeuw* 2007 91: 303–314.

MARTIN JC y Valeille K. Conjugated linoleic acids: all the same or to everyone its own function?. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42: 525-536

MATSUSHITA M, Tazinafo NM, Padre RG, Oliveira CC, Souza N.E, Visentainer JV, et al. Fatty acid profile of milk from Saanen goats fed a diet enriched with three vegetable oils. *Small Rumin Res* 2007; 72: 127–132.

McKAIN N, Shingfield KJ y Wallace RJ. Metabolism of conjugated linoleic acids and 18:1 fatty acids by ruminal bacteria: products and mechanisms. *Microbiol* 2010; 156: 579–588.

MOATE PJ, Boston RC, Jenkins TC, Lean IJ. Kinetics of Ruminal Lipolysis of Triacylglycerol and Biohydrogenation of Long-Chain Fatty Acids: New Insights from Old Data. *J Dairy Sci* 2008; 91: 731–742.

NTAMBI JM. The regulation of stearoyl CoA desaturase (SCD). *Prog Lipid Res* 1995; 34: 139–150.

O'SHEA M, Lawless F, Staton C y Devery R. Conjugated linoleic acid in bovine milk fat: a food-based approach to cáncer chemoprevention. *Trends in Food Sci & Technol* 1998; 9:192-196.

PALMQUIST DL y Griinari JM. Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oils in the diet. *Anim Feed Sci Technol* 2006; 131: 358–369.

POLAN CE, McNeill JJ y Tove SB. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *J Bacteriol* 1964; 88:1056-1064.

REGO OA, Alves SP, Antunes LMS, Rosa HJD, Alfaia CFM, Prates JAM, et al. Rumen biohydrogenation-derived fatty acids in milk fat from grazing dairy cows supplemented with rapeseed, sunflower, or linseed oils. *J Dairy Sci* 2009; 92: 4530-4540 (Abstract).

RIBEIRO CVM, Eastridge L, Firkins JL, St-Pierre NR, Palmquist DL. Kinetics of fatty acid biohydrogenation *in vitro*. *J Dairy Sci* 2007; 90:1405–1416.

ROJAS CI, Pabón M, Carulla J. In: Pabón M y Ossa J. Bioquímica, nutrición y alimentación de la vaca. Editorial Biogénesis. 2005. p. 91-110.

ROSENFELD IS y Tove SB. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. IV. Source of hydrogen and stereospecificity of reduction. *J Biol Chem* 1971; 246: 5025–5030.

SACHAN DS y Davis CL. Hydrogenation of linoleic acid by a rumen spirochete. *J Bacteriol* 1969; 98(1): 300-301.

SEHAT NJ, Kramer KG, Mossoba MM, Yurawecs MO, Roach JAG, Eulitz K, Morehouse KM y Ku Y. Identification of conjugated linoleic acids isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids* 1998; 33:963-971.

SHINGFIELD KJ, Reynolds CK, Lupoli B, Toivonen V, Yurawecz MP y Beever DE. Examination of the perspective of milk fatty acids composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *J Dairy Sci* 2006; 89: 714-732.

SINGH S y Hawke JC. The in vitro lipolysis and biohydrogenation of monogalactosyldiglyceride by whole rumen contents and its fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1979; 30: 603–612.

St. JOHN LC, Lunt DK y Smith SB. Fatty acid elongation and desaturation enzyme activities of bovine liver and subcutaneous adipose tissue microsomes. *J Anim Sci* 1991; 69: 1064-1073.

TERPSTRA AH. Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans: An overview of the literature. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 352-361.

TRICON S, Burdge GC, Kew S, Banerjee T, Russell JJ, Jones EL, Grimble RF, Williams CM, Yaqoob P, Calder PC. Opposing effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 614-620.

TROEGELER-MEYNADIER A, Nicot MC y Bayourthe C. Effects of pH and concentration of linoleic and linolenic acid on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation in vitro. *J Dairy Sci* 2003; 86: 4054-4063.

VÁRADYOVÁ Z, Kišidayová PS y Dušan J. Comparison of fatty acid composition of bacterial and protozoal fractions in rumen fluid of sheep fed diet supplemented with sunflower, rapeseed and linseed oils. *Anim Feed Sci Technol* 2008; 144: 44-54.

VIVIANI R y Borgatti AR. Micro-organismi del rumine e biohidrogenazione degli acidi poliinsaturi. *Atti Soc Ital Sci Vet* 1967; 21: 254-259.

WAHLE KWJ. Desaturation of long chain fatty acids by tissue preparations of the sheep, rat and chicken. *Comp Biochem Physiol* 1974; 48B: 87-105.

WALLACE RJ, McKain N, Shingfield KJ y Devillard E. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *J Lipid Res* 2007; 48: 2247–2254.

WASOWSKA I, Maia MR, Niedźwiedzka KM, Czauderna M, Robeiro JM, Devillard E, et al. *Br J of Nutr* 2006; 95: 1199-1211.

WRIGHT DE. Hydrogenation of lipids by rumen protozoa. *Nature* 1959; 184: 875–876.

WRIGHT DE. Pectic enzymes in rumen protozoa. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1960; 86: 251–254.

YAHYAOUI MH, Sanchez A y Folch JM. Rapid communication: Partial nucleotide sequence of the goat stearyl coenzyme A desaturase cDNA and gene structure. *J Anim Sci* 2002; 80:866–867.

YAMAZAKI S y Tove SB. Biohydrogenation of Unsaturated Fatty Acids. Presence of dithionite and an endogenous electron donor in butyrivibrio fibrisolvens. *J Biol Chem* 1979; 254(10): 3812-3817.

## 2. Capítulo 2. Una aproximación a la cinética y termodinámica de la biohidrogenación ruminal del ácido linoléico, alfa-linolénico y sus combinaciones en un sistema *in vitro*

### 2.1 Resumen

Se evaluó el efecto de la incubación en fluido ruminal de diferentes relaciones de ácido linoléico ( $C_{18:2}$  *cis*-9, *cis*-12, ALi) y alfa-linolénico ( $C_{18:3}$  *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15, ALn) sobre los procesos de biohidrogenación (BH) de estos ácidos y la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) del kikuyo. Además, se realizó la descripción termodinámica del proceso de BH, usando un modelo multicompartimentalizado para estimar las tasas de conversión entre precursores (ALi y ALn), principales intermediarios y productos y un modelo Gompertz, para estimar la tasa de acumulación de ácido *trans*-vaccénico ( $C_{18:1}$  *trans*-11, ATV). Se agregó a 500 mg de kikuyo, 18  $\mu$ L de diferentes mezclas de ALi:ALn: 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 o 0:100. Los tubos fueron incubados con fluido ruminal durante 0, 2, 4, 6, 8 o 16 horas. Las concentraciones de los ácidos grasos y sus intermediarios fueron determinadas por cromatografía de gases. Se estimó la tasa de acumulación de ATV, mediante el PROC NLIN de SAS y las tasas de conversión entre precursores, intermediarios y productos, usando SAAM II. La proporción de ALi y ALn disminuyó para todos los tratamientos al aumentar los tiempos de incubación, pero la desaparición de ALn fue más rápida que la de ALi. Las mayores proporciones de ácido linoléico conjugado ( $C_{18:2}$  *cis*-9, *trans*-11, ALC) se presentaron al final de la incubación (16 h) y fueron mayores en los tratamientos con mayores adiciones de ALi. Las mayores proporciones de  $C_{18:2}$  *trans*-11, *cis*-15 se presentaron para los tratamientos con mayores inclusiones de ALn. Se encontró un incremento en la proporción de ATV a medida que el tiempo de incubación aumentó en todos los tratamientos. Las mayores proporciones de ATV se presentaron en los tratamientos con mayores cantidades de ALi. Se encontró una correlación positiva (0,857,  $p < 0,01$ ) entre la cantidad de ALi adicionada y la tasa de acumulación de ATV. La construcción del modelo multicompartimentalizado y el análisis de la relación de cambios de proporción entre precursores (ALi y ALn) y producto (ácido esteárico,  $C_{18:0}$ ), permitió establecer la posible desaturación de los ácidos grasos en fluido ruminal. Mientras la sustitución parcial de ALi por ALn incrementó las tasas de paso de ALi a ALC y de ALC a ATV, la sustitución parcial de ALn por ALi no modificó las tasas de conversión de los primeros pasos en la biohidrogenación de ALn, a  $C_{18:2}$  *trans*-11, *cis*-15 y de este a ATV. Para las demás tasas estimadas, no se registraron diferencias entre tratamientos ( $p > 0,05$ ). Los valores de cambio de energía libre de Gibbs ( $\Delta G_{rxn}$ ) para la conversión de ALi a ATV, sugieren que este proceso es cuatro veces más favorable que

el de ALn a ATV. La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) fue mayor para el tratamiento que contenía ALn únicamente, que para los que contenían relaciones ALi:ALn 75:25 y 50:50. Los resultados plantean que la sustitución parcial de ALi por ALn, tiene un efecto sinérgico sobre la conversión de ALi en ALC y de ALC en ATV. El análisis de los parámetros cinéticos y termodinámicos de la BH del ALi y ALn, sugiere que el proceso de BH de estos ácidos es reversible. Sin embargo, dadas las condiciones reductoras del fluido ruminal y a que la desaturación es termodinámicamente desfavorable, este proceso es poco probable.

## 2.2 Introducción

El proceso de BH del ALi y del ALn de los recursos alimenticios en el rumen, genera cambios importantes en el flujo de estos al duodeno, decreciendo su proporción en leche y carne e incrementando la aparición de numerosos isómeros geométricos y posicionales, entre los que están el ALC y el ATV (Harfoot y Hazlewood, 1997; Bauman *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2007).

El ALC es un isómero geométrico y posicional del ALi, constituyendo alrededor de un 75-90% de los isómeros conjugados, donde le sigue en proporción el isómero C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12 (Collomb *et al.*, 2006). Cuando decrece el pH ruminal por la suplementación con dietas altas en concentrado, se producen cambios en las poblaciones microbianas y varía el patrón de fermentación (Van Soest, 1994), incrementando la concentración de C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12 (Grinari *et al.*, 1998). A valores de pH ruminal normal (6,2 – 7,0), se favorece la producción de ALC (Bauman *et al.*, 1999). En el rumen, el ALC se produce a partir del ALi pero no del ALn (Bauman *et al.*, 1999). El 91% del ALC en leche de rumiantes, proviene de la desaturación del ATV por la esteroil CoA desaturasa (ECD) (EC 1.14.19.1) en glándula mamaria (Kay *et al.*, 2004).

El ALC y C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12 presentan diferentes actividades biológicas (Martin y Valeille, 2002), siendo atribuidas a uno u otro isómero. Se ha encontrado que el C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12 tiene un efecto positivo en la reducción de la grasa corporal (Martin y Valeille, 2002; Terpstra, 2004) y en la reducción de la diabetes tipo II (Khanal, 2004), donde el ALC no tiene efecto (Martin y Valeille, 2002). Tricon *et al.*, (2004) sugiere que el ALC presenta una mayor actividad anticancerígena en comparación al C<sub>18:2</sub> *trans*-10, *cis*-12 y Herrera *et al.*, (2004) encontró que el ALC, reduce el riesgo de preeclampsia, en mujeres primigrávidas. Este trabajo, se centrará en la ruta de producción de ALC.

Se han buscado estrategias para incrementar los niveles de ATV en fluido ruminal, usando aceites ricos en ALi y ALn (Harvatine y Bauman, 2006). Estudios *in vitro* demuestran que la inclusión de aceites vegetales ricos en ALi, incrementan la concentración de ATV en fluido ruminal cuando se comparan con aceites ricos en ALn. La BH del ALi es más eficiente que la del ALn y en altas concentraciones, el ALi se convierte en un inhibidor de la BH del ATV hasta el C<sub>18:0</sub> (Harfoot *et al.*, 1973, Troegeler-Meynadier *et al.*, 2003, Agazzi *et al.*, 2004). Jouany *et al.*, (2007), encontraron que la concentración de ATV a partir de ALn en fluido ruminal, es cuatro veces superior a la generada por el ALi. Trabajos adicionales demostraron que la velocidad de BH del ALi es

dos veces la del ALn (Ribeiro *et al.*, 2007, Enjalbert *et al.*, 2003). Los resultados de las investigaciones realizadas hasta el momento, no son totalmente concluyentes hacia cuál de los dos compuestos tiene el mayor efecto sobre la concentración de ATV en fluido ruminal. Esto se podría deber a que en la mayoría de estudios *in vitro*, *in situ* e *in vivo* se usan aceites vegetales como fuente de ALi que contienen otros ácidos grasos y en donde no se conserva una cantidad constante entre los ácidos, lo que explica parcialmente la variabilidad en las concentraciones de ATV (Harfoot *et al.*, 1973, Troegeler-Meynadier *et al.*, 2003, Agazzi *et al.*, 2004, Jouany *et al.*, 2007). En la mayoría de experimentos en donde se determinan las velocidades de BH del ALi y ALn, se usan sustratos que tienen mayoritariamente estos ácidos grasos en forma esterificada, y se podría presentar un “enmascaramiento” de las velocidades netas de BH debido a posibles diferencias en las tasas de lipólisis (Jenkins *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la incubación en fluido ruminal de una cantidad constante de ácidos grasos poliinsaturados (ALi, ALn) con relaciones variables entre ellos, sobre sus velocidades de conversión y saturación, BH y proporción de sus principales intermediarios y productos, con énfasis en ALC, ATV y C<sub>18:0</sub>. Adicionalmente se realizó la descripción termodinámica de los principales pasos de la BH en el rumen y se evaluó el efecto de las diferentes mezclas de ALi y ALn, sobre la DIVMS de kikuyo (*P. clandestinum*).

## 2.3 Materiales y métodos

Muestras de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) de 60 días de rebrote, fueron cosechadas mediante la metodología de Hand Plucking (Cook, 1964) en la finca El Recuerdo del municipio de Sopó (Cund). Las muestras de forraje se secaron a 60 °C por 48 h en un horno de ventilación forzada, se molieron en un molino de cuchillas (Romer) con una criba de 1 mm y posteriormente se tamizaron seleccionando partículas con un tamaño menor de 650 µm.

El fluido ruminal se obtuvo de un novillo normando fistulado después de un ayuno de 12 horas. El fluido se filtró a través de cuatro capas de gasa y se colocó en un termo precalentado a 39 °C. Se transfirió a embudos de separación y se gaseó con CO<sub>2</sub>, recuperándose la fase intermedia. El fluido ruminal se mezcló con buffer McDougall en proporción 1:4 (McDougall, 1948), se gaseó con CO<sub>2</sub> y se mezcló con úrea (1g/L buffer), constituyendo el inóculo. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética, de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

En tubos plásticos de 100 mL, se agregaron 500 mg de kikuyo seco y tamizado y 18 µL de mezclas ALi:ALn (T<sub>1</sub>(100:0), T<sub>2</sub>(75:25), T<sub>3</sub>(50:50), T<sub>4</sub>(25:75) y T<sub>5</sub>(0:100)), a los cuales se les adicionó 50 mL de inóculo precalentado a 39 °C y se gaseó con CO<sub>2</sub>, y se sellaron con tapones de caucho provistos de un orificio y se colocaron en un baño de maría a 39 °C (Blue Sland Illinois, USA) a 39 °C (Tilley y Terry, 1963). Los tubos fueron agitados manualmente cada 2 horas. Como tratamiento control (T<sub>0</sub>(CTRL)), se incubó el forraje sin adición de la mezcla ALi:ALn. Los tiempos de incubación para los tratamientos evaluados

fueron de 0, 2, 4, 6, 8 o 16 horas (Bauchart et al., 1984; Troegeler-Meynadier *et al.*, 2003; Jouany et al., 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Sterk *et al.*, 2010). Cada serie de incubación estaba conformada por 36 tubos (6 tratamientos). Las corridas fueron realizadas por triplicado para cada tratamiento y tiempo de incubación (Enjalbert *et al.*, 2003, AbuGhazaleh y Jenkins, 2004; AbuGhazaleh y Jacobson, 2007, Cortés *et al.*, 2009). Luego de los tiempos señalados, las incubaciones se detuvieron agregando 500 µL de HgCl<sub>2</sub> al 2% (Cortés et al., 2009) y colocando los tubos en un baño de hielo (Ribeiro *et al.*, 2007). El contenido de los tubos fue congelado a -60 °C y liofilizado (Crist Alpha 1-4 LO plus), siendo almacenado hasta su análisis. Paralelamente, se determinó la DIVMS para el kikuyo en los tratamientos, mediante la técnica de Tilley y Terry, (1963).

### 2.3.1 Forraje

En material seco y tamizado, se determinó proteína cruda (PC) (984.13), cenizas (Cen) (942.05), extracto etéreo (EE) (930.09) (AOAC, 2006), fibra en detergente neutro (FDN) y fibra en detergente ácido (FDA) (Van Soes *et al.*, 1991). La composición de ácidos grasos del forraje se determinó usando la técnica de Garcés y Mancha, (1990), con una modificación de Yamasaki *et al.*, (1999) (Tabla 2-1).

**Tabla 2-1:** Análisis proximal y perfil de ácidos grasos del forraje.

<b>Parámetro</b>	<b>% de MS</b>
PC	18,2
Cen	11,7
EE	3,0
FDN	60,9
FDA	32,2
<b>Ácido graso</b>	<b>Proporción (g/100 g AG)</b>
C <sub>12:0</sub>	0,9
C <sub>14:0</sub>	1,4
C <sub>16:0</sub>	33,4
C <sub>18:0</sub>	5,1
C <sub>18:1 cis-9</sub>	2,5
C <sub>18:2 cis-9, cis-12</sub>	11,6
C <sub>20:0</sub>	1,6
C <sub>18:3 cis-9, cis-12, cis-15</sub>	43,0
C <sub>20:4 cis-5, cis-8, cis-11, cis-14</sub>	0,6

### 2.3.2 Mezclas de ácidos grasos

Para el experimento se usó ALi y ALn (90% de pureza, Nu-Check Prep Inc), los cuales se mezclaron en cinco proporciones diferentes con una concentración total constante, cuya

composición se verificó a partir de su metilación con Meth-Prep® y posterior análisis por CG-FID (Tabla 2-2).

**Tabla 2-2:** Proporciones de ácidos grasos de las mezclas usadas en los tratamientos.

Tratamiento	ALi	ALn
	g/ 100 g de AG	
T <sub>1</sub> (100:0)	100,00	ND
T <sub>2</sub> (75:25)	75,68	24,32
T <sub>3</sub> (50:50)	49,34	50,66
T <sub>4</sub> (25:75)	23,96	76,04
T <sub>5</sub> (0:100)	0,31	99,69
T <sub>0</sub> (CTRL)	-	-

ND = No detectado

### 2.3.3 Composición de ácidos grasos

El análisis de la composición de ácidos grasos para el forraje y fluido ruminal liofilizado, se realizó mediante la técnica de Garcés y Mancha, (1990) con una modificación de Yamasaki *et al.*, (1999): Se pesaron 50 mg de forraje seco o fluido ruminal liofilizado, los cuales se transfirieron a tubos tapa rosca de 16 x 160 mm, agregándose 2148 µL de metanol, 990 µL de tolueno, 66 µL de ácido sulfúrico al 99,9 % y 1000 µL de dimetilsulfóxido (Merk®).

A continuación se agregaron 2 mL de hexano (Merk®) y se sellaron, introduciéndose en un baño termostático a 80 °C durante 2 horas. Posteriormente, se recuperó el hexano, el cual se evaporó en corriente de nitrógeno. El residuo obtenido se redisolvió en 250 µL de diclorometano (Merk®) y se analizó por CG-FID.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos del forraje, las mezclas de ácidos grasos y el fluido ruminal liofilizado, fueron analizados usando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2014, equipado con un automuestreador AOC-20i y con un detector de ionización en llama. En la separación de los ésteres metílicos, se usó una columna Restek 2560 (100 m x 0,25 mm d.i, 0,2 µm). Para la identificación de los ácidos grasos, se usó una mezcla de ésteres metílicos (Nu-Check Prep, Elysian, MN, No. GLC-603). El volumen de inyección fue de 1,0 µL, con una relación Split 30:1. Como gas de arrastre se empleó He 5.0 a una velocidad de 1,12 mL/min. La temperatura del inyector y del detector fueron de 260 y 270 °C respectivamente y la del horno, fue programada a un valor inicial de 140 °C por 5 minutos, la cual se incrementó a 4 °C/min durante 5 minutos más, hasta una temperatura de 220 °C, aumentándose posteriormente a 2,0 °C/min durante 10 minutos, hasta una temperatura final de 240 °C.

### 2.3.4 Análisis de la termodinámica de los procesos de biohidrogenación, mediante química computacional.

Para establecer las energías libres de formación ( $\Delta G_f$ ) de los diferentes ácidos grasos producidos durante la BH de ALi y ALn, con el fin de calcular los  $\Delta G_{rxn}$  para los pasos principales de dicho proceso (Westermann, 1994), se usó el paquete de química cuántica computacional MOPAC Version 8.289L (MOPAC, 2007), empleando el método PM6 (Stewart, 2007).

## 2.4 Análisis estadístico

Para cada tiempo de incubación, las proporciones de ácidos grasos de 18 carbonos fueron comparadas entre los tratamientos para los diferentes tiempos, usando el PROC GLM de SAS, versión 9.0 (SAS Institute, Cary, NC), mediante una prueba de Tukey.

### 2.4.1 Estimación de tasas de isomerización y biohidrogenación

Los cambios de proporción en función del tiempo para los precursores, intermediarios y productos principales de la BH, fueron modelados mediante un análisis multicompartimentalizado, con el fin de estimar las tasas de conversión en otros ácidos grasos. El criterio para establecer la transferencia entre compartimentos, se basó en los siguientes pasos: 1) Si existían datos publicados que mostraran una conexión directa entre los compartimentos, 2) Si la adición de un compartimento o su transferencia producía un valor más pequeño de AIC (Cobelli y Foster, 1998) y si la conexión entre compartimentos, generaba un proceso termodinámicamente favorable.

El software que se usó para el análisis fue SAAM II (SAAM, 1997), empleando el método de integración Rosenbrock. Ese modelamiento se realizó para  $T_1(100:0)$  a  $T_5(0:100)$ , puesto que en  $T_0(CTRL)$  las proporciones de ALi eran muy bajas y por lo tanto no fue posible medir exactamente la proporción de ALC, debido a su baja proporción. Las tasas de conversión fueron comparadas usando el PROC GLM de SAS, versión 9.0 (SAS Institute, Cary, NC) con una prueba de Tukey.

### 2.4.2 Estimación de tasas de acumulación para el ATV

Se establecieron las velocidades de acumulación para el ATV, ajustándose el modelo de Gompertz (Casas *et al.*, 2010) mediante el PROC NLIN de SAS, versión 9.0 (SAS Institute, Cary, NC), donde los parámetros iniciales fueron determinados usando el software Curve Expert 1.4® (ver ecuación (2.1)):

$$P = a * e^{-e^{b-(c*t)}} \quad (2.1)$$

Donde  $P$  es la proporción de ATV al tiempo  $t$ , siendo  $a$  la proporción a las 16 horas,  $b$  la diferencia entre la proporción a las 0 y 16 horas y  $c$  su tasa de acumulación. Las tasas de acumulación del ATV, fueron comparadas entre tratamientos mediante una prueba de Tukey.

Todas las comparaciones en este experimento, se realizaron al 0,05 de significancia.

## 2.5 Resultados

### 2.5.1 Cinética de biohidrogenación del ALi y ALn, de sus intermediarios y del producto principal

A continuación se describirá el proceso de BH del ALi y ALn. Inicialmente se presentará la cinética de desaparición del ALi y ALn. Posteriormente la cinética de sus intermediarios principales y por último la de acumulación del  $C_{18:0}$ .

Las concentraciones iniciales de ALi y ALn estuvieron asociadas a los tratamientos donde las proporciones de ALi y ALn reflejaron los tratamientos en todos los tiempos de incubación. En este sentido, el  $T_1(100:0)$  presentó en todos los tiempos, las mayores proporciones de ALi y el  $T_5(0:100)$  las mayores de ALn. Para ambos ácidos grasos, se presentó una disminución en su proporción al aumentar los tiempos de incubación. Sin embargo, la desaparición de ALn aparentemente fue más rápida ya que las proporciones finales de este ácido fueron menores que las de ALi ( $p < 0,05$ ) (Fig 2-1 (A) y (B)). Las proporciones de ALC disminuyeron en las primeras horas de incubación para la mayoría de tratamientos y aumentaron posteriormente en aquellos tratamientos con adiciones de ALi. Las mayores proporciones de ALC se presentaron al final de la incubación (16 h) y fueron mayores en los tratamientos con mayores adiciones de ALi. Las menores proporciones se presentaron en el tratamiento con adición de 100% de ALn (Figura 2-2(A)). Las mayores proporciones de ALC, se registraron para  $T_0(CTRL)$  a las 0 y 2 horas ( $P < 0,05$ ), y para  $T_1(100:0)$  a las 6, 8 y 16 horas. A las 4 horas,  $T_1(100:0)$  y  $T_2(75:25)$  presentaron las mayores proporciones de ALC. Por otro lado, se registró la menor proporción en todos los tiempos para  $T_5(0:100)$  (Figura 2-2 (A)).

La proporción de  $C_{18:2}$  *trans*-11, *cis*-15 presentó un incremento rápido en las primeras horas de incubación para todos los tratamientos y posteriormente decreció lentamente (Figura 2-2(B)). La máxima proporción se presentó a las 6 h para los tratamientos con más ALn ( $T_4(25:75)$  y  $T_5(0:100)$ ) y a las 4 h para los demás tratamientos. Las mayores proporciones de este ácido se presentaron para los tratamientos con mayores inclusiones de ALn. Para la proporción de ATV, se presentó un incremento rápido para todos los tratamientos hasta las 8 h, tiempo en donde se registró la mayor proporción para  $T_1(100:0)$  y  $T_2(75:25)$ , y la menor para  $T_0(CTRL)$ ,  $T_4(25:75)$  y  $T_5(0:100)$  ( $P < 0,001$ ). Después de este tiempo, se presentó un aumento muy lento hasta las 16 horas, donde

se registró la mayor proporción para T<sub>1</sub>(100:0) a T<sub>4</sub>(25:75) y la menor para T<sub>0</sub>(CTRL) y T<sub>5</sub>(0:100) (P<0,0001) (Figura 2-3 (A)).

Se encontró una correlación positiva (0,857, p<0,01) entre la cantidad de ALi adicionada y la tasa de acumulación de ATV, para aquellos tratamientos en los cuales se agregaron ácidos grasos (T<sub>1</sub>(100:0) a T<sub>5</sub>(0:100)), donde T<sub>1</sub>(100:0) presentó la mayor tasa y T<sub>4</sub>(25:75) y T<sub>5</sub>(0:100) las menores (Tabla 2-3). Adicionalmente, la tasa de acumulación del ATV para T<sub>0</sub>(CTRL) fue mayor a la de los demás tratamientos (P<0,05) a excepción de T<sub>1</sub>(100:0), con el cual no hubo diferencias significativas.

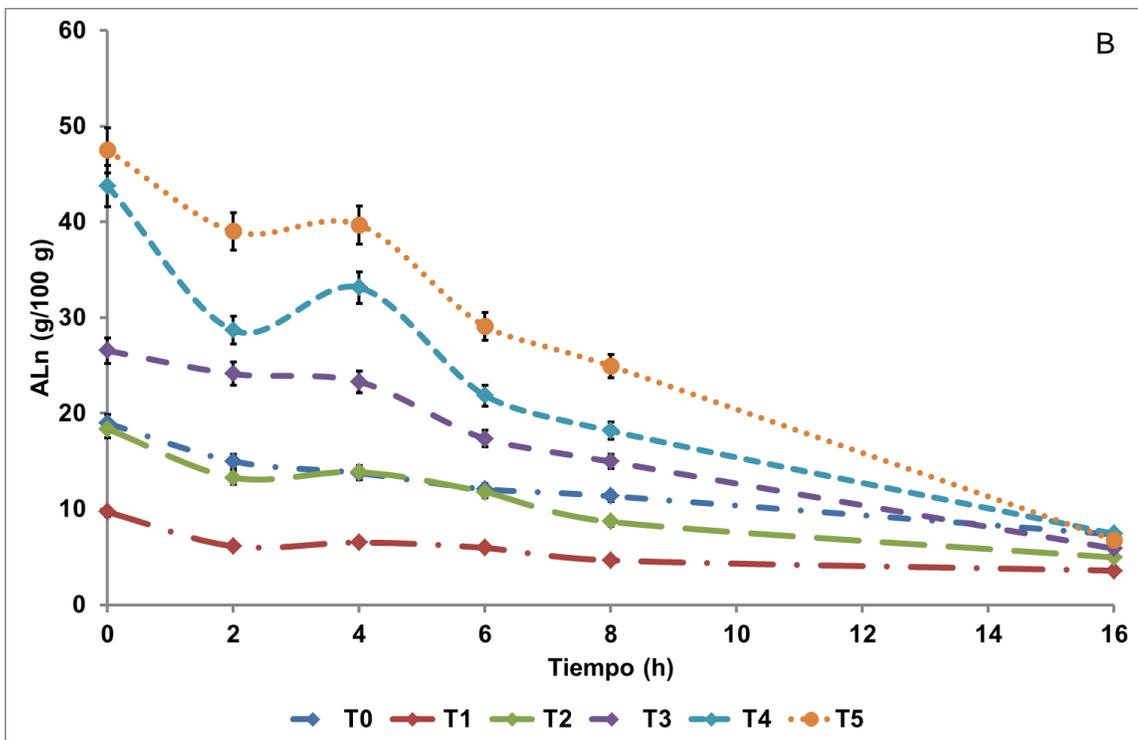
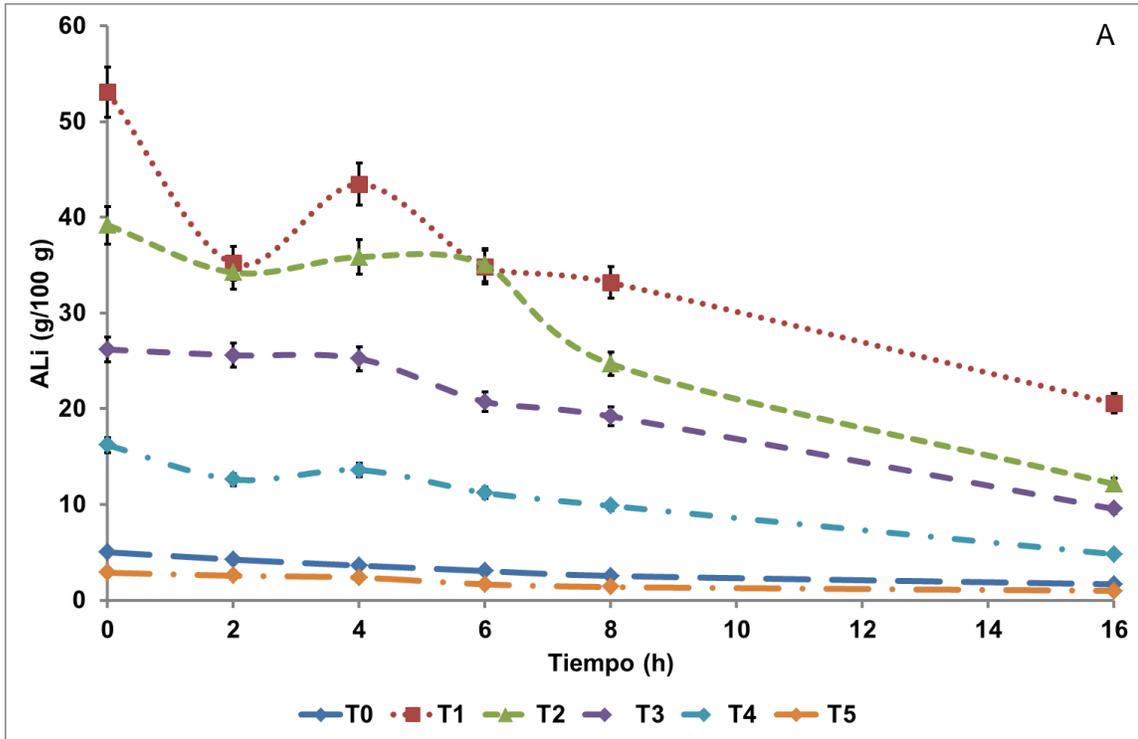
**Tabla 2-3:** Tasas de acumulación del ATV (%/h) para los tratamientos evaluados

Tratamiento <sup>1</sup>	v-ATV <sup>2</sup> (%/h)
T <sub>0</sub> (CTRL)	0.353 <sup>a</sup>
T <sub>1</sub> (100:0)	0.335 <sup>a</sup>
T <sub>2</sub> (75:25)	0.232 <sup>b,c</sup>
T <sub>3</sub> (50:50)	0.245 <sup>b</sup>
T <sub>4</sub> (25:75)	0.184 <sup>c</sup>
T <sub>5</sub> (0:100)	0.185 <sup>c</sup>
SE	0.017
p	<0,001

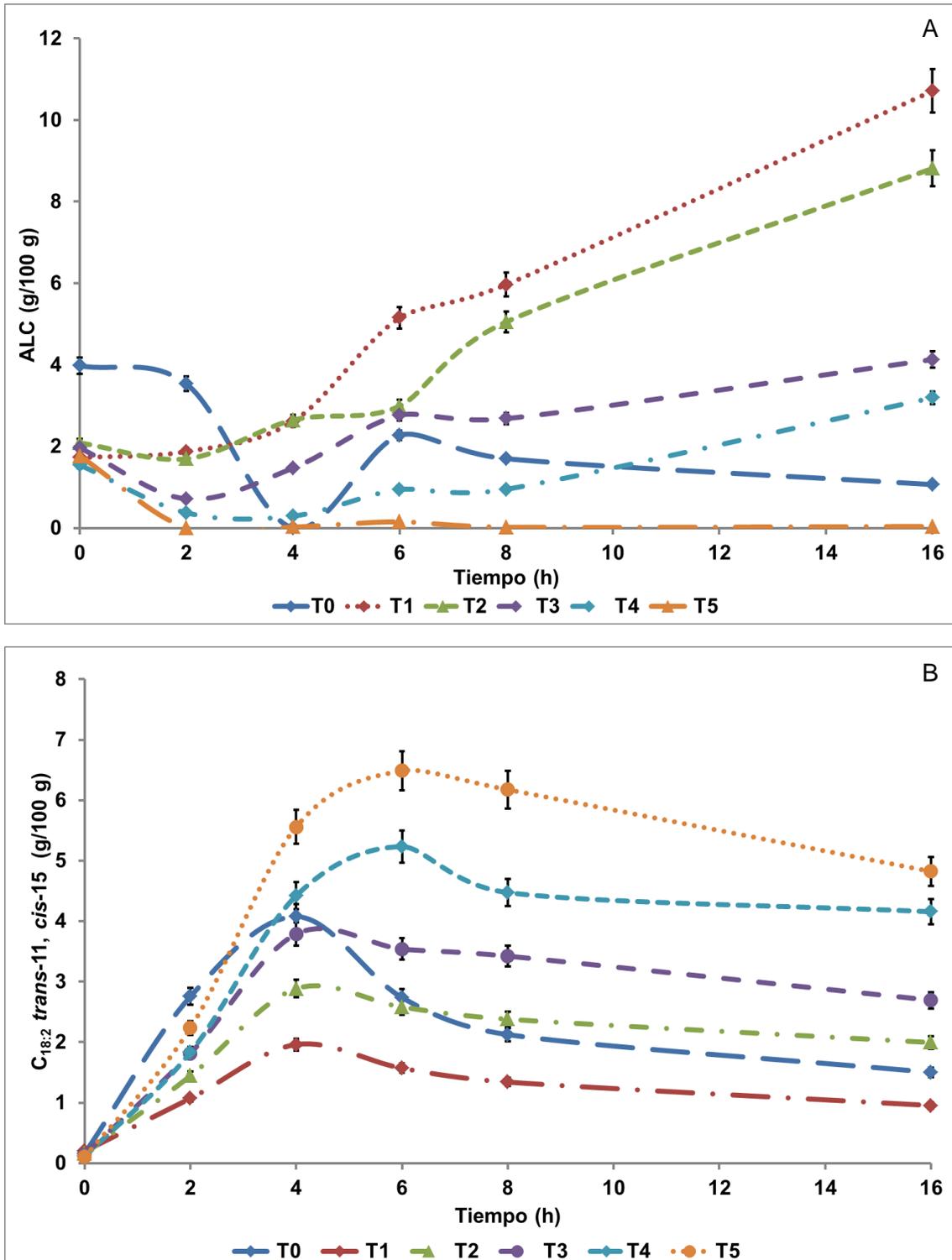
<sup>1</sup> Medias con diferente superíndice, difieren entre sí (P<0,05).  
<sup>2</sup> v-ATV se refiere a la tasa de acumulación del ATV

La proporción de C<sub>18:0</sub> incrementó progresivamente desde las 0 hasta las 2 h, presentándose un decrecimiento a la hora 4, en donde el decrecimiento fue mayor para los tratamientos T<sub>1</sub>(100:0) a T<sub>5</sub>(0:100) (p<0,0001). Después de dicho tiempo, su proporción continuó creciendo hasta la hora 16, en donde se registró la mayor proporción para T<sub>0</sub>(CTRL) y la menor para T<sub>1</sub>(100:0) (P<0,0001) (Figura 2-3 (B)).

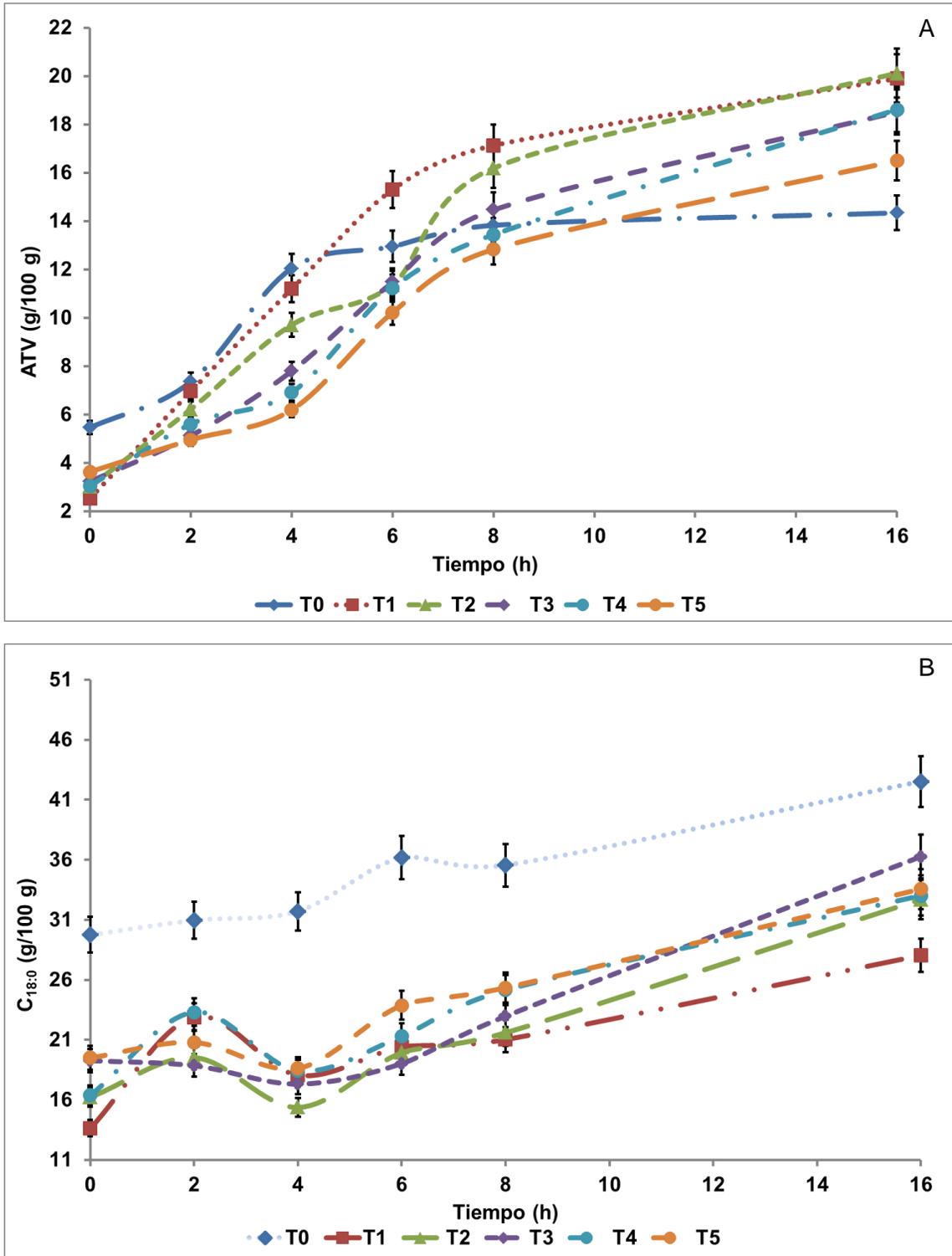
**Figura 2-1:** Cambios en la proporción de ALi y ALn para los tratamientos evaluados, durante 16 horas de incubación.



**Figura 2-2.** Cambios en la proporción de ALC y  $C_{18:2}$  *trans*-11, *cis*-15 para los tratamientos evaluados, durante 16 horas de incubación.



**Figura 2-3:** Cambios en la proporción de ATV y C<sub>18:0</sub> para los tratamientos evaluados, durante 16 horas de incubación.



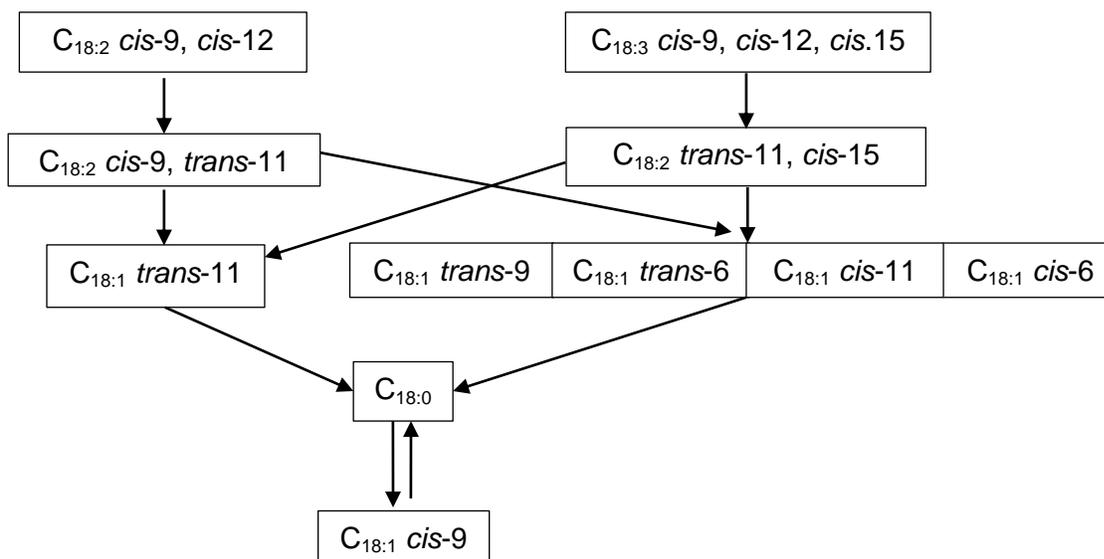
## 2.5.2 Tasas de isomerización y biohidrogenación para el ALi, ALn y sus principales intermediarios

Usando información publicada en la literatura que indicara la conexión entre ácidos grasos (Bauman *et al.*, 1999), la existencia de procesos termodinámicamente favorables (Ball, 2004) y la búsqueda de un valor menor de AIC para el modelo (Cobelli y Foster, 1998), se planteó una ruta para la BH del ALi y ALn (figura 2-4).

Los modelos de cinética de primer orden, han sido usados extensivamente para determinar tasas de BH de ácidos grasos de diferentes fuentes (Beam *et al.*, 2000; Troegeler-Meynadier *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2007). Para la mayoría de conjuntos evaluados (ALi, ALn, ALC, ATV,  $C_{18:0}$ ), se halló una tendencia lineal entre el logaritmo natural de la proporción vs el tiempo (primer orden), no siendo lineal para el inverso de la proporción vs el tiempo. Así, se propone que una cinética de pseudo-primer orden se podría aplicar. Sin embargo, se hace necesario el desarrollo de trabajos adicionales en los cuales se determine un mayor número de intermediarios y se evalúe si el modelo multicompartimentalizado podría ser realmente el ideal (Ribeiro *et al.*, 2007).

El paso de ALC a la sumatoria de los isómeros  $C_{18:1}$  *trans*-9,  $C_{18:1}$  *trans*-6,  $C_{18:1}$  *cis*-6 y  $C_{18:1}$  *cis*-11 ( $C_{18:1}$  *t*) se incluyó, porque disminuyó el valor de AIC para el modelo, lo cual permitió mejorar la estimación de los parámetros. Pese a lo anterior, dicho proceso, junto con la conversión de  $C_{18:2}$  *trans*-11, *cis*-15 a  $C_{18:1}$  *t* son menos relevantes, por las bajas concentraciones de  $C_{18:1}$  *t* registradas.

**Figura 2-4:** Modelo de la biohidrogenación ruminal *in vitro* del ácido linoléico y del ácido  $\alpha$ -linolénico desde las 0 hasta las 16 horas de incubación en:  $T_1(100:0)$ ,  $T_2(75:25)$ ,  $T_3(50:50)$ ,  $T_4(25:75)$  Y  $T_5(0:100)$ . Los cuadros representan los diferentes conjuntos de ácidos grasos formados.



Las tasas de conversión estimadas para los diferentes intermediarios del proceso de BH del ALi y ALn hasta C<sub>18:0</sub>, sugieren que la combinación de ácidos grasos (ALi y ALn) afecta las tasas de BH del ALi pero no del ALn (Tabla 2-4). Mientras la sustitución parcial de ALi por ALn incrementó las tasas de paso de ALi a ALC y de ALC a ATV, la sustitución parcial de ALn por ALi no modificó las tasas de conversión de los primeros pasos en la BH del ALn, como son las transformaciones de ALn a C<sub>18:2</sub> *trans*-11, *cis*-15 y de este a ATV.

Para las demás tasas estimadas, no se registraron diferencias estadísticas entre tratamientos (P>0,05).

**Tabla 2-4:** Tasas de conversión para los tratamientos evaluados

Reacción	T <sub>1</sub> (100:0)	T <sub>2</sub> (75:25)	T <sub>3</sub> (50:50)	T <sub>4</sub> (25:75)	T <sub>5</sub> (0:100)	SE	P
<u>Ácido linoléico</u>							
ALi → ALC	0,059 <sup>a,b</sup>	0,057 <sup>a,b</sup>	0,054 <sup>b</sup>	0,069 <sup>a,b</sup>	0,075 <sup>a</sup>	0,003	0,036
ALC → ATV	0,775 <sup>b,c</sup>	0,581 <sup>c</sup>	0,590 <sup>c</sup>	1,805 <sup>b</sup>	4,170 <sup>a</sup>	0,378	<0,001
<u>Ácido alfa-linolénico</u>							
ALn → C <sub>18:2</sub> t11,c15	0,076	0,076	0,076	0,102	0,096	0,005	0,449
C <sub>18:2</sub> t11,c15 → ATV	0,235	0,312	0,242	0,134	0,167	0,025	0,120
<u>Rutas comunes</u>							
ATV → C <sub>18:0</sub>	0,078	0,072	0,053	0,057	0,075	0,007	0,717
C <sub>18:0</sub> → c9	0,002	<0,001	0,003	0,318	0,080	0,048	0,058
c9 → C <sub>18:0</sub>	0,043	0,032	0,047	1,898	2,035	0,357	0,188
ALC → suma C <sub>18:1</sub> t	0,041	0,045	0,038	0,206	1,898	0,302	0,249
C <sub>18:2</sub> t11,c15 → suma C <sub>18:1</sub> t	0,103	0,020	0,240	0,039	0,040	0,037	0,285
Suma C <sub>18:1</sub> t → C <sub>18:0</sub>	0,054	0,027	0,045	0,210	0,158	0,051	0,805

Los valores representan las velocidades (%/h) de transferencia entre conjuntos, durante la desaparición del ALi y ALn. C<sub>18:2</sub> *cis*-9, *cis*-12 (ALi); C<sub>18:2</sub> *cis*-9, *trans*-11 (ALC); C<sub>18:1</sub> *trans*-11 (ATV); C<sub>18:3</sub> *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 (ALn); C<sub>18:2</sub> *trans*-11, *cis*-15 (t11,c15); C<sub>18:1</sub> *trans*-9 + C<sub>18:1</sub> *trans*-6 + C<sub>18:1</sub> *cis*-6 + C<sub>18:1</sub> *cis*-11 (suma C<sub>18:1</sub> t); C<sub>18:1</sub> *cis*-9 (c9). Valores con diferente superíndice indican diferencias estadísticas (p<0,05).

### 2.5.3 Digestibilidad *in vitro* de la materia seca

La DIVMS del kikuyo fue afectada por el tipo de tratamiento (P<0,01), donde T<sub>2</sub>(75:25) y T<sub>3</sub>(50:50) fueron menores a T<sub>5</sub>(0:100) (Tabla 2-5).

**Tabla 2-5:** Digestibilidad *in vitro* de la materia seca del kikuyo para los diferentes tratamientos evaluados.

Tratamiento <sup>1</sup>	DIVMS (%)
T <sub>0</sub> (CTRL)	68,6 <sup>a,b</sup>
T <sub>1</sub> (100:0)	66,9 <sup>a,b</sup>
T <sub>2</sub> (75:25)	65,4 <sup>b</sup>
T <sub>3</sub> (50:50)	65,9 <sup>b</sup>
T <sub>4</sub> (25:75)	67,4 <sup>a,b</sup>
T <sub>5</sub> (0:100)	70,0 <sup>a</sup>
SE	0,458
P	0,009

<sup>1</sup> Medias con diferente superíndice, difieren entre sí (P<0,05).

## 2.6 Discusión de resultados

Este trabajo buscaba determinar el efecto de combinar ALi y ALn sobre los procesos de BH ruminal de cada uno de estos ácidos, basado en la hipótesis de que la combinación podría tener efectos sinérgicos sobre este proceso. En este trabajo se usó ácidos grasos puros considerando que en la mayoría de estudios se han usado aceites vegetales ricos en dichos compuestos. Sin embargo, los aceites contienen otros ácidos grasos, los cuales podrían influir en el proceso de BH del ALi y ALn (Hassim *et al.*, 2010) haciendo además difícil o imposible determinar el verdadero origen de intermediarios específicos de su BH (Jenkins *et al.*, 2008).

Adicionalmente, se quería evitar la posible influencia que podría tener la lipólisis como primer paso requerido en el proceso de BH de los triglicéridos presentes en los aceites. Noble *et al.* (1974) han demostrado que las velocidades de desaparición de estos ácidos dependen de si se encuentran en forma libre o esterificada. La desaparición es más rápida cuando se encuentran de forma libre.

Se trabajó con diferentes proporciones de ALi:ALn manteniéndose una concentración de ácidos grasos total constante. Lo más comúnmente reportado es la adición de un ácido graso o aceite sobre el otro (Beam *et al.*, 2000; Troegeler-Meynadier *et al.*, 2003; Jouany *et al.*, 2007; Sterk *et al.*, 2010) variando las concentraciones totales de ácidos grasos, lo cual podría implicar cambios en los procesos de fermentación debido a un aumento en la cantidad total de ácidos grasos poliinsaturados (Bauman *et al.*, 1999).

Adicionalmente se buscó simular las condiciones ruminales al incluir: forraje particulado en los sistemas (kikuyo), como lo ha sugerido Choi *et al.* (2009), adicionar las mezclas de ácidos grasos sin emulsificación como sugirió Khiaosa-ard *et al.*, (2010), mantener las condiciones de anaerobiosis (disminuyendo la presencia de oxígeno) (Jouany *et al.*, 2007), realizar agitación periódica y disminuir los tiempos de incubación (Buccioni *et al.*, 2006). De esta manera, se puede disminuir significativamente la posible pérdida de actividad de los microorganismos (por el oxígeno) y el efecto inhibitorio de altas dosis de lípidos (por la ausencia de un sustrato forrajero) (Wasowska *et al.*, 2006; Jouany *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2009).

### 2.6.1 Tasas de isomerización y biohidrogenación para el ALi, ALn y sus principales intermediarios

Se encontró que los primeros pasos de la BH ruminal del ALi como son la isomerización de ALi a ALC y la reducción de ALC a ATV se incrementaron con las mayores proporciones de ALn en las mezclas (Tabla 2-4). Por otra parte, los primeros pasos de la BH ruminal del ALn no tuvieron este comportamiento. Se ha sugerido que el primer paso de la BH del ALi y el ALn, comparten la enzima linoleato isomerasa (Harfoot *et al.*, 1973; Jouany *et al.*, 2007), y que por lo tanto podrían competir por el sitio activo de la enzima (Beam *et al.*, 2000; Troegeler-Meynadier *et al.*, 2003; Jouany *et al.*, 2007). En este

estudio, las relaciones entre ALn y ALi se modificaron pero la sumatoria de las concentraciones de estos dos ácidos se mantuvo constante. Esto sugeriría que las tasas de Isomerización, no deberían modificarse por la sustitución de un ácido por el otro, a menos que la afinidad de la enzima por estos sustratos fuera diferente. Kepler y Tove, (1967) establecieron que la actividad máxima de la linoleato isomerasa de *B. fibrisolvans* se alcanza a concentraciones diferentes de ALi ( $5 \times 10^{-5}$  M) que la de ALn ( $10^{-4}$  M). Esto implicaría que esta enzima podría tener diferente afinidad por el ALi que el ALn. Una mayor actividad de isomerización para el ALi a medida que su concentración disminuye y aumenta la de ALn, implicaría una mayor afinidad de esta enzima para el ALi que para el ALn. Desafortunadamente, en este trabajo no se determinó el primer paso de la isomerización del ALn. Sin embargo, las tasas de isomerización de ALi implicarían una sinergia positiva de ALn en la isomerización de ALi.

Una mayor tasa de isomerización de ALi cuando se encuentra en combinación con ALn, implicaría que la desaparición de ALi del fluido ruminal es mayor cuando se encuentra en combinación que sólo, e implicaría una menor transferencia al duodeno de este ácido, que cuando se encuentra en combinación con ALn, lo cual ocurre en la mayoría de los casos de dietas reales.

Por último, podría implicar una mayor tasa de síntesis de ALC cuando este ácido se encuentra en combinación con ALn. Sin embargo, los datos de acumulación de ALC aparentemente son contradictorios a esta apreciación ya que la máxima acumulación de ALC (Grafica 2-2 (A)) se presentó en el tratamiento donde solamente se proporcionaba ALi. Dos elementos explican esta aparente contradicción. El primero es que el ALn no es precursor de ALC en el rumen (Bauman *et al.*, 1999) y por lo tanto se puede esperar que a medida que su concentración disminuye en la mezcla su presencia en el fluido ruminal disminuya. El segundo es que se encontraron tasas de biohidrogenación de ALC a ATV mayores en la medida que se adiciono ALn, probablemente debido a una menor concentración de ALC en el fluido a medida que aumentaba la proporción de ALn en la mezcla y en consecuencia, la reducción de ALC a ATV sería más rápida, debido a la disminución en la saturación del sitio activo de la ALC reductasa.

Aunque las tasas de desaparición de ALi y ALn no fueron comparadas estadísticamente, los valores de la tasa de desaparición del ALn fueron mayores que las de ALi, lo que resulto en menores proporciones de ALn que de ALi a las 16 h. Esto implicaría que en recursos ricos en ALi, las probabilidades de que una porción mayor de este ácido llegue al duodeno que en aquellos ricos en ALn, son mayores. Lo anterior se encuentra de acuerdo con Beam *et al.*, (2000), los cuales encontraron mediante un ensayo *in vivo*, que la adición de un 2 al 10% de ALn, con base en el aporte de forraje, disminuyó la BH de ALi proveniente de aceite de soya. Un resultado similar fue hallado por Pantoja *et al.*, (1996), los cuales encontraron que las tasas de desaparición del ALi y ALn, fueron de 83 y 94% respectivamente, cuando vacas lecheras eran suplementadas con aceite de vegetal que los contenía simultáneamente.

Para las demás tasas de los principales pasos de la BH, no se encontraron diferencias entre tratamientos a pesar de promedios entre tratamientos con valores muy diferentes

en algunos pasos. Ribeiro *et al* (2007) han señalado que el uso de la herramienta de calculo SAAM II para la estimación de tasas, presenta algunas limitaciones cuando no se dispone de todos los intermediarios del proceso, como fue este caso en particular para la biohidrogenación del ALn. Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, la metodología empleada permite obtener una mayor cantidad de información, acerca del proceso de BH del ALi y ALn en el rumen, frente a otros métodos de estimación de su desaparición (Ribeiro *et al.*, 2007; Jenkins *et al.*, 2008).

## 2.6.2 Acumulación de los principales intermediarios

El C<sub>18:2</sub> *trans*-11, *cis*-15 presento las mayores concentraciones para aquellos tratamientos con mayores niveles de ALn, comportamiento esperado puesto que dicho compuesto es un intermediario importante de la BH del ALn (Harfoot y Hazlewood, 1997). De otra parte, tanto la concentración del ALC como la del ATV aumentaron a medida que la concentración de ALi en la mezcla fue mayor. Comportamientos similares han sido reportados para el ALC (Noble *et al.*, 1974; Martin y Jenkins, 2002; Enjalbert *et al.*, 2003; Troegeler-Meynadier *et al.*, 2003) y para el ATV (Noble *et al.*, 1974; Troegeler-Meynadier *et al.*, 2003). En el caso del ALC este aumento era previsible, ya que el ALC es un intermediario metabólico de la BH del ALi y no del ALn (Jenkins *et al.*, 2008).

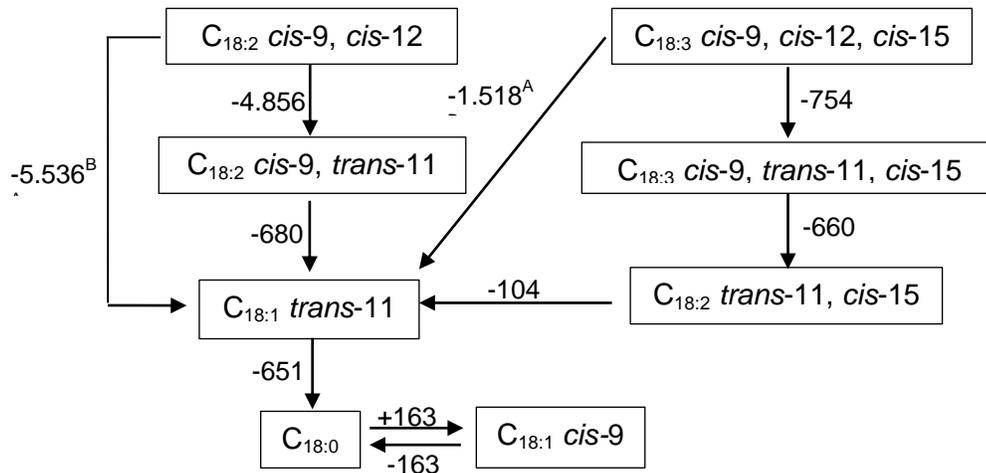
Las razones por las cuales se produce más ATV a partir de ALi que de ALn no son claras ya que ambos ácidos comparten el ATV como intermediario. Sin embargo, en nuestra propuesta, las rutas metabólicas de biohidrogenación de estos ácidos, encuentran rutas diferentes a las del ATV, para llegar a C<sub>18:0</sub> a partir de ALn (figura 2-4). La existencia de rutas diferentes también ha sido señalada por otros autores (Harfoot y Hazlewood, 1997; Ribeiro *et al.*, 2007; Jouany *et al.*, 2007). Una menor acumulación de ATV, a medida que se aumenta el nivel de ALn en la mezcla y al mismo tiempo una mayor proporción de C<sub>18:0</sub> (figuras 2-1(B), 2-3(A) y (B)), indicarían que las otras rutas metabólicas representan una porción importante de la biohidrogenación del ALn y que evitan parcialmente la acumulación del ATV, que ha sido señalado como inhibidor de la enzima *trans*-11 octadecenoato reductasa, esencial en la reducción del ATV a C<sub>18:0</sub> (Moate *et al.*, 2004). Las tasas de producción de ATV a partir de los derivados de ALn (C<sub>18:2</sub> *trans*-11, *cis*-15) fueron inferiores, a aquellas a partir del ALC derivado de la isomerización del ALn (tabla 2-4), lo cual también podría explicar parcialmente una menor acumulación del ATV. Sin embargo, no aclararían por que las proporciones finales de C<sub>18:0</sub> fueron mayores para los tratamientos ricos en ALn, las cuales si estarían sustentadas por mayores tasas de BH de los diferentes isómeros C<sub>18:1</sub> *t*, diferentes a ATV, que se presentaron en los tratamientos ricos en ALn. Desafortunadamente estas tasas no fueron estadísticamente diferentes a pesar de diferencias numéricas mayores. Por último, se podría sugerir que el ALi podría actuar como inhibidor en la reducción del ATV a C<sub>18:0</sub>, la *trans*-11 octadecenoato reductasa. Sin embargo, no existe evidencia en la literatura de interacción entre ALi o ALn y la *trans*-11 octadecenoato reductasa.

Otro aspecto revisado en este trabajo, que no ha sido considerado con anterioridad en otros trabajos y que puede tener relevancia para explicar los procesos de biohidrogenación ruminal, es la termodinámica de este proceso (Figura 2-5). La magnitud de la diferencia de la energía libre de formación entre un sustrato y su producto ( $\Delta G_{rxn}$ ) ha sido asociada a la espontaneidad de ocurrencia de una reacción. Entre más

negativa es esta diferencia, mayor la espontaneidad (Ball, 2004). El  $\Delta G_{rxn}$  de la conversión del ALi en ATV es aproximadamente 4 veces más negativo al de la conversión del ALn en ATV, lo cual indicaría que el primer proceso es aproximadamente 4 veces más favorable termodinámicamente que el segundo. De esta manera, a partir de los resultados anteriores se puede establecer que de los dos procesos mencionados, el primero es tanto cinética como termodinámicamente más favorable que el segundo, cuando el ALi y ALn se encuentran en forma libre.

De esta manera, dada la existencia de un efecto positivo de la sustitución parcial del ALn por el ALi sobre la tasa de acumulación de ATV y presencia de una correlación positiva entre la concentración de ATV en fluido ruminal y la de ALC en leche como lo ha mostrado Griinari *et al.*, (2000), se puede proponer que el uso de mezclas ricas en ALi, podría constituirse como una estrategia nutricional positiva para incrementar los niveles de ALC en grasa láctea.

**Figura 2-5:** Descripción termodinámica para los pasos principales de la biohidrogenación de ácido linoléico y ácido alfa-linolénico. Los valores sobre las flechas representan para cada proceso el cambio de energía libre de Gibbs ( $\Delta G_{rxn}$ ) en cal/mol a 37°C. Los superíndices representan el  $\Delta G_{rxn}$  global de la conversión entre: A)  $C_{18:2}$  *cis*-9, *cis*-12 y  $C_{18:1}$  *trans*-11; B)  $C_{18:3}$  *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 y  $C_{18:1}$  *trans*-11.



### 2.6.3 Indicios de procesos de desaturación de los ácidos grasos en el rumen

En este trabajo se observó, que los cambios de proporción de ALi y ALn en el fluido ruminal con el tiempo, no siempre disminuyeron. Se observaron aumentos en las proporciones de ALi y ALn en algunos de los tratamientos entre las horas 2 a 4, o 4 a 6 (Figura 2-1(A) y 2-1(B)). Estos cambios fueron acompañados por una disminución en las proporciones de  $C_{18:0}$  entre las horas 2 y 4 (Figura 2-3(B)). En principio se había

considerado que estas observaciones podían estar relacionadas a errores experimentales o de análisis cromatográfico. Sin embargo, este fenómeno se ha observado en varios trabajos para tiempos cortos de incubación, en los cuales no se ha propuesto ninguna explicación para su ocurrencia (Ward *et al.*, 1964; Enjalbert *et al.*, 2003; Jouany *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2009; Sterk *et al.*, 2010). Por lo cual, decidimos explorar con detalle las posibles explicaciones a este fenómeno.

Con el fin de establecer una explicación a este fenómeno, se relacionaron los cambios en las proporciones de la sumatoria de las proporciones de ALi y ALn con los cambios de las proporciones de C<sub>18:0</sub> (Figura 2-6). Se encontró una asociación negativa ( $r=-0,844$ ,  $p<0,01$ ) y lineal entre estos cambios. Esto muestra que independientemente de la magnitud o dirección de los cambios en la proporción de ALi y ALn, se presentaron cambios en magnitud y dirección del C<sub>18:0</sub>, lo cual confirma que el C<sub>18:0</sub> es el producto final de la BH en el fluido ruminal del ALi y ALn, como ha sido reportado por otros autores (Harfoot y Hazlewood, 1997; Enjalbert *et al.*, 2003) y adicionalmente sugiere que bajo ciertas condiciones este proceso podría ser reversible. También implicaría que se presentan reacciones de desaturación en el fluido ruminal, explicándose la disminución en la proporción de C<sub>18:0</sub> entre la hora 2 y 4 para todos los tratamientos evaluados (Figura 2-3(B)), como ha sido reportado en otros trabajos con tiempos de incubación similares (Jouany *et al.*, 2007; Sterk *et al.*, 2010).

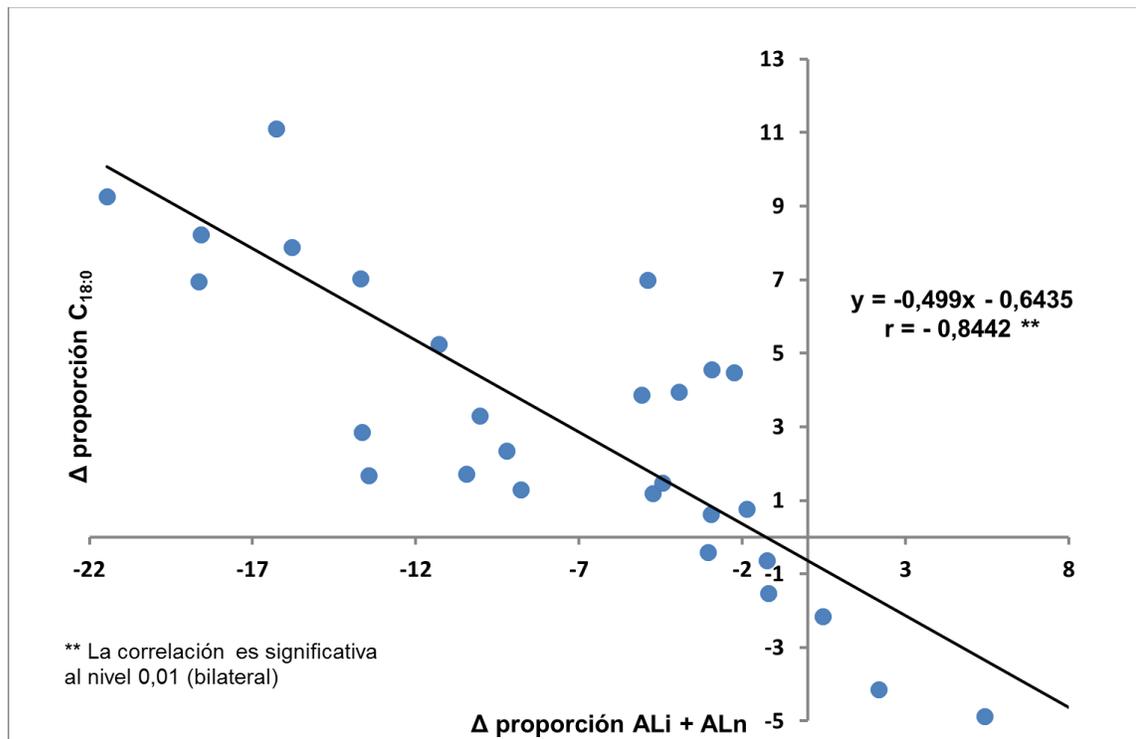
Las reacciones de desaturación en el fluido ruminal, se han reportado en otros trabajos (Mortimer y Niehaus, 1972; Kemp *et al.*, 1984b; Jenkins *et al.*, 2008; Yañez-Ruiz *et al.*, 2006), indicando que a pesar del alto y negativo potencial reductor del fluido ruminal, se pueden presentar procesos de oxidación. Kemp *et al.*, (1984b), demostraron que una Esteroil CoA desaturasa secretada por el hongo ruminal *Piromyces communis*, tiene el potencial de convertir el C<sub>18:0</sub> en AOI, sugiriendo la presencia de reacciones de desaturación en el fluido ruminal. En este trabajo, las tasas de conversión estimadas usando SAAM II sugieren que el paso de C<sub>18:0</sub> a AOI es posible, aunque con una tasa de desaturación pequeña (tabla 2-4). Como se muestra en la Figura 2-5, dicho proceso sería termodinámicamente desfavorable ( $\Delta G_{rxn}=+163$  cal/mol), sin embargo, dados los reportes de la literatura y la disminución significativa del AIC, que generó su inclusión en nuestro modelo, podría proponerse su posible acoplamiento, a un proceso termodinámicamente favorable no reportado aún, lo cual podría fundamentar su ocurrencia. Así, que se podría proponer que este decrecimiento en la proporción de C<sub>18:0</sub> a la hora 4, se debe en parte a su desaturación a AOI. En este trabajo, se encontró una asociación parcial ( $r=0,511$ ,  $p<0,01$ ) entre los cambios en las proporciones de AOI y C<sub>18:0</sub>, lo cual se encuentra de acuerdo con la afirmación anterior.

Por otro lado, la conversión de AOI en C<sub>18:0</sub>, se encuentra en vía contraria a lo reportado por otros autores (Harfoot y Hazlewood, 1997; Enjalbert *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2007), los cuales afirman que el AOI se transforma en ATV, incorporándose mediante esta conversión al proceso de BH. Nosotros consideramos que la isomerización de AOI a ATV, es menos favorable que la reducción de AOI hasta C<sub>18:0</sub>, ya que el primer proceso tiene un  $\Delta G_{rxn} = +488$  cal/mol, el cual es superior al del segundo (-163 cal/mol). De esta manera, teniendo en cuenta que el  $\Delta G$  es una función de estado (no depende de los pasos intermedios, sino el final e inicial), que esta es una variable termodinámica que permite definir la espontaneidad de un proceso y la disminución en el valor de AIC cuando

se incluyó este paso en el modelo, podría proponerse la viabilidad de la incorporación del AOI, al proceso de BH mediante esta ruta.

Yañez-Ruiz *et al.*, (2006), reportaron que el C<sub>18:0</sub> podría ser desaturado por una  $\Delta^{11}$ -desaturasa a ATV, enzima que sería producida por los protozoarios. Emmanuel (1974) demostró la capacidad de sintetizar ácidos grasos de 18 carbonos con un doble enlace, en la posición 11 en protozoarios ruminales, a pesar de ser un proceso desfavorable ( $\Delta G_{rxn(37^\circ C)} = +612$  cal/mol). Los protozoarios tienen tiempos cortos de supervivencia en los sistemas *in vitro* por su elevada sensibilidad a las concentraciones de oxígeno (Harfoot y Hazlewood, 1997) lo cual podría explicar que estos cambios se producen solamente en las primeras horas de incubación. Por lo tanto, el paso de C<sub>18:0</sub> a ATV o a AOI es posible en el rumen por actividad de los protozoarios. Sin embargo, no hay evidencia del paso de ATV a ALC y de este a ALi, o, de ATV a C<sub>18:2 trans-11, cis-15</sub> y de este a ALn en el fluido ruminal.

**Figura 2-6:** Relación de las sumatorias de cambios de proporción de ALi y ALn vs cambios de C<sub>18:0</sub> para los tratamientos.



Kemp *et al.* (1984a) reportan isomerizaciones *cis/trans* en ambas direcciones por las bacterias del rumen, siendo el paso de *cis* a *trans* más favorable. Los hallazgos de Kemp *et al.* (1984a) podrían justificar el paso de ALC a ALi y de C<sub>18:3 cis-9, trans-11, cis-15</sub> a ALn (primer paso de BH ruminal del ALn), aunque sean energéticamente desfavorables (figura 2-5). Por último, el paso de ATV a ALC también podría explicarse por la presencia de Esteroil CoA desaturasas secretada por microorganismos ruminales como para el hongo ruminal *Piromyces communis* (Kemp *et al.* (1984b). Por lo tanto, se podría proponer que la BH en el rumen, es un proceso reversible y no unidireccional, contrario a

lo que se ha reportado en varios trabajos (Harfoot y Hazlewood, 1997; Bauman *et al.*, 1999). Sin embargo, bajo las condiciones altamente reductoras del fluido ruminal y debido a que estas reacciones de desaturación son termodinámicamente poco favorables, es poco probable que ocurran.

#### **2.6.4 Efecto de la relación ALi:ALn sobre la digestibilidad *in vitro* de la materia seca de kikuyo**

El efecto negativo de la adición de lípidos en los procesos de fermentación ha sido ampliamente documentado en la literatura (Jhonson y McClure, 1973; Devendra y Lewis, 1974, Tamminga y Doreau, 1991; Jenkins, 1993). La disminución en la degradación de los diferentes nutrientes, aparentemente está asociada a la concentración de los lípidos y la composición de ácidos grasos de los mismos (Beam, 2000, Martin y Jenkins, 2002, Maia *et al.*, 2007 y 2010). En nuestro trabajo, la adición de ALi y ALn en mezclas pero no en forma pura disminuyó la DIVMS, sugiriendo que la mezcla es más tóxica que los ácidos grasos adicionados de forma pura (tabla 2-5). El efecto fue más severo, cuando el ALi hacia un mayor o igual porcentaje de la mezcla. Choi *et al.*, (2009), hallaron que las bacterias del grupo B, responden más lentamente que las del A, a variaciones en las concentraciones de ALi, como también que el ALi y ALC, presentan un mayor grado de toxicidad que el ATV y C<sub>18:0</sub>, para las bacterias ruminales en general. Los resultados de Choi *et al* (2009) sugerirían que los efectos más negativos sobre la degradación de los nutrientes en el rumen, se dan cuando hay mayores acumulaciones de ALi y ALC en el fluido ruminal. En este trabajo, ninguno de los intermediarios de la biohidrogenación medidos, explico las diferencias en la DIVMS, lo cual implicaría que otros intermediarios no medidos podrían ser los responsables de la toxicidad de los microorganismos o que existen sinergismos entre algunos de ellos, que maximizan la toxicidad en las mezclas. De esta manera, teniendo en cuenta los resultados anteriormente presentados, en los cuales se denota la existencia de un efecto de la proporción ALi:ALn sobre las tasas de desaparición y BH de algunos de los pasos principales de dicho proceso (tabla 2-4), entonces se podría plantear que dicha variación en la DIVMS, se debe a cambios en la proporción de intermediarios y producto, en función de una posible interacción de dichos precursores durante su proceso de BH. Estas posibles interacciones sobre la toxicidad de los ácidos grasos sobre los microorganismos, requieren de estudios adicionales.

## **2.7 Conclusiones**

Se encontró que las tasas en los primeros pasos de la biohidrogenación ruminal del ALi pero no del ALn, fueron diferentes cuando este ácido graso estaba en forma pura o en mezcla. La isomerización de ALi a ALC y la reducción de ALC a ATV se incrementaron con las mayores proporciones de ALn en las mezclas.

Se halló que la sustitución parcial del ALn por el ALi, en mezclas donde la cantidad total de los ácidos grasos es constante, incrementó la tasa de acumulación de ATV en fluido ruminal.

El análisis conjunto de los parámetros cinéticos y termodinámicos de la BH ruminal del ALi y ALn, permiten sugerir que el proceso de BH de estos ácidos es reversible. Sin embargo, bajo las condiciones altamente reductoras del fluido ruminal y debido a que estas reacciones de desaturación son termodinámicamente poco favorables, es poco probable que el proceso de desaturación ocurra.

La adición de ALi y ALn (3,6%) en mezclas pero no en forma pura, disminuyó la DIVMS, sugiriendo que la mezcla es más toxica que los ácidos grasos adicionados de forma pura.

## 2.8 Bibliografía

ABUGHAZALEH AA y Jacobson BN. The effect of pH and polyunsaturated C18 fatty acid source on the production of vaccenic acid and conjugated linoleic acid in ruminal cultures incubated with docosahexaenoic acid. *Anim Feed Sci Technol* 2007; 136: 11-22.

ABUGHAZALEH AA y Jenkins TC. Disappearance of Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic acids from cultures of mixed ruminal microorganisms. *J Dairy Sci* 2004; 87: 645-651.

AGAZZI A, Bayourthe C, Nicot MC, Troegeler-Meynadier A, Moncoulon R y Enjanbert R. In situ ruminal biohydrogenation of fatty acids from extruded soybeans: effects of dietary adaptation and of mixing with lecithin or wheat Straw. *Anim Feed Sci Technol* 2004; 117: 165-175.

AOAC 2006. Official Methods of Analysis of Aoac International. Editor: Hortwitz W. (18 Ed). Association of Official Analytical Chemists.

BALL D. Physical Chemistry. Thompson Brooks/cole. 2011. 89.

BAUCHART D, Vérité R y Rémond B. Long chain fatty acid digestion in lactating cows fed fresh grass from spring to autumm. *Can J Anim Sci* 1984; 64 (Suppl): 330-331.

BAUMAN DE, Baumgard LH, Corl BA y Griinari JM. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *P Am Soc Aim Sci*; 1999: 1-15.

BEAM TM, Jenkins TC, Moate PJ, Kohn RA y Palmquist DL. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *J Dairy Sci* 2000; 83:2564–2573.

BUCCIONI A, Antongiovanni M, Petacchi F, Mele M, Serra A, Secchiari P y Benvenuti D. Effect of dietary fat quality on C18:1 fatty acids and conjugated linoleic acid production: An *in vitro* rumen fermentation study. *Anim Feed Sci and Technol* 2006; 127: 268-282.

CASAS GA, Rodríguez D y Afanador G. Propiedades matemáticas del modelo de Gompertz y su aplicación al crecimiento de los cerdos. *Rev Col Sci Pec* 2010; 23 (3): 349-358.

CHOI N, Park HG, Kim JH, Hwang H, Kwon KH, Yoon JA, Kwon EG, Chang J, Hwang IH y Kim YJ. Characterisation of environmental factors in Conjugated Linoleic Acid Production by mixed rumen bacteria. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 9263-9267.

COBELLI C y Foster DM. 1998. Compartmental models: Theory and practice using SAAM II software system. Page 423 in *Mathematical Modeling in Experimental Nutrition*. A. J. Clifford and H. Muller, ed. Plenum Press, New York, NY.

COLLOMB M, Schmid A, Sieber R, Wechsler D y Ryhänen EL. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. Review. *Int Dairy J* 2006. 16: 1347-1361.

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

CORTÉS JE, Moreno B, Pabón ML, Avila P, Kreuzer M, Hess HD y Carulla JE. Effects of purified condensed tannins extracted from *Calliandra*, *Flemingia* and *Leucaena* on ruminal and postruminal degradation of soybean meal as estimated *in vitro*. *Anim Feed Sci and Tech* 2009; 151: 194–204.

DEVENDRA C y Lewis D. The interaction between dietary lipids and fibre in the sheep. *Animal Prod* 1974; 19: 67-79.

EMMANUEL B. On the origin of rumen protozoan fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1974; 337: 404-413.

ENJALBERT F, Eynard P, Nicot MC, Troegeler-Meynadier A, Bayourthe C y Mocoulon R. *In vitro* versus *in situ* ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids from raw or extruded mixture of ground canola seed/canola meal. *J Dairy Sci* 2003; 86:351-359.

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

GRIINARI JM, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KVV y Bauman DE. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta^9$  desaturase. *J Nutr* 2000; 130: 2285-2291.

GRIINARI JM, Dwyer DA, McGuire MA, Bauman DE, Palmquist DL y Nurmela KVV. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1998; 81: 1251-1261.

HARFOOT CG y Hazlewood GP. Lipid metabolism in the rumen. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson and C. S. Stewart, ed. Chapman and Hall, London, UK. 1997. p.382-426.

HARFOOT CG, Noble RC y Moore JH. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen micro-organisms in vitro. *J Sci Food Agric* 1973; 24:961-970.

HARVATINE K y Bauman DE. SREBP1 and Thyroid Hormone Responsive Spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced fat depression and treatment with CLA. *J Nutr* 2006; 136: 2468-2474.

HASSIM HA, Lourenço M, Goel G, Vlaeminck B, Goh YM y Fievez V. Effect of different inclusion levels of oil palm fronds on in vitro rumen fermentation pattern, fatty acid metabolism and apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid. *Anim Feed Sci and Technol* 2010; 162: 155-158.

HERRERA JA, Shahabudin AKM, Faisal M, Ersheng G, Wei J, Lixia D, Gandaho T y Lopez P. Efectos de la suplementación oral con Calcio y ácido linoléico conjugado en primigrávidas de alto riesgo. *Colombia médica* 2004; Vol. 35. No. 1.

JENKINS TC. Lipid metabolism in the rumen. *J Dairy Sci* 1993; 76: 3851-3863.

JENKINS TC, Wallace RJ, Moate PJ y Mosley EE. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J Anim Sci* 2008; 86: 397-412.

JOHNSON R y McClure K. High Fat Rations for Ruminants II. Effects of Fat Added to Corn Plant Material Prior to Ensiling on Digestibility and Voluntary Intake of the Silage. *J Animal Sci* 1973; 36:397-406.

JOUANY JP, Lassalas B, Doreau M y Glasser F. Dynamic features of the rumen metabolism of linoleic acid, linolenic acid and linseed oil measured in vitro. *Lipids* 2007; 42: 351-360.

KAY JK, Mackle TR, Auldish MJ, Thomson NA y Bauman DE. Endogenous Synthesis of cis-9, trans-11 Conjugated linoleic Acid in Dairy Cows Fed Fresh Pasture. *J Dairy Sci* 2004; 87:369–378.

KEMP P, Lander DJ y Gunstone FD. The hydrogenation of some cis- and trans-octadecenoic acids to stearic acid by a rumen *Fusocillus* sp. *Br J Nutr* 1984a; 52:165–170.

KEMP P, Lander DJ y Orpin CG. The lipids of the rumen fungus *Pirimonas communis* *J Gen Microbiol* 1984b; 130:27–37.

KEPLER CR y Tove SB. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate 12-cis,11-trans isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* 1967; 242:5686–5692.

KHANAL RC. Potential health benefits of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 17(9):1315–1328.

KHIAOSA-ARD R, Soliva CR, Leiber F. Methods of Emulsifying Linoleic Acid in Biohydrogenation Studies In Vitro May Bias the Resulting Fatty Acid Profiles. *Lipids* 2010; 45:651–657.

MAIA MR, Chaudhary LC, Figueres L y Wallace J. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Anton Leeuw* 2007; 91: 303-314.

MAIA MRG, Chaudhary LC, Bestwick CS, Richardson AJ, McKain N, Larson TR, Graham IA y Wallace RJ. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Microbiol* 2010; 10(52): 1-10.

MARTIN JC y Valeille K. Conjugated linoleic acids: all the same or to everyone its own function?. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42: 525-536.

MARTIN SA y Jenkins TC. Factors affecting conjugated linoleic acid and trans -C 18:1 fatty acid production by mixed ruminal bacteria. *J Anim Sci* 2002; 80: 3347-3352.

McDOUGALL EI. Studies on Ruminant Saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem J* 1948; 43: 99-109.

MOATE PJ, Boston RC, Jenkins TC y Lean IJ. Kinetics of Ruminal Lipolysis of Triacylglycerol and Biohydrogenation of Long-Chain Fatty Acids: New Insights from Old Data. *J Dairy Sci* 2008; 91: 731–742.

MOPAC 2009, Stewart J, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net) (2008).

MORTIMER CE y Niehaus WG. Enzymatic isomerisation of oleic acid to trans-10-octadecenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 49:1650–1656.

NOBLE RC, Moore JH y Harfoot CG. Observations on the pattern of biohydrogenation of esterified and unesterified linoleic acid in the rumen. *Br. J. Nutr* 1974; 31: 99–108.

PANTOJA J, Firkins JL, Eastridge ML y Hull BL. Fatty acid digestion in lactating dairy cows fed fats varying in degree of saturation and different fiber sources. *J Dairy Sci* 1996; 79:575–584.

RIBEIRO CVM, Eastridge L, Firkins JL, St-Pierre NR y Palmquist DL. Kinetics of fatty acid biohydrogenation *in vitro*. *J Dairy Sci* 2007. 90:1405–1416.

SAAM. 1997. SAAM II User Guide. SAAM Inst., Seattle, WA.

SAS Institute 2004. SAS/STAT. User's guide. Version 8 ed. SAS Institute Inc, Carry, NC.

STERK A, Hovenier R, Vlaeminck B, van Vuuren A M, Hendriks W H y Dijkstra J. Effects of chemically or technologically treated linseed products and docosahexaenoic acid addition to linseed oil on biohydrogenation of C18:3n-3 *in vitro*. *J Dairy Sci* 2010; 93: 5286–5299.

STEWART JJP. Optimisation of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J Mol Model* 2007; 13:1173–1213.  
Tamminga S, Doreau M. Lipids and rumen digestion. *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. Editions: INRA 1991. 151-164.

TERPSTRA AH. Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans: An overview of the literature. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 352-361.

TILLEY JMA y Terry RA. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J Br Crassl Soc 1963; 18:104.

TRICON S, Burdge GC, Kew S, Banerjee T, Russell JJ, Jones EL, Grimble RF, Williams CM, Yaqoob P y Calder PC. Opposing effects of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. Am J Clin Nutr 2004; 80: 614-620.

TROEGELER-MEYNADIER A, Nicot MC, Bayouthie C, Moncoulon R y Enjalbert F. Effects of pH and concentrations of lino- leic and linolenic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation *in vitro*. J Dairy Sci 2003; 86: 4054–4063.

VAN SOEST PJ, Robertson JB y Lewis BA. Methods for dietary fiber, detergent fiber and nonstarch polisaccharides in relation to animal nutrition. J Dairy Sci 1991; 74: 3583-3597.

VAN SOEST PJ. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant (2 Ed.). Cornell Univ. Press, Ithaca, NY. 165-170.

WARD PFV, Scott TW y Dawson RMC. The hydrogenation of unsaturated fatty acids in the ovine digestive tract. Biochem J 1964; 92(1): 60–68.

WASOWSKA I, Maia MR, Niedźwiedzka KM, Czauderna M, Robeiro JM, Devillard E, Shingfield KJ y Wallace RJ. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. Br J of Nutr 2006; 95: 1199-1211.

WESTERMANN P. The effect of incubation temperature on steady-state concentrations of hydrogen and volatile fatty acids during anaerobic degradation in slurries from wetland sediments. FEMS Microbiol Ecol 1994; 13 (4): 295-302.

YAMASAKI M, Kishihara K, Ikeda I, Sugano M y Yamada K. A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugated linoleic acid. JAOCS 1999; 76: 933-938.

YAÑEZ-RUIZ DR, Scollan ND, Merry RJ y Newbold CJ. Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their water-soluble carbohydrate content. Br J Nutr 2006; 96: 861–869.

## 3. Capítulo 3. Efecto de la adición de diferentes proporciones de EPA y DHA sobre la biohidrogenación *in vitro* del ácido linoléico y alfa-linolénico

### 3.1 Resumen

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la combinación de diferentes relaciones ácido docosahexaenóico ( $C_{22:6}$  *cis*-4, *cis*-7, *cis*-10, *cis*-13, *cis*-16, *cis*-19, DHA) y eicosapentaenóico ( $C_{20:5}$  *cis*-5, *cis*-8, *cis*-11, *cis*-14, *cis*-17, EPA) (DHA:EPA = 100:0, 75:25, 25:75 y 0:100) y una relación de ácido linoléico ( $C_{18:2}$  *cis*-9, *cis*-12, ALi) y alfa-linolénico ( $C_{18:3}$  *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15, ALn) de 75:25, sobre la proporción de los principales intermediarios y productos de la biohidrogenación (BH) del ALi y ALn, con énfasis en ácido linoléico conjugado ( $C_{18:2}$  *cis*-9, *trans*-11, ALC), ácido *trans*-vaccénico ( $C_{18:1}$  *trans*-11, ATV) y ácido esteárico ( $C_{18:0}$ ), en fluido ruminal. Se agregó a 500 mg de kikuyo, 18  $\mu$ L de diferentes mezclas de ALi, ALn EPA y DHA, en donde se mantuvo una relación constante de ALi:ALn (75:25) pero se varió la proporción DHA:EPA: T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> y T<sub>5</sub>. Adicionalmente se evaluó sólo la relación ALi:ALn 75:25 (T<sub>1</sub>) y como tratamiento control (T<sub>0</sub>) sólo se incubó kikuyo. Los tubos fueron incubados por 0, 5 o 16 horas. El contenido de las incubaciones fue congelado hasta su análisis. Las diferencias entre las proporciones de ALi, ALn, EPA, DHA y algunos de sus intermediarios y productos, fueron comparadas entre cada tiempo de incubación, mediante un modelo completamente al azar, usando el PROC GLM de SAS. Se determinó la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) para el kikuyo, en los tratamientos evaluados. La proporción de ALi y ALn no fue diferente entre aquellos tratamientos que contenían EPA y DHA (T<sub>2</sub> a T<sub>5</sub>) y aquel que solo contenía ALi y ALn (T<sub>1</sub>), lo cual sugiere que el EPA y DHA no son inhibidores del primer paso de la biohidrogenación del ALi y ALn. La adición de EPA y DHA disminuyó la proporción de  $C_{18:0}$  e incremento la de ATV y  $C_{18:2}$  *trans*-11, *cis*-15, lo cual sugiere que la acción inhibitoria del EPA y DHA se da en los pasos metabólicos intermedios y finales, pero no iniciales de la BH del ALi y ALn. Para los tratamientos que contenían EPA y DHA, se presentó la acumulación del  $C_{18:1}$  *trans*-9,  $C_{18:1}$  *cis*-6 y el  $C_{18:1}$  *cis*-9, lo cual no ocurrió para el  $C_{18:1}$  *trans*-6 y el  $C_{18:1}$  *cis*-11, sugiriendo que los dos grupos de ácidos grasos podrían presentar mecanismos o son desaparecidos por reductasas diferentes. A mayor proporción de EPA en la mezcla incubada, aumentó su

desaparición, lo cual no sucedió para el DHA, el cual se mantuvo estable o aumentó ligeramente. Esto sugiere que el EPA puede ser metabolizado por los microorganismos ruminales, dependiendo su desaparición de su concentración en el medio y que el DHA no fue metabolizado en las condiciones de este ensayo. La adición de ácidos grasos disminuyó la DIVMS con excepción de T<sub>5</sub>, el cual no fue estadísticamente diferente a T<sub>0</sub>.

## 3.2 Introducción

Los microorganismos ruminales hidrogenan e isomerizan los ácidos grasos poliinsaturados consumidos en la dieta, con el fin de disminuir su efecto bacteriostático (Harfoot y Hazlewood, 1997; Kemp y Lander, 1984; Maia *et al.*, 2007 y 2010). Dichas transformaciones permiten definir el perfil de ácidos grasos en la leche y la carne, determinando en parte la calidad composicional de estos productos (Laverroux *et al.*, 2011). En la biohidrogenación e isomerización, se generan intermediarios en donde se puede resaltar unos compuestos, formados por una serie de isómeros geométricos y posicionales del ALi. Algunos de estos, tienen efectos benéficos para la salud humana (Bauman *et al.*, 1999). El isómero mayoritario en leche y carne y uno de los que presenta la mayor actividad biológica, es el ALC (Lock y Bauman, 2004). Aunque este compuesto se constituye como un intermediario de la BH del ALi (Bauman *et al.*, 1999), su concentración en leche se debe mayoritariamente a la desaturación en la glándula mamaria del ATV, por acción de la Estaroil CoA desaturasa (Griinari y Bauman, 1999; Corl *et al.*, 2001; Kay *et al.*, 2004). Se ha reportado, que la concentración de ATV y su acumulación en el rumen, se encuentra correlacionada positivamente con la concentración de ALC en la leche (Griinari *et al.*, 2000).

Como lo muestran algunos trabajos en vacas (Whitlock *et al.*, 2002; Palmquist y Griinari, 2006; Shingfield *et al.*, 2003, Duckett y Gillis, 2010) y en ovejas (Reinolds *et al.*, 2006; Toral *et al.*, 2010a), la síntesis del ALC y ATV en el rumen, puede ser afectada por la suplementación con aceites vegetales y aceites de pescado. Se ha encontrado que los aceites de pescado pueden incrementar hasta en un 300% la concentración de ALC en la leche (Chilliard *et al.*, 2001).

El efecto de los aceites de pescado en la BH del ALi en el rumen, se debe principalmente a su acción inhibitoria en la reducción del ATV hasta C<sub>18:0</sub> (Fukuda *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Klein y Jenkins, 2011), con un menor impacto sobre los demás pasos de la BH (Klein y Jenkins, 2011), como ha sido demostrado en novillos (Kim *et al.*, 2008; Shingfield *et al.*, 2010), vacas (Lor *et al.*, 2005; Klein y Jenkins, 2011) y ovejas (Wasowska *et al.*, 2006; Toral *et al.*, 2010b). Algunos trabajos han sustentado que esto se debe principalmente a la presencia del DHA y el EPA, que a su vez son los ácidos grasos mayoritarios en el aceite de pescado (Ackman, 1982; Givens *et al.*, 2000; Fievez *et al.*, 2003; AbuGhazaleh y Jenkins, 2004).

Se ha reportado que la acción inhibitoria de los aceites de pescado, se debe principalmente a la presencia de DHA (Abughazaleh y Jenkins, 2004, Boeckert *et al.*, 2006 y 2007, Abughazaleh y Jacobson, 2007). Además, se ha encontrado que el DHA

promueve una mayor acumulación de ATV cuando las fuentes de aceite vegetal son ricas en ALi. Se acumula el intermediario C<sub>18:2</sub> *trans*-11, *cis*-15 cuando estas son ricas en ALn y se producen menores concentraciones de los intermediarios cuando se adiciona EPA (Abughazaleh y Jenkins, 2004, Abughazaleh y Jacobson, 2007). Gulati *et al.*, (2003), mostraron que la combinación de aceites vegetales y de pescado, ricos en ALi y EPA respectivamente, produjeron mayores concentraciones de ALC y ATV en la leche, en comparación con aceites de pescado ricos en DHA. Dicha discrepancia se puede deber a la forma de administración de los aceites (Osborne *et al.*, 2008), el perfil y la forma química de los ácidos grasos presentes en los aceites (Dohme *et al.*, 2003; Gulati *et al.*, 2003; Chow *et al.*, 2004; Broeckaert *et al.*, 2006 y 2007) y los intermediarios producidos durante su BH (Kairenius *et al.*, 2011). Es posible que haya una acción diferencial del EPA y DHA en el rumen, sobre la reductasa del ATV (Chow *et al.*, 2004) o una interacción entre estos (Woods y Fearon, 2009).

Aunque existe un número amplio de trabajos en los cuales se ha evaluado el efecto de los aceites de pescado, EPA o DHA en combinación con aceites vegetales, sobre la concentración de ALC y ATV en la leche y el fluido ruminal (Abughazaleh y Jenkins, 2004; Chow *et al.*, 2004; Palmquist y Griinari, 2006; Hou *et al.*, 2011), no se ha realizado estudios en donde se determine el efecto de las proporciones de EPA y DHA a una concentración total constante, adicionando una mezcla con una proporción mayor de ALi que de ALn. La proporción de intermediarios metabólicos de la BH del ALi y ALn, podría contribuir a explicar el efecto del EPA y DHA sobre la BH en el rumen.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la combinación de diferentes relaciones de EPA:DHA y una relación de ALi:ALn de 75:25, sobre la proporción de los principales intermediarios y productos de la BH del ALi y ALn, con énfasis en ALC, ATV y C<sub>18:0</sub>, en fluido ruminal. Además, se evaluó el efecto de las relaciones de ácidos grasos sobre la DIVMS para el kikuyo (*P. clandestinum*).

## 3.3 Materiales y métodos

### 3.3.1 Tratamientos e incubación

Muestras de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) de 60 días de rebrote, fueron cosechadas mediante la metodología de Hand Plucking (Cook, 1964) en la finca El Recuerdo del municipio de Sopó (Cund). Las muestras de forraje se secaron a 60 °C por 48 h en un horno de ventilación forzada, se molieron en un molino de cuchillas (Romer) con una criba de 1 mm y posteriormente se tamizaron seleccionando partículas con un tamaño menor de 650 µm.

El fluido ruminal se obtuvo de un novillo normando fistulado después de un ayuno de 12 horas. El fluido se filtró a través de cuatro capas de gasa y se colocó en un termo precalentado a 39 °C. Se transfirió a embudos de separación y se gaseó con CO<sub>2</sub>, recuperándose la fase intermedia. El fluido ruminal se mezcló con buffer McDougall en proporción 1:4 (McDougall, 1948), se gaseó con CO<sub>2</sub> y se mezcló con úrea (1g/L buffer), constituyendo el inóculo. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de

Bioética, de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

En tubos plásticos de 100 mL, se agregaron 500 mg de kikuyo seco tamizado y 18 µL de mezclas ALi:ALn (75:25) (T<sub>1</sub>) o en combinación con diferentes proporciones de DHA:EPA (T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> y T<sub>5</sub>), a los cuales se les adicionó 50 mL de inóculo precalentado a 39 °C, se gaseó con CO<sub>2</sub>, se sellaron con tapones de caucho provistos de un orificio y se colocaron en un baño de maría a 39° C (Blue Sland Illinois, USA) (Tilley y Terry, 1963). Los tubos fueron agitados manualmente cada 2 horas. Como tratamiento control (T<sub>0</sub>), se incubó el forraje sin adición de ácidos grasos. Los tiempos de incubación para los tratamientos evaluados fueron de 0, 5 o 16 horas (Bauchart *et al.*, 1984; Troegeler-Meynadier *et al.*, 2003; Jouany *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Sterk *et al.*, 2010). Cada serie de incubación estaba conformada por 18 tubos (6 tratamientos). Las corridas fueron realizadas por triplicado para cada tratamiento y tiempo de incubación (Enjalbert *et al.*, 2003, AbuGhazaleh y Jenkins, 2004; AbuGhazaleh y Jacobson, 2007, Cortés *et al.*, 2009). Luego de los tiempos señalados, las incubaciones se detuvieron agregando 500 µL de HgCl<sub>2</sub> al 2% (Cortés *et al.*, 2009) y se colocaron los tubos en un baño de hielo (Ribeiro *et al.*, 2007). El contenido de los tubos fue congelado a -60 °C y liofilizado (Crist Alpha 1-4 LO plus), siendo almacenado hasta su análisis. Paralelamente se determinó en todos los tratamientos, la DIVMS para el kikuyo, mediante la técnica de Tilley y Terry (1963).

### 3.3.2 Forraje

Se determinó proteína cruda (PC) (984.13), cenizas (Cen) (942.05), extracto etéreo (EE) (930.09) (AOAC, 2006), fibra en detergente neutro (FDN) y fibra en detergente ácido (FDA) (Van Soes *et al.*, 1991). La composición de ácidos grasos del forraje se determinó usando la técnica de Garcés y Mancha, (1990), con una modificación de Yamasaki *et al.*, (1999) (Tabla 3-1).

**Tabla 3-1:** Análisis proximal y perfil de ácidos grasos del forraje.

<b>Parámetro</b>	<b>% de MS</b>
PC	18,2
Cen	11,7
EE	3,0
FDN	60,9
FDA	32,2
<b>Ácido graso</b>	<b>Proporción (g/100 g AG)</b>
C <sub>12:0</sub>	0,9
C <sub>14:0</sub>	1,4
C <sub>16:0</sub>	33,4
C <sub>18:0</sub>	5,1
C <sub>18:1</sub> <i>cis</i> -9	2,5
C <sub>18:2</sub> <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	11,6
C <sub>20:0</sub>	1,6
C <sub>18:3</sub> <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	43,0
C <sub>20:4</sub> <i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14	0,6

### 3.3.3 Mezclas de ácidos grasos

Para el experimento se usó ALi, ALn, EPA y DHA (90% de pureza, Nu-Check Prep Inc), los cuales se mezclaron proporciones diferentes, cuya composición se verificó a partir de su metilación usando Meth-Prep® y análisis por CG-FID (Tabla 3-2).

**Tabla 3-2:** Mezclas de ácidos grasos usadas en los tratamientos.

Tratamiento	ALi:ALn (75:25)	DHA	EPA
% en la mezcla			
T <sub>0</sub>	-----	-----	-----
T <sub>1</sub>	100		
T <sub>2</sub>	82,5	17,5	
T <sub>3</sub>	82,5	13,1	4,4
T <sub>4</sub>	82,5	4,4	13,1
T <sub>5</sub>	82,5		17,5

### 3.3.4 Composición de ácidos grasos

El análisis de la composición de ácidos grasos para el forraje y fluido ruminal liofilizado, se realizó mediante la técnica de Garcés y Mancha, (1990) con una modificación de Yamasaki *et al.*, (1999): Se pesaron 50 mg de forraje seco o fluido ruminal liofilizado, los cuales se transfirieron a tubos tapa rosca de 16 x 160 mm, agregándose 2148 µL de metanol, 990 µL de tolueno, 66 µL de ácido sulfúrico al 99,9 % y 1000 µL de dimetilsulfóxido (Merk®).

A continuación se agregaron 2 mL de hexano (Merk®) y se sellaron, introduciéndose en un baño termostataado a 80 °C durante 2 horas. Posteriormente, se recuperó el hexano, el cual se evaporó en corriente de nitrógeno. El residuo obtenido se redisolvió en 250 µL de diclorometano (Merk®) y se analizó por CG-FID.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos del forraje, las mezclas de ácidos grasos y el fluido ruminal liofilizado, fueron analizados usando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2014, equipado con un automuestreador AOC-20i y con un detector de ionización en llama. En la separación de los esteres metílicos, se usó una columna Restek 2560 (100 m x 0,25 mm d.i, 0,2 µm). Para la identificación de los ácidos grasos, se usó una mezcla de ésteres metílicos (Nu-Check Prep, Elysian, MN, No. GLC-603). El volumen de inyección fue de 1,0 µL, con una relación Split 30:1. Como gas de arrastre se empleó He 5.0 a una velocidad de 1,12 mL/min. La temperatura del inyector y del detector fueron de 260 y 270 °C respectivamente y la del horno, fue programada a un valor inicial de 140 °C por 5 minutos, la cual se incrementó a 4 °C/min durante 5 minutos más, hasta una temperatura de 220 °C, aumentándose posteriormente a 2,0 °C/min durante 10 minutos, hasta una temperatura final de 240 °C.

### 3.4 Análisis estadístico

Para cada tiempo de incubación, las proporciones de ácidos grasos de 18 carbonos fueron comparadas entre los tratamientos evaluados mediante un modelo completamente al azar (Cochran y Cox, 1957), usando el PROC GLM de SAS, versión 9.0 (SAS Institute, Cary, NC). La comparación de medias se realizó mediante una prueba de Tukey al 0,05 de significancia.

### 3.5 Resultados y discusión

#### 3.5.1 Efecto de la adición de EPA y DHA sobre la cinética de biohidrogenación del ALi y ALn, como de sus intermediarios y productos

La adición de EPA Y DHA aumentó la proporción de ALi y ALn en el fluido ruminal, independientemente del tiempo de incubación o del tratamiento (tabla 3-3). Algunos autores han sugerido que el DHA y el EPA pueden inhibir los procesos de biohidrogenación (AbuGhazaleh y Jenkins, 2004). Si esta inhibición se da en los primeros pasos de la biohidrogenación, las proporciones de ALi y ALn en los tratamientos con DHA y EPA deberían ser mayores en aquellos tratamientos que contienen estos ácidos al aumentar los tiempos de incubación, lo cual no fue evidente en este ensayo. Por otro lado, las concentraciones de C<sub>18:0</sub> fueron menores para los tratamientos con DHA y EPA comparado con T<sub>0</sub> y T<sub>1</sub> (Tabla 3-3). Esto implica que efectivamente estos dos ácidos inhiben la biohidrogenación pero que esta se da en los pasos intermedios de la ruta metabólica y no en el inicio. De los principales intermediarios de ALi y ALn, se observó que el ATV se acumulaba con el tiempo, con la adición de EPA y DHA mientras que el efecto no era claro para el ALC. Por último, el C<sub>18:2</sub> *trans*-11, *cis*-15 (intermediario en la biohidrogenación del ALn), se acumulaba con la adición de EPA pero no de DHA. Los resultados anteriores sugerirían que la inhibición de la biohidrogenación del ALi y el ALn por el EPA y el DHA, ocurre principalmente en el paso de ATV a C<sub>18:0</sub>, aunque el EPA tendría también un efecto inhibitorio sobre la biohidrogenación del C<sub>18:2</sub> *trans*-11, *cis*-15. Estos resultados son similares a lo reportado por Chow et al., (2004) quienes sugirieron que tanto el DHA como el EPA restringen la acción la BH del ATV y del C<sub>18:2</sub> t11, c15, con un impacto minoritario sobre la BH del ALC. Esto permitiría sugerir que dicho el efecto inhibitorio es minoritario para las baterías del grupo A, siendo mayoritario sobre las del grupo B (responsables principalmente de la BH del ATV), lo cual se encuentra de acuerdo con varios trabajos (Chow et al., 2004; Dohme et al., 2003; Boeckeaert et al., 2006; Broeckeaert et al.; 2007).

Algunos trabajos han sugerido que la actividad inhibitoria del DHA y el EPA sobre la deshidrogenasa del ATV, puede ser diferencial (Chow et al., 2004, Gulati et al., 2003). Esto implicaría que la respuesta a la adición de EPA y DHA fuera de carácter sinérgica o aditiva. Este trabajo no evidencia esto, a pesar de que a la hora 5 se presentó una mayor acumulación para T<sub>3</sub>, que contenía combinaciones de DHA:EPA (75:25). Sin embargo, se

podría proponer que el sistema enzimático principalmente responsable de la desaparición del C<sub>18:2</sub> *trans*-11, *cis*-15 es diferente al del ATV.

Algunos intermediarios menores de la biohidrogenación como son el C<sub>18:1</sub> *trans*-9, C<sub>18:1</sub> *cis*-6 y el C<sub>18:1</sub> *cis*-9, también se acumularon en la medida que el tiempo de incubación aumento para los tratamientos con EPA y DHA (tabla 3-3). Esto sugiere que su biohidrogenación depende de la misma enzima que biohidrogena el ATV y que es inhibida por EPA y DHA. Lo anterior se encuentra de acuerdo con lo propuesto por AbuGhazaleh y Jenkins, (2004) y Duckett y Gillis, (2010), los cuales encontraron que la inclusión de EPA, DHA o aceite de pescado disminuyó la desaparición de C<sub>18:1</sub> *cis*-9 y de otros C<sub>18:1</sub> *trans*. Curiosamente en nuestro estudio, aunque el C<sub>18:1</sub> *trans*-6 y el C<sub>18:1</sub> *cis*-11 presentaron acumulación en el tiempo (tabla 3-3) esta no fue explicada por los tratamientos, sugiriendo un mecanismo o reductasa diferente para estos ácidos grasos en el último paso de la biohidrogenación.

En los forrajes existen pequeñas concentraciones de C<sub>18:3</sub> *cis*-6, *cis*-9, *cis*-12 (ácido gamma- linoléico). En este estudio, la adición de los ácidos grasos, no tuvo un efecto claro sobre su desaparición a medida que el tiempo de incubación aumentó. Para los tratamientos con EPA y DHA, se presento una disminución menor en sus proporciones, similar a la de T<sub>0</sub>. Este no fue el caso del T<sub>1</sub> donde a la hora 16, aparentemente se presentaron acumulaciones de este ácido, aspecto poco probable en las condiciones altamente reductoras del fluido ruminal.

Los resultados de este estudio muestran que la inclusión de EPA y DHA produce la inhibición del último paso de la BH del ALi y ALn, lo cual ya ha sido reportado por otros autores, con DHA, EPA y aceites de pescado (Chow *et al.*, 2004, Boeckert *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2008; Jalc *et al.*, 2009; Shingfield *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2011).

### 3.5.2 Efecto de la combinación del EPA y del DHA, sobre su cinética de desaparición

Se encontró que a medida que la proporción de EPA en la mezcla incubada aumentaba, su desaparición en el tiempo era mayor (Tabla 3-4). Se estimo una desaparición del 25% para T<sub>3</sub>, 45% para T<sub>4</sub> y 86% para T<sub>5</sub> a las 16 horas. Esto sugiere que el EPA es metabolizado por los microorganismos del rumen, pero su degradación depende de su concentración en el medio. Por otro lado, las proporciones de DHA se mantuvieron estables o aumentaron ligeramente (Tabla 3-4). Esto sugiere que este compuesto no se metabolizó en las condiciones de degradación *in vitro* de este experimento. Otros autores han propuesto que el DHA si se metaboliza en el rumen pero que su degradación depende de su concentración. AbuGhazaleh y Jenkins, (2004), Chow *et al.*, (2004) y Dohme *et al.*, (2003) establecieron que a mayor concentración de DHA en el medio (100, 200, 300 y 400 mg/mL de inóculo), disminuye su desaparición como también la del EPA. Estos hallazgos son aparentemente contrarios a los encontrados en este trabajo, donde con concentraciones menores (65 µg/mL) a las reportadas por ellos, no se presentó desaparición de DHA y adicionalmente la desaparición del EPA aumento al incrementar

su concentración en el medio. Algunos autores han sugerido que el EPA y DHA no pueden ser metabolizados por los microorganismos del rumen (Ashes *et al.*, 1992). Lo observado en este trabajo estaría en concordancia con este postulado para el DHA pero no para el EPA. Se cree que estas discrepancias entre experimentos se deben a diferencias en las concentraciones usadas, como lo muestra el trabajo de Gulati *et al.*, (1999).

**Tabla 3-3:** Cambios en la proporción de intermediarios de la BH del ALi y ALn para los tratamientos evaluados, durante 16 horas de incubación.

Ácido graso	t (h)	Tratamientos						S.E.	p
		CTRL	ALi:ALn (100%)	ALi:ALn + (82,5% = fijo)		DHA:EPA + (17,5% = variable)			
		T <sub>0</sub> (0:0:0:0)	T <sub>1</sub> (75:25)	T <sub>2</sub> (100:0)	T <sub>3</sub> (75:25)	T <sub>4</sub> (25:75)	T <sub>5</sub> (0:100)		
C <sub>18:0</sub>	0	30,39 <sup>a</sup>	18,14 <sup>b</sup>	17,24 <sup>d</sup>	18,61 <sup>d</sup>	15,56 <sup>d</sup>	16,16 <sup>d</sup>	1,457	0,0008
	5	31,58 <sup>a</sup>	23,31 <sup>b</sup>	15,57 <sup>c</sup>	17,36 <sup>c</sup>	19,00 <sup>b,c</sup>	17,63 <sup>c</sup>	1,644	<0,0001
	16	39,66 <sup>a</sup>	31,33 <sup>b</sup>	21,56 <sup>c</sup>	22,10 <sup>c</sup>	23,62 <sup>c</sup>	22,12 <sup>c</sup>	1,771	<0,0001
C <sub>18:1</sub> t6	0	0,25 <sup>a</sup>	0,15 <sup>b</sup>	0,15 <sup>b</sup>	0,16 <sup>a,b</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,15 <sup>b</sup>	0,012	0,0068
	5	0,42 <sup>a</sup>	0,32 <sup>a,b</sup>	0,32 <sup>a,b</sup>	0,39 <sup>a</sup>	0,32 <sup>a,b</sup>	0,27 <sup>b</sup>	0,016	0,0108
	16	0,64	0,56	0,57	0,63	0,54	0,48	0,019	0,1621
C <sub>18:1</sub> t9	0	0,28 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a,b</sup>	0,08 <sup>b</sup>	0,11 <sup>b</sup>	0,12 <sup>b</sup>	0,16 <sup>a,b</sup>	0,021	0,0066
	5	0,27 <sup>a,b</sup>	0,27 <sup>a,b</sup>	0,33 <sup>a,b</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0,33 <sup>a,b</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,019	0,0439
	16	0,24 <sup>b</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,70 <sup>a</sup>	0,83 <sup>a</sup>	0,62 <sup>a</sup>	0,57 <sup>a</sup>	0,058	0,0001
C <sub>18:1</sub> t11	0	6,32 <sup>a</sup>	3,78 <sup>b</sup>	3,96 <sup>b</sup>	3,87 <sup>b</sup>	3,32 <sup>b</sup>	3,69 <sup>b</sup>	0,262	0,0025
	5	12,96 <sup>d</sup>	13,54 <sup>c,d</sup>	15,06 <sup>b,c</sup>	17,61 <sup>a</sup>	16,62 <sup>a,b</sup>	15,12 <sup>b,c</sup>	0,468	0,0002
	16	15,40 <sup>c</sup>	19,63 <sup>b,c</sup>	29,15 <sup>a</sup>	25,17 <sup>a,b</sup>	27,53 <sup>a,b</sup>	27,69 <sup>a,b</sup>	1,408	0,002
C <sub>18:1</sub> c6	0	0,65 <sup>a</sup>	0,35 <sup>b</sup>	0,39 <sup>b</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,32 <sup>b</sup>	0,35 <sup>b</sup>	0,034	0,0001
	5	1,16 <sup>b</sup>	1,11 <sup>b</sup>	1,62 <sup>a,b</sup>	1,77 <sup>a</sup>	1,45 <sup>a,b</sup>	1,41 <sup>a,b</sup>	0,069	0,0144
	16	1,57 <sup>b</sup>	1,77 <sup>b</sup>	3,47 <sup>a</sup>	3,83 <sup>a</sup>	3,41 <sup>a</sup>	3,42 <sup>a</sup>	0,229	0,0006
C <sub>18:1</sub> c9	0	1,85	1,21	0,91	1,13	1,08	1,29	0,107	0,0456
	5	1,80	1,46	1,41	1,65	1,49	1,30	0,062	0,1993
	16	1,40 <sup>b,c</sup>	1,20 <sup>c</sup>	2,02 <sup>a,b</sup>	2,11 <sup>a</sup>	1,96 <sup>a,b</sup>	1,91 <sup>a,b</sup>	0,091	0,0034
C <sub>18:1</sub> c11	0	0,37 <sup>a</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,20 <sup>b</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,017	<0,0001
	5	0,51 <sup>a</sup>	0,30 <sup>b</sup>	0,36 <sup>b</sup>	0,39 <sup>b</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,37 <sup>b</sup>	0,016	0,0008
	16	0,51 <sup>a</sup>	0,34 <sup>b</sup>	0,45 <sup>a,b</sup>	0,45 <sup>a,b</sup>	0,45 <sup>a,b</sup>	0,46 <sup>a</sup>	0,013	0,0175
C <sub>18:2</sub> t11, c15	5	3,11 <sup>a,b</sup>	2,36 <sup>c</sup>	2,58 <sup>b,c</sup>	2,69 <sup>b,c</sup>	2,96 <sup>a,b,c</sup>	3,56 <sup>a</sup>	0,116	0,003
	16	1,32 <sup>c</sup>	1,51 <sup>c</sup>	1,71 <sup>c</sup>	1,79 <sup>c</sup>	2,53 <sup>b</sup>	3,14 <sup>a</sup>	0,168	<0,0001
	0	5,77 <sup>d</sup>	35,59 <sup>a</sup>	35,84 <sup>a</sup>	34,42 <sup>a</sup>	35,96 <sup>a</sup>	32,73 <sup>a</sup>	3,061	<0,0001
C <sub>18:2</sub> c9, c12	5	3,75 <sup>c</sup>	26,58 <sup>a,b</sup>	29,19 <sup>a</sup>	22,61 <sup>b</sup>	22,07 <sup>b</sup>	25,25 <sup>a,b</sup>	2,370	<0,0001
	16	1,96 <sup>d</sup>	17,81 <sup>a</sup>	14,27 <sup>a</sup>	17,28 <sup>a</sup>	13,15 <sup>a</sup>	13,40 <sup>a</sup>	1,426	0,001
	0	0,14	0,10	0,09	0,11	0,09	0,10	0,006	0,0567
C <sub>18:3</sub> c6, c9, c12	5	0,13 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a,b</sup>	0,10 <sup>b</sup>	0,10 <sup>b</sup>	0,11 <sup>a,b</sup>	0,10 <sup>b</sup>	0,003	0,0056
	16	0,09 <sup>b</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,08 <sup>b</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,08 <sup>b</sup>	0,006	<0,0001
	0	24,66	23,06	19,83	20,74	21,96	22,18	0,550	0,0977
C <sub>18:3</sub> c9, c12, c15	5	14,20 <sup>a</sup>	11,41 <sup>b</sup>	11,43 <sup>d</sup>	11,46 <sup>b</sup>	10,77 <sup>b</sup>	12,16 <sup>a,b</sup>	0,319	0,0111
	16	8,60 <sup>a</sup>	6,77 <sup>a,b</sup>	5,47 <sup>b</sup>	4,90 <sup>b</sup>	4,78 <sup>b</sup>	4,71 <sup>b</sup>	0,376	0,004
	0	0,04	0,03	0,01	0,03	0,03	0,03	0,003	0,4286
C <sub>18:2</sub> c9, t11	5	1,07 <sup>b</sup>	1,36 <sup>a</sup>	1,07 <sup>b</sup>	1,35 <sup>a</sup>	1,05 <sup>b</sup>	0,92 <sup>b</sup>	0,049	0,0001
	16	0,46 <sup>b</sup>	1,15 <sup>a</sup>	1,16 <sup>a</sup>	0,80 <sup>a,b</sup>	1,16 <sup>a</sup>	1,05 <sup>a</sup>	0,075	0,0016

<sup>1</sup> Medias con diferente superíndice, difieren entre sí (P<0,05); <sup>2</sup> No se detecto C<sub>18:2</sub> t11c15 a tiempo 0 en ningún tratamiento, por lo tanto se omitió en esta tabla.

El uso de compuestos marcados podría ayudar a aclarar si realmente el rumen tiene capacidad para metabolizar estos compuestos. También es posible que las discrepancias entre estudios se expliquen por diferencias en la microflora ruminal de los animales donantes del fluido. El EPA y el DHA no son ácidos grasos comúnmente presentes en las dietas de los rumiantes, por lo cual es posible que en condiciones de dietas tradicionales no se desarrollen microorganismos capaces de metabolizar el EPA y el DHA. La

capacidad de adaptarse a nuevas condiciones dietarias por los microorganismos del rumen ha sido ampliamente documentada y se ha demostrado que cuando aparecen compuestos tóxicos (saponinas, oxalatos, mimosina, otros) las poblaciones ruminales pueden evolucionar o se modifican en el tiempo para degradarlos (Van Soest, 1994).

**Tabla 3-4:** Cambios en la proporción del EPA y el DHA para los tratamientos evaluados, a diferentes tiempos de incubación.

Ácido graso		Tratamientos <sup>1</sup>						S.E.	P
		Control	1	2	3	4	5		
EPA	0 h	ND <sup>2</sup>	ND	ND	1,01 <sup>c</sup>	4,51 <sup>b</sup>	6,52 <sup>a</sup>	0,613	<0,0001
	5 h	ND	ND	ND	1,06 <sup>c</sup>	3,35 <sup>b</sup>	4,53 <sup>a</sup>	0,455	<0,0001
	16 h	ND	ND	ND	0,75 <sup>c</sup>	2,47 <sup>b</sup>	2,92 <sup>a</sup>	0,340	<0,0001
DHA	0 h	ND	ND	3,84 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>	1,06 <sup>c</sup>	ND	0,409	<0,0001
	5 h	ND	ND	5,98 <sup>a</sup>	3,13 <sup>b</sup>	1,06 <sup>c</sup>	ND	0,592	<0,0001
	16 h	ND	ND	4,08 <sup>a</sup>	2,83 <sup>b</sup>	0,97 <sup>c</sup>	ND	0,420	<0,0001

<sup>1</sup> Medias con diferente superíndice, difieren entre sí (P<0,05); <sup>2</sup> ND= No detectado.

### 3.5.3 Digestibilidad *in vitro* de la materia seca

La adición de ácidos grasos disminuyó la DIVMS en todos los tratamientos con excepción de T<sub>5</sub>, que a pesar de tener valores inferiores a T<sub>0</sub>, no fueron diferentes estadísticamente (tabla 3-5).

**Tabla 3-5:** Digestibilidad *in vitro* de la materia seca del kikuyo para los diferentes tratamientos evaluados

Tratamiento <sup>1</sup>	DIVMS (%)
T <sub>0</sub>	68,4 <sup>a</sup>
T <sub>1</sub>	65,7 <sup>b</sup>
T <sub>2</sub>	65,8 <sup>b</sup>
T <sub>3</sub>	65,3 <sup>b</sup>
T <sub>4</sub>	65,5 <sup>b</sup>
T <sub>5</sub>	66,8 <sup>a,b</sup>
SE	0,3255
p	0,0009

<sup>1</sup> Medias con diferente superíndice, no son iguales (P<0,05).

Los resultados anteriores se encuentran de acuerdo con lo propuesto por Jalc et al., (2009), los cuales no hallaron diferencias significativas para la DIVMS entre tratamientos que contenían diferentes relaciones de ácidos grasos  $\Omega$ -6 y  $\Omega$ -3 (1:1, 3:1 y 5:1) y una mezcla 70:30 (heno:cebada). Trabajos similares registraron el mismo comportamiento

para la DIVMS (Choi *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2008; Duckett y Gillis, 2010), como también para la PC, FDA y EE. Sin embargo, en otros trabajos se halló un efecto negativo de la adición de aceites de pescado, sobre la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica y del FDN (Vafa *et al.*, 2010).

### 3.6 Conclusiones

La adición de EPA y DHA, no generó la acumulación de ALi y ALn, con respecto al tratamiento que contenía sólo ALi y ALn. Esto sugiere que en las condiciones del experimento, el EPA y DHA no fueron inhibidores de la desaparición del ALi y ALn.

La adición de EPA y DHA, generó la acumulación de ATV y disminuyó la proporción de C<sub>18:0</sub>, con respecto a aquellos tratamientos que no los contenían. Esto sugiere que el EPA y el DHA presentan un efecto inhibitorio en los pasos intermedios de la BH y no en el inicio.

Se halló que el C<sub>18:2</sub> *trans*-11, *cis*-15 se acumuló con la adición de EPA pero no de DHA. Esto sugiere que el sistema enzimático principalmente responsable de la desaparición del C<sub>18:2</sub> *trans*-11, *cis*-15 es diferente al del ATV.

El C<sub>18:1</sub> *trans*-9, C<sub>18:1</sub> *cis*-6 y C<sub>18:1</sub> *cis*-9 se acumularon en la medida que incrementó el tiempo de incubación, para los tratamientos con EPA y DHA, lo cual no sucedió para el C<sub>18:1</sub> *trans*-6 y el C<sub>18:1</sub> *cis*-11. Esto sugiere que los dos grupos de ácidos grasos podrían ser reducidos por mecanismos o reductasas diferentes.

A mayor proporción de EPA en la mezcla, su desaparición aumento, lo cual no sucedió para el DHA. Esto sugirió que el EPA fue metabolizado por los microorganismos del rumen, lo cual dependió de su concentración en el medio. Por el contrario, el DHA no fue metabolizado en las condiciones *in vitro* de este experimento.

La adición de ácidos grasos, disminuyó la DIVMS en todos lo tratamientos con respecto al control, a excepción del tratamiento que sólo contenía EPA.

### 3.7 Bibliografía

ABUGHAZALEH AA y Jacobson BN. The effect of pH and polyunsaturated C<sub>18</sub> fatty acid source on the production of vaccenic acid and conjugated linoleic acids in ruminal cultures incubated with docosahexaenoic acid. *Anim Feed Sci Tech* 2007; 136: 11–22.

ABUGHAZALEH AA y Jenkins TC. Disappearance of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids from cultures of mixed ruminal microorganisms. *J Dairy Sci* 2004; 87: 645-651.

ACKMAN RG. 1982. Fatty acid composition of fish oils. In: Barlow, S.M., Stansby, M.E. (Eds.), *Nutritional Evaluation of Long-Chain Fatty Acids in Fish Oil*. Academic Press, London, pp. 25–88.

AOAC 2006. *Official Methods of Analysis of Aoac International*. Editor: Hortwitz W. (18 Ed). Association of Official Analytical Chemists.

ASHES JR, Siebert BD, Gulati SK, Cuthbertson AZ y Scott TW. Incorporation of n-3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. *Lipids* 1992; 27: 629–631.

BAUCHART D, Vérité R y Rémond B. Long chain fatty acid digestion in lactating cows fed fresh grass from spring to autumn. *Can J Anim Sci* 1984; 64 (Suppl): 330-331.

BAUMAN DE, Baumgard LH, Corl BA y Griinari JM. Biosynthesis of conjugated linoleic acids in ruminants. *Proc Am Soc Anim Sci* 1999; <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf>.

BOECKAERT C, Mestdagh J, Vlaeminck B, Clayton D y Fievez V. Micro-algae as potent rumen methane inhibitors and modifiers of rumen lypolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acid. *Int Congr Ser* 2006; 1293: 184-188.

BOECKAERT C, Vlaeminck B, Mestdagh J y Fievez V. *In vitro* examination of DHA-edible micro algae. 1. Effect of rumen lypolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acid. *Anim feed Sci Tech* 2007; 136: 63-79.

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

CHOI NMA, Enser M, Wood JD y Scollan ND. Incorporation of soya oil hydrolysate in the diet of defaunated or refaunated sheep: effect on rumen fermentation *in vitro*. *Archiv Anim Nutr* 1998; 40: 320–337.

CHOW TT, Fievez V, Moloney AP, Raes K, Demeyer D y De Smet S. Effect of fish oil on *in vitro* rumen lipolysis, apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediates. *Anim Feed Sci Tech* 2004; 117: 1–12.

COCHRAN WG y Cox GM. 1957. *Experimental Designs*. pp. 127-131.

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

CORL BA, Baumgard LH, Dwyer DA, Griinari JM, Phillips BS y Bauman DE. The role of  $\Delta^9$ -desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA. *J Nutr Biochem* 2001; 12: 622–630.

CORTÉS JE, Moreno B, Pabón ML, Avila P, Kreuzer M, Hess HD y Carulla JE. Effects of purified condensed tannins extracted from *Calliandra*, *Flemingia* and *Leucaena* on ruminal and postruminal degradation of soybean meal as estimated *in vitro*. *Anim Feed Sci Tech* 2009; 151: 194–204.

DOHME F, Fievez V, Raes K, Demeyer DI. Increasing levels of two different fish oils lower ruminal biohydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid *in vitro*. *Anim. Res* 2003; 52: 309–320.

DUCKETT SK y Gillis MH. Effects of oil source and fish oil addition on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *J Anim Sci* 2010; 88: 2684-2691.

ENJALBERT F, Eynard P, Nicot MC, Troegeler-Meynadier A, Bayourthe C y Mocoulon R. *In vitro* versus *in situ* ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids from raw or extruded mixture of ground canola seed/canola meal. *J Dairy Sci* 2003; 86: 351-359.

FIEVEZ V, Dohme F, Danneels M, Raes K y Demeyer D. Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. *Anim Feed Sci Tech* 2003; 104: 41-58.

FUKUDA S, Furuya H, Suzuki Y, Asanuma N y Hino T. New strain of *Butyrivibrio* that has high ability to isomerize linoleic acid to conjugated linoleic acid. *J Gen Appl Microbiol* 2005; 51: 105-113.

GARCÉS R y Mancha M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal biochem* 1993; 211: 139-143.

GIVENS DI, Cottrill BR, Davies M, Lee PA, Mansbridge RJ y Moss AR. Sources of n-3 polyunsaturated fatty acids additional to fish oil for livestock diets—A review. *Nutr Abstr Rev B, Livest Feeds Feeding* 2000; 70: 3.

GRIINARI JM y Bauman DE. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: Yurawecs MP, Mossoba MM, Kramer JK, Pariza MW, Nelson GJ, editors. *Advanced in conjugated linoleic acids reseach*, Vol. 1 Champaign (IL): AOCS Press. pp. 180-200.

GRIINARI JM, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KVV y Bauman DE. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta^9$  desaturase. *J Nutr* 2000; 130: 2285-2291.

GULATI SK, Ashes JR y Scott TW. Hydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their incorporation in to milk fat. *Anim Feed Sci Tech* 1999; 79: 57-64.

GULATI SK, McGrath S, Wynn PC y Scott TW. Preliminary results on the relative incorporation of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids into cows milk from two types of rumen protected fish oil. *Int Dairy J* 2003; 13: 339-343.

HARFOOT CG y Hazlewood GP. 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. P.N. Hobson y S. Stewart, ed. Chapman and Hall, London, UK. pp. 382-426.

HOU J, Wang F y Ren D. Effect of the supplementation of fish oil on the conjugated linoleic acid production, especially accumulation of *trans*-11 C<sub>18:1</sub> and *trans*-10 C<sub>18:1</sub> fatty acids: An *in vitro* rumen fermentation study. *Small Ruminant Res* 2011; 99: 148-152.

JALČ D, Čertík M, Kundrliková K y Kubelková P. Effect of microbial oil and fish oil on rumen fermentation and metabolism of fatty acids in artificial rumen. *Czech J Anim Sci* 2009; 54(5): 229-237.

JOUANY JP, Lassalas B, Doreau M y Glasser F. Dynamic features of the rumen metabolism of linoleic acid, linolenic acid and linseed oil measured *in vitro*. *Lipids* 2007; 42: 351-360.

KAIRENIUS P, Toivonen V y Shingfield KJ. Identification and Ruminal Outflow of Long-Chain Fatty Acid Biohydrogenation Intermediates in Cows Fed Diets Containing Fish Oil. *Lipids* 2011; 46: 587–606.

KAY JK, Mackle TR, Auldust MJ, Thomson NA y Bauman DE. Endogenous Synthesis of *cis*-9, *trans*-11 Conjugated linoleic Acid in Dairy Cows Fed Fresh Pasture. *J Dairy Sci* 2004; 87: 369–378.

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

KIM EJ, Huws SA, Lee MRF, Wood JD, Muetzel SM, Wallace RJ y Scollan ND. Fish oil increases the duodenal flow of long chain polyunsaturated fatty acids and *trans*-11 18:1 and decreases 18:0 in steers via changes in the rumen bacterial community. *J Nutr* 2008; 138: 889–896.

KLEIN CM y Jenkins TC. Docosahexaenoic acid elevates *trans*-18:1 isomers but is not directly converted into *trans*-18:1 isomers in ruminal batch cultures. *J Dairy Sci* 2011; 94(9): 4676-83.

LAVERROUX S, Glasser F, Gillet M, Joly C y Doreau M. Isomerization of vaccenic acid to *cis* and *trans* C<sub>18:1</sub> isomers during biohydrogenation by rumen microbe. *Lipids* 2011; 46: 843-850.

LIU L, Wang JQ, Bu DP, Liu SJ, Liang S, Liu KL, Wei HY y Zhou LY. Influence of docosahexaenoic acid on the concentration of fatty acids and volatile fatty acids in rumen fluid analysed by a rumen-simulation techniques. *J Anim Feed Sci* 2009; 18: 132–141.

LOCK AL y Bauman DE. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 2004; 39:1197-1206.

LOOR JJ, Ueda K, Ferlay A, Chilliard Y y Doreau M. Intestinal flow and digestibility of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. *Anim Feed Sci Tech* 2005; 119: 203-222.

MAIA MR, Chaudhary LC, Figueres L y Wallace J. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Ant Van Lee* 2007; 91: 303-314.

McDOUGALL EI. Studies on Ruminant Saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem J* 1948; 43: 99-109.

MAIA MR, Chaudhary LC, Bestwick CS, Richardson AJ, McKain N, Larson TR, Graham IA y Wallace RJ. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology* 2010; 10(52): 1-10.

OSBORNE VR, Radhakrishnan S, Odongo NE, Hill AR y McBride BW. Effects of supplementing fish oil in the drinking water of dairy cows on production performance and milk fatty acid composition. *J Anim Sci* 2008; 86: 720-729.

PALMQUIST DL y Griinari. Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oils in the diet. *Anim Feed Sci Tech* 2006; 131: 358-369.

REYNOLDS CK, Cannon VL y Loerch SC. Effects of forage source and supplementation with soybean and marine algal oil on milk fatty acid composition of ewes. *Anim Feed Sci Tech* 2006; 131: 333-357.

RIBEIRO CVM, Eastridge L, Firkins JL, St-Pierre NR y Palmquist DL. Kinetics of fatty acid biohydrogenation *in vitro*. *J Dairy Sci* 2007; 90: 1405–1416.

SAS Institute 2004. SAS/STAT. User's guide. Version 8 ed. SAS Institute Inc, Carry, NC.

SCHROEDER GF, Gagliostro GA, Becu-Villalobos D y Lacau-Mengido I. Supplementation with partially hydrogenated oil in grazing dairy cows in early lactation. *J Dairy Sci* 2002; 85: 580–594.

SHINGFIELD KJ, Ahvenjärvi S, Toivonen V, Arölä A, Nurmela KVV, Huhtanen P y Griinari JM. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Anim Sci* 2003; 77: 165–179.

SHINGFIELD KJ, Lee MR, Humphries DJ, Scollan ND, Toivonen V, Reynolds CK y Beaver DE. Effect of incremental amounts of fish oil in the diet on ruminal lipid metabolism in growing steers. *Br J Nutr* 2010; 104: 56–66.

STERK A, Hovenier R, Vlaeminck B, van Vuuren AM, Hendriks WH y Dijkstra J. Effects of chemically or technologically treated linseed products and docosahexaenoic acid addition to linseed oil on biohydrogenation of C<sub>18:3n-3</sub> *in vitro*. J Dairy Sci 2010; 93: 5286–5299.

TILLEY JMA y Terry RA. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J Br Crassl Soc 1963; 18:104-111.

TORAL PG, Frutos P, Hervas G Gomez-Cortes P, Juarez M y de la Fuente MA. Changes in milk fatty acid profile and animal performance in response to fish oil supplementation alone or in combination with sunflower oil, in dairy ewes. J Dairy Sci 2010a; 93: 1604-1615.

TORAL PG, Shingfield KJ, Hervás G, Toivonen V y Frutos P. Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. J Dairy Sci 2010b; 93: 4804–4817.

TROEGELER-MEYNADIER A, Nicot MC, Bayouthé C, Moncoulon R y Enjalbert F. Effects of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation *in vitro*. J Dairy Sci 2003; 86: 4054–4063.

VAFA TS, Naserian AA, Moussavi ARH, Valizadeh R, Mesgaran MD y Khorashadizadeh MA. Effects of different levels of fish oil and canola oil on productive performance of holstein dairy cows. Indian J. Anim. Res., 44 (2): 79 - 86, 2010.

VAN SOEST PJ, Robertson JB y Lewis BA. Methods for dietary fiber, detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J Dairy Sci 1991; 74: 3583-3597.

VAN SOEST PJ. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant (2 Ed.). Cornell Univ. Press, Ithaca, NY. 165-170.

WASOWSKA I, Maia MRG, Niedzwiedzka KM, Czauderna M, Ribeiro JMC, Devillard E, Shingfield KJ y Wallace RJ. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. British Journal of Nutrition 2006; 95: 1199–1211.

WHITLOCK LA, Schingoethe DJ, Hippen AR, Kalscheur KF, Baer RJ, Ramaswamy N y Kasperson KM. Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acids in milk of dairy cows more than when fed separately. J Dairy Sci 2002; 85: 234–243.

---

WOODS VB y Fearon AM. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review. *Livest Sci* 2009; 126: 1–2.

YAMASAKI M, Kishihara K, Ikeda I, Sugano M y Yamada K. A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugated linoleic acid. *JAOCS* 1999; 76: 933-938.

## 4. Capítulo 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

De los resultados expuestos en los capítulos 2 y 3, se hace evidente la existencia de interacciones entre el ALi y ALn y el EPA y DHA durante el proceso de BH. Este hallazgo pone de manifiesto, que no es suficiente con considerar las cantidades de ácidos grasos en un suplemento, sino que también se debe tener en cuenta la proporción en que se combinen. Además, que el ALi y ALn y el EPA y DHA presentan un comportamiento metabólico diferente, pese a sus similitudes estructurales. Lo anterior, se soporta en el hecho de que en este trabajo, al realizar la sustitución parcial de ALi por ALn, la isomerización de ALi en ALC y la reducción de ALC en ATV se incrementaron, como también disminuyó la tasa de acumulación de ATV. También, porque la adición de EPA generó la acumulación del isómero C18:2 *trans*-11, *cis*-15, no ocurriendo lo mismo para el DHA.

Se presenta evidencia de que los efectos metabólicos de las combinaciones de los ácidos grasos no equiparable en todos los pasos de la BH. Esto es congruente con el hallazgo de que la inclusión de EPA y DHA no generó acumulación de ALi y ALn pero si de ATV, con una disminución de la proporción de C<sub>18:0</sub>.

Los parámetros cinéticos y termodinámicos del proceso de BH del ALi y ALn, como también los cambios de proporción de los diversos intermediarios, permitieron incrementar el conocimiento que se tiene del proceso. Se halló que en las condiciones de experimentación, se presentaron procesos de desaturación en fluido ruminal, pese a que estas reacciones son termodinámicamente desfavorables en este medio. Adicionalmente, el C<sub>18:1</sub> *trans*-9, C<sub>18:1</sub> *cis*-6 y C<sub>18:1</sub> *cis*-9 se acumularon en la medida que incrementó el tiempo de incubación, para los tratamientos con EPA y DHA, lo cual no sucedió para el C<sub>18:1</sub> *trans*-6 y el C<sub>18:1</sub> *cis*-11, lo cual permite proponer, que los grupos de ácidos grasos podrían ser reducidos por mecanismos o sistemas enzimáticos diferentes.

Finalmente, se halló que la inclusión de mezclas de ALi, ALn, EPA y DHA tuvo un efecto más negativo sobre la DIVMS, que cuando se usaron los compuestos puros, lo cual permite proponer que su combinación es más tóxica que su adición en forma pura.

De esta manera, los resultados anteriores se pueden constituir como el soporte para el desarrollo de futuros trabajos *in vivo*, encaminados a buscar estrategias nutricionales que permitan incrementar los niveles de ácidos grasos mono y poliinsaturados, con potenciales efectos benéficos para la salud humana.

## 4.2 Recomendaciones

Se hizo evidente que no es suficiente considerar sólo la cantidad de ácidos grasos polinsaturados agregados a la dieta, sino también su proporción, ya que esta puede incidir no solamente en la variación de intermediarios y productos, sino también en la DIVMS. De esta manera, el presente trabajo se constituye como un fundamento experimental e incentivo importante para:

- Evaluar mediante trabajos *in vivo*, el efecto de diferentes relaciones de ALi:ALn mediante la combinación de diversos recursos lipídicos, sobre la producción de lípidos bioactivos en leche y carne.
- Evaluar mediante trabajos *in vivo*, el efecto real de la inclusión de diferentes proporciones de ALi:ALn en forma libre y esterificada, sobre la producción de intermediarios metabólicos en leche y carne como también sobre diversos parámetros productivos.
- Evaluar el efecto de diferentes relaciones de ALi:ALn sobre los niveles de poblaciones ruminales y su incidencia en la concentración de lípidos bioactivos en leche y carne.
- El desarrollo de investigación en ciencia básico-aplicada, orientada a dilucidar mediante técnicas analíticas y de biología molecular el mecanismo de interacción del ALi y ALn, durante su proceso de BH en el rumen.
- La búsqueda y determinación de intermediarios nuevos del proceso de BH de ácidos grasos poliinsaturados, con el fin de incrementar el conocimiento de tasas de paso entre los mismos, encaminado a maximizar la comprensión global del proceso de BH en el rumen a partir de modelos multicompartimentalizados o matemáticamente más completos al presentado en este trabajo.

Todas las propuestas anteriores, presentan un objetivo común: Incrementar el conocimiento de los procesos de BH en el rumen, con miras a la maximización de lípidos bioactivos en leche y carne.







