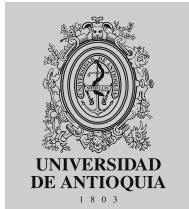


# Revisiones de literatura



## Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias

<http://rccp.udea.edu.co>

RCCP

### Pasture traits and conjugated linoleic acid (CLA) content in milk<sup>□</sup>

*Relación entre las características de la pastura y el contenido de ácido linoleico conjugado (ALC) en la leche*

*Relação entre as características da pastagem e o conteúdo de ácido linoleico conjugado (ALC) no leite*

Javier M León Caviedes<sup>1,2,\*</sup> Zoot; Martha L Pabón Restrepo<sup>1,3</sup>, Q, PhD;  
Juan E Carulla Fornaguera<sup>1,2</sup>, Zoot, PhD.

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Nutrición Animal, <sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Producción Animal, <sup>3</sup>Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

(Recibido: 2 febrero, 2010; aceptado: 18 enero, 2011)

#### Summary

*Functional foods (foods that have a beneficial effect in health) were usually referred to those of vegetable origin. Nowadays, interesting bioactive compounds have been also found in the fat of ruminants (milk and meat). Ruminant feeding systems based in grazing increase the presence of polyunsaturated fatty acids (i.e., conjugated linoleic acid) in milk, which reputedly prevents against certain diseases, such as diabetes, atherosclerosis and cancer. This could later represent a comparative marketing advantage for milk produced under grazing conditions. Most Colombian dairy cows graze on kikuyu grass and/ or ryegrass, but those pastures have a high demand for nitrogen, compromising the sustainability of those systems. A search for new pastures, selected for adaptation, compatibility and productivity has started. The association between *Lotus uliginosus* and kikuyu has interesting potential in terms of milk quality. The presence of legumes in the pasture allows to decrease the need for nitrogen fertilizer and increases the content of beneficial compounds in milk, such as secondary metabolites that modify biohydrogenation patterns and increase the production of CLA precursors. Pasture management factors that affect milk fatty acid composition (i.e., age, species, and nitrogen fertilization) are discussed.*

**Key words:** diet, regrowth time, specie, vaccenic acid.

#### Resumen

*La presencia de compuestos bioactivos en la grasa de los productos derivados de los rumiantes ha despertado gran interés porque se le atribuyen efectos preventivos frente a enfermedades de alto impacto en la población. Se ha demostrado que los sistemas de alimentación basados en pastoreo incrementan*

□ Para citar este artículo: León JM, Pabón ML, Carulla JE. Relación entre las características de la pastura y el contenido de ácido linoleico conjugado (ALC) en la leche. Rev Colomb Cienc Pecu 2011. 24:63-73.

\* Autor para correspondencia: Javier M León C. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. E-mail: jmleon@unal.edu.co

la presencia de ácidos grasos poliinsaturados y específicamente el ácido linoleico conjugado ALC en la leche, lo cual se constituye en ventaja comparativa para la leche producida en Colombia. Los sistemas especializados de producción de leche en el país se basan en el uso de monocultivos de kikuyo y/o ryegrass, pasturas que demandan una alta cantidad de fertilizante nitrogenado para mantener su producción. Esta situación resta sostenibilidad al sistema productivo y no genera valor agregado sobre el producto. En el país se ha venido trabajando en la búsqueda de nuevos materiales forrajeros seleccionados por adaptación, compatibilidad y productividad. De esta evaluación ha resultado materiales como *Lotus uliginosus*, una leguminosa que se ha asociado a las pasturas de kikuyo y ha dado buenos resultados en términos de producción y calidad de leche, además que la presencia de una leguminosa en la pastura permite minimizar la demanda de fertilizante nitrogenado. Resultados de diferentes investigaciones han evidenciado cómo la presencia de leguminosas en las pasturas incrementa el contenido de esos compuestos benéficos para la salud humana, este efecto está relacionado con la presencia de metabolitos secundarios que modifican los patrones de biohidrogenación ruminal incrementando la producción de precursores de ALC. Se abordarán los factores relacionados con el manejo de las pasturas que afectan la composición de ácidos grasos de la leche con especial atención a la edad, especie y condiciones de manejo como la fertilización nitrogenada y el efecto que presentan las pasturas asociadas con leguminosas templadas.

**Palabras clave:** ácido vaccénico, dieta, edad de rebrote, tipo de forraje.

### Resumo

*Relação entre alimentação e saúde tem marcado uma nova tendência nos mercados internacionais tendo-se em conta as preferências dos consumidores no país. A definição de alimentos funcionais (alimentos que apresentam um efeito benéfico para a saúde) sempre foi utilizada para os alimentos de origem vegetal, no entanto, tem sido descoberta a presença de compostos bioativos nos lipídeos dos produtos derivados de ruminantes (leite e carne). Tem sido demonstrado que os sistemas de alimentação baseados em pastagens incrementam a presença de ácidos graxos poliinsaturados e especificamente, do ácido linoléico conjugado ALC no leite, que apresenta efeitos preventivos frente a doenças como diabetes, arteriosclerose e câncer. O anterior converte-se numa vantagem comparativa que permitiria dar valor agregado ao leite e aos seus derivados e abrir novos mercados. Os sistemas especializados de produção de leite no país baseiam-se na utilização de monocultivos de *Penisetum clandestinum* e *Lolium multiflorum*, pastagens que demandam alta quantidade de fertilizante nitrogenado para manter a sua produção. Esta situação define um contexto pouco sustentável e que não gera um valor agregado sob o leite para satisfazer as preferências actuais do consumidor. No país tem-se trabalhado na procura de novos materiais forrageiros seleccionados por adaptação, compatibilidade e produtividade. Desta avaliação têm resultado materiais como *Lotus uliginosus*, uma leguminosa que tem sido associada às pastagens de *Penisetum* e que tem gerado bons resultados em termos de produção e qualidade do leite, além da presença de uma leguminosa na pastagem para minimizar a demanda de fertilizante nitrogenado. Resultados de diversas pesquisas têm evidenciado como a presença de leguminosas nas pastagens incrementa os conteúdos desses compostos benéficos para a saúde humana; o anterior tem sido associado à presença de metabolitos secundários que modificam os padrões de bio-hidrogenação ruminal incrementando a produção de precursores de ALC. Deste modo serão abordados os fatores relacionados com o manejo das pastagens que afetam a composição de ácidos graxos do leite prestando especial atenção à idade, espécie e condições de manejo como a fertilização nitrogenada. Por último é revisado o efeito que apresentam as pastagens associadas com as leguminosas *Lotus uliginosus* e *Trifolium pratense*, ressaltando a presença de dois metabolitos secundários característicos neste tipo de pastagens.*

**Palavras chave:** ácido vaccénico, espécie, idade de rebrote, ração.

## Introducción

Los continuos avances en las técnicas de análisis han permitido identificar más de 400 ácidos grasos presentes en la grasa de los rumiantes (Ledoux *et al.*, 2005).

El Ácido Linoleico Conjugado ALC, 18:2 *cis* 9 *trans* 11 ha sido reconocido en modelos animales y cultivos *in vitro* como potencial anticarcinogénico, antidiabetogénico y estimulante de la respuesta inmune que se sintetiza principalmente en la glándula mamaria de los rumiantes a partir del ácido

vaccénico, producto de la transformación ruminal de los ácidos linoleico (AL) y linolénico (ALN) provenientes de la dieta (Ip *et al.*, 1999; Khanal *et al.*, 2007).

Los diferentes trabajos (Blas, 2004; Collomb *et al.*, 2006; Dewhurst *et al.*, 2006; Elgersma *et al.*, 2003a, 2003, 2004, 2006; Khanal *et al.*, 2007), sugieren que los factores nutricionales se constituyen en el pilar más importante en la modificación del perfil de ALC de la leche.

En Colombia, a pesar de la existencia de algunos datos que muestran contenidos elevados de ALC en la leche, no se conoce de manera clara cómo la diversidad en las características agroecológicas y de manejo inherente a nuestros hatos lecheros afectan esta composición. Algunos trabajos realizados en el periodo comprendido entre el 2003 y 2007 por el Grupo de Investigación en Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Colombia, muestran un rango muy amplio en la concentración de ALC (6.38 a 19.32 mg/g de grasa) en la leche de sistemas especializados con praderas de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) (Rico *et al.*, 2007).

La variación asociada a factores específicos de la dieta pueden modificar la biohidrogenación ruminal y por ende el flujo del precursor (C18:2 *trans* 11) a la glándula mamaria. Varios estudios, han demostrado que la biohidrogenación producida por los microorganismos ruminales sobre diferentes ácidos grasos (oleico, linoleico, linolénico), modifica el flujo del precursor de ALC a la glándula mamaria (Bessa *et al.*, 2000; Chilliard *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2007; Vandorland *et al.*, 2007); estas variaciones, a su vez, están asociadas a posibles variaciones de las poblaciones ruminales. Los estudios realizados a la fecha muestran cambios significativos en algunas familias de microorganismos que podrían alterar el flujo del ácido vaccénico desde el rumen (Boeckert *et al.*, 2008; Fukuda *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2000). La mayoría de estos estudios han sido realizados en condiciones de laboratorio o con microorganismos aislados en donde no siempre las respuestas obtenidas obedecen a las complejas interacciones del ambiente ruminal.

### Definición de ALC

El Ácido Linoleico Conjugado es un isómero geométrico y posicional del ácido linoléico que se presentan naturalmente en productos lácteos y carne de los rumiantes como resultado de biohidrogenación ruminal incompleta y conversión endógena de ácido *trans* vaccénico (C18:1, *trans* 11) (Chin *et al.*, 1992, Grinari *et al.*, 2000). El ácido ruménico (ALC *cis*-9, *trans*-11) es el isómero en mayor proporción en la grasa láctea, y representa del 75 al 90% de los ALC totales (Bauman *et al.*, 2003). En la actualidad se conoce que el ALC puede influenciar diversas funciones fisiológicas y promover el estado de salud con respecto al cáncer, enfermedades del corazón, diabetes, conformación del hueso modulación del crecimiento e inmunidad (Cook *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1999).

Existen dos isómeros de ALC ampliamente conocidos con actividad fisiológica. Estos son el C18:2 *c9,t11* ALC (Acido ruménico) el cual se encuentra en productos lácteos y cárnicos de rumiantes, y el C18:2 *t10,c12*, un isómero predominante en los suplementos de ALC. Los estudios en animales sugieren que el ácido ruménico es el responsable principal de los isómeros de ALC que presentan actividades anticancerogénicas en ratas (Corl *et al.*, 2001; Ip *et al.*, 1999; O'Shea *et al.*, 2000), y posiblemente en humanos (Aro *et al.*, 2000; Belury, 2002) mientras el C18:2 *t10,c12*, es un isómero que altera el metabolismo de lípidos incluyendo la depresión en la síntesis de grasa láctea.

El ALC *c9,t11* ha sido reconocido inequívocamente como un inhibidor de la carcinogénesis en modelos animales (NRC, 1996) y cultivos de células *in vitro* (Schonberg and Kokran, 1995; Shultz *et al.*, 1992). Adicionalmente el ALC parece estar involucrado en la modulación del crecimiento (Ostrowska *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999), prevención de diabetes (Houseknecht *et al.*, 1998), salud del hueso (Li Y *et al.*, 1999) y fortalecimiento del sistema inmune (Hayek *et al.*, 1999; Turek *et al.*, 1998).

Ritsenthaler *et al.* (2001), reportaron que los humanos deben consumir más de 400 mg de *cis* 9

*trans* 11 por día para obtener los efectos benéficos sobre la salud y que este consumo se debe lograr a través de la incorporación en la dieta de productos lácteos, es por eso que el incremento en las concentraciones de ALC *c9,t11* en la leche que constituye una parte fundamental de la dieta de los humanos, es una alternativa para incrementar de manera rápida y sencilla el consumo de ALC *c9,t11*.

Los primeros estudios desarrollados en Colombia que reportan contenidos de ALC promedio de 13.5 mg/g de grasa en la Sabana de Bogotá (Rico *et al.*, 2007) y bajo un consumo de leche per cápita de 136 litros (Agrocadenas, 2006), representa un consumo de ALC de 175 mg/d, aún por debajo de lo establecido (Ritzenthaler *et al.*, 2001) para obtener los beneficios sobre la salud, pero por encima de lo establecido como dosis preventiva de 80 mg/d (Gagliostro, 2004). Esto plantea la oportunidad para incrementar los contenidos de ALC en la leche y que dada la variabilidad que se encuentra en nuestros sistemas de producción nos lleva a identificar la estrategia de manejo alimenticia, basada en pastoreo, más adecuada para conseguir este objetivo.

#### *Lípidos en los forrajes*

Los lípidos en los forrajes presentan un rango entre 30 a 100 g/kg de MS, los cuales se encuentran en su mayoría en los cloroplastos (Bauchart *et al.*, 1984). El contenido de lípidos en los cloroplastos varía entre un 22 y 25% de la materia seca. Los lípidos están presentes principalmente como glicolípidos y fosfolípidos (Harfoot and Hazlewoot, 1988; Harwood, 1980). La composición de los lípidos en los forrajes está dada por 33% lípidos simples (diglicéridos, ácidos grasos libres y ceras), 50% galactolípidos (mono y digalactoglicéridos) y 17% fosfolípidos (Bauchart *et al.*, 1984).

Las fuentes de variación en la concentración de lípidos están dadas por las especies de plantas, estado de crecimiento, temperatura e intensidad de la luz (Elgersma *et al.*, 2004). Hay 5 ácidos grasos presentes de manera mayoritaria en los pastos, y aproximadamente 95% consisten de C18:3 n3, C18:2 n6 y C16:0. Los ácidos linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3), son los substratos

de 18 carbonos para la biohidrogenación ruminal y posterior incorporación en forma de ALC en la leche. Los forrajes frescos contienen una alta proporción (50-75%) de ácidos grasos en forma de C18:3 n3, y dicho contenido varía con factores ambientales tales como: estado de madurez (Elgersma *et al.*, 2004), estacionalidad e intensidad de luz (Dewhurst *et al.*, 1998). Mel'uchová *et al.* (2008) evaluaron el efecto de las variaciones estacionales sobre la composición de ácidos grasos de plantas forrajeras y el contenido de ALC en la grasa de leche de oveja. Los resultados encontrados sugieren que la variación estacional del contenido de ácido linoléico en los lípidos de los pastos está relacionada con la variación del ALC en la grasa de la leche.

El contenido de ácidos grasos en los forrajes es importante para la calidad de los productos derivados de los rumiantes. Sin embargo, se desconocen los efectos de las prácticas agronómicas y los factores ambientales relacionados sobre la variación en la concentración y composición de ácidos grasos. Se ha encontrado (Varadyova *et al.*, 2008) una correlación positiva entre la concentración de nitrógeno y ácidos grasos confirmando las observaciones de Boufaied y Chouinard (2003) y Elgersma *et al.*, (2003a).

La alta disponibilidad de nitrógeno estimula la producción de materia seca, incrementa la cantidad de hojas y estimula la síntesis de componentes metabólicos entre los que se incluyen la clorofila y proteína de la hoja. Con el desarrollo de la planta la proporción de hojas con respecto a la materia seca de la planta disminuye, y el aumento de la pared celular reduce los contenidos celulares (Bauchart *et al.*, 1984). Por lo tanto, al combinar estos factores se tiene que la alta disponibilidad de nitrógeno incrementa la concentración de proteína, mientras que con el desarrollo de la planta la concentración de proteína disminuye. De esta manera, se puede incrementar el contenido de ácidos grasos en la planta a través de la fertilización nitrogenada y a través del manejo de periodos de rebrote cortos, debido a la localización de los ácidos grasos dentro del contenido celular de la planta.

En la tabla 1 se presenta el comportamiento de los ácidos grasos en los diferentes estados de crecimiento junto con la fertilización nitrogenada y en la tabla 2 se presenta el perfil de ácidos grasos en términos de proporción observando un comportamiento diferencial del ácido linoléico C18:3 n3 con respecto a los demás ácidos grasos. En términos de proporción, el C18:3 n3 incrementa

con el aumento en la fertilización nitrogenada y disminuye con la edad de la planta, sin embargo los demás ácidos grasos presentan una dinámica contraria a la del C18:3. Es importante este comportamiento debido a que es el ácido graso mayoritario, representa mas 50% del contenido total de ácidos grasos (Boufaied *et al.*, 2003).

**Tabla 1.** Efecto del estado de crecimiento y la fertilización nitrogenada sobre el contenido de ácidos grasos en *Phleum pratense*.

Estado de crecimiento	Nitrógeno kg/ha	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Total AG
Elongación temprana	0	0.07	0.13	3.27	0.35	0.41	1.11	3.97	8.71	18.02
	120	0.06	0.13	3.67	0.44	0.39	1.21	4.26	11.43	21.59
Desarrollo temprano	0	0.07	0.13	2.96	0.30	0.35	0.92	3.51	6.86	15.10
	120	0.07	0.14	3.52	0.46	0.37	1.10	3.85	10.32	19.83
Desarrollo tardío	0	0.06	0.12	2.82	0.30	0.33	1.05	3.39	6.37	14.44
	120	0.06	0.17	3.47	0.42	0.43	1.12	3.99	9.35	19.01
Floración temprana	0	0.07	0.13	2.70	0.27	0.33	1.06	3.19	5.96	13.71
	120	0.07	0.16	3.17	0.36	0.34	1.09	3.71	7.90	16.80
Estado crecimiento Fertilización con N Crecimiento x N		NS NS *	NS ** NS	*** NS	*** *	NS NS NS	NS ** NS	*** NS	*** *	*** NS

\*\* Significativo ( $p < 0.01$ ), \*Significativo ( $p < 0.05$ ). NS: no significativo. Fuente: Boufaied y Chouinard, (2003).

**Tabla 2.** Efecto del estado de crecimiento y la fertilización nitrogenada sobre la proporción de ácidos grasos en *Phleum pratense*<sup>a</sup>.

Estado de crecimiento	Nitrógeno (kg/ha)	C12:0	C14:0	C 16:0	C 16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Elongación temprana	0	0.4	0.7	18.1	1.9	2.3	6.2	22.0	48.3
	120	0.3	0.6	17.0	2.0	1.8	5.6	19.7	52.9
Desarrollo temprano	0	0.5	0.9	19.6	2.0	2.3	6.1	23.2	45.4
	120	0.4	0.7	17.8	2.3	1.9	5.5	19.4	52.0
Desarrollo tardío	0	0.4	0.8	19.5	2.1	2.3	7.3	23.5	44.1
	120	0.3	0.9	18.3	2.2	2.3	5.9	21.0	49.2
Floración temprana	0	0.5	0.9	19.7	2.0	2.4	7.7	23.3	43.5
	120	0.4	1.0	18.9	2.1	2.0	6.5	22.1	47.0

Fuente: Modificada de Boufaied and Chouinard, (2003).

En la tabla 3, se presenta un trabajo con kikuyo en la Sabana de Bogotá en la cual se observa un comportamiento similar al descrito anteriormente en el perfil de ácidos grasos a 50 y 70 días de rebrote del pasto (Aguilar *et al.*, 2009).

**Tabla 3.** Perfil de ácidos grasos del kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) a diferentes edades de rebrote en la Sabana de Bogotá

Ácido graso (%)	Edad de rebrote (Días)	
	50	75
C16:0	17.8	29.7
C18:1	4.7	4.0
C18:2	10.8	11.0
C18:3	59.5	53.0

Fuente: Aguilar *et al.* (2009).

Otro factor que determina de manera importante el contenido y composición de ácidos grasos es la especie de forraje, pues se presentan variaciones importantes de acuerdo a la especie, lo cual resultaría en diferencias en los niveles de ALC en la leche.

El Grupo de Investigación en Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia en estudios preliminares (datos no publicados) determinó el perfil de ácidos grasos de algunos de los forrajes utilizados en los sistemas de producción de nuestro país, encontrando una variación importante en los perfiles de las diferentes especies analizadas (Tabla 4). Estos datos sugieren que el kikuyo podría tener un mayor potencial para generar ALC en la leche, debido al alto contenido de ácido  $\alpha$  linoléico frente a otras especies. Adicionalmente, al complementar esta información con los datos reportados en Canadá por Boufaied *et al.*, (2003), se observa como la festuca presenta un contenido importante de ácido linoléico c18:3n3 al igual que algunas leguminosas como el lotus y trébol blanco.

**Tabla 4.** Perfil de ácidos grasos de forrajes utilizados en sistemas de producción en Colombia.

Especie	Ácidos grasos (%)					
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2n6	C18:3n3
<sup>a</sup> Ryegrass	2.5	34	4.7	1.5	12.3	45
<sup>a</sup> Alfalfa	3.6	17.5	7.3	22.0	21.1	30.0
<sup>a</sup> Kikuyo	-	15.1	4.8	3.8	22.5	53.8
<sup>a</sup> <i>B. decumbens</i>	4.6	34.4	9.5	14.7	14.4	20.3
<sup>a</sup> Estrella	2.9	27.7	10.6	11.0	21.8	27.9
<sup>b</sup> <i>Festuca arundinacea</i>	0.4	19.5	1.9	4.8	13.5	57.0
<sup>b</sup> Trébol blanco	0.4	17.6	3.0	4.7	15.5	55.6
<sup>b</sup> <i>Lotus corniculatus</i>	0.8	20.2	2.8	6.7	18.7	46.0
<sup>b</sup> Trébol rojo	0.4	18.9	3.6	7.7	23.2	43.2

<sup>a</sup> Grupo de Investigación en Nutrición Animal, sin publicar.

<sup>b</sup> Boufaied and Chouinard, (2003).

En resumen, el contenido de ácidos grasos en la planta y aún más en la pradera, se puede modificar a través de prácticas de manejo y agronómicas para favorecer los contenidos de precursores de ALC en la leche, además las diferencias entre especies representan otra oportunidad para enfocar la alimentación de las vacas con forrajes ricos en precursores de ALC.

## Características de las pasturas y ALC

El efecto de las pasturas en la concentración de ALC en grasa de la leche se ha descrito en varios estudios. Generalmente, la alimentación con forraje aumenta los niveles de grasa y de algunos de sus isómeros comparado ya sea con una ración totalmente mezclada o con forrajes conservados (Dewhurst *et al.*, 2006; Elgersma *et al.*, 2006; Khanal *et al.*, 2007). Dada la importancia de las pasturas sobre el contenido de ácidos grasos en la leche, a continuación se presentan los factores más relevantes que determinan este comportamiento.

### Edad de rebrote

La edad de rebrote modifica la cantidad y la composición de ácidos grasos como se anotó anteriormente. La tabla 1, evidencia como a una menor edad de rebrote existe una mayor cantidad de los ácidos grasos C18:3n3 y C18:2n6, precursores principales para las síntesis de ALC. La alimentación de vacas con forrajes de mayor edad disminuye de manera significativa el contenido de ALC en la leche asociado a una disminución de precursores polinsaturados en la dieta. En la Sabana de Bogotá se encontró que el contenido de ALC en la leche de vacas en pastoreo de kikuyo disminuyó ( $p < 0.01$ ) de 22.4 a 14.4 mg/g de grasa al aumentar la edad de rebrote de 50 a 70 días (Aguilar *et al.*, 2009). Estos resultados están de acuerdo a lo reportado por Ferlay *et al.* (2006) quien reportó una disminución ( $p < 0.01$ ) de 17.2 a 8 mg/g de grasa cuando cambio de 21 a 42 días de rebrote en una pastura nativa conformada por 50% de *Festuca rubra*.

Estos resultados evidencian la manera como se pueden manejar la edad de rebrote de las pasturas para incrementar los contenidos de ALC en la leche, sin embargo, es necesario establecer cuáles son las edades de rebrote adecuadas para incrementar los niveles de ALC en la leche en las diferentes especies utilizadas en la Sabana de Bogotá.

Existe poca información en cuanto a la influencia del tipo de forraje en la composición de la grasa de la leche, sin embargo, como se observa en la tabla 4, hay gran variación entre las diferentes especies en la composición de ácidos grasos, lo que resultaría

en diferentes contenidos de ALC en la leche. En la medida que se determine el perfil de ácidos grasos de las especies utilizadas de manera convencional en los sistemas de producción de leche de la Sabana de Bogotá y su efecto sobre el contenido de ALC en la leche, podemos llegar a recomendaciones precisas sobre las especies y edad de pastoreo ideales para incrementar los niveles de ALC en la leche.

#### *Mezclas de gramíneas y leguminosas*

Recientemente se ha desarrollado un creciente interés en los efectos que tienen la alimentación con pasturas que presentan una composición botánica diversa sobre el contenido de ácidos grasos benéficos en productos de rumiantes (Adnoy *et al.*, 2005). Se reportó que el contenido de ácidos grasos poliinsaturados PUFA en la grasa intramuscular de corderos incrementó al pasar de una pastura monocultivo a una pastura diversa (Adnoy *et al.*, 2005). Además, se mostró cómo la diversidad de las pasturas incrementa los contenidos de ALC en la leche comparados con los niveles encontrados en pasturas puras (Collomb *et al.*, 2006)

El incremento en las proporciones de ALC  $c9t11$  en leche y grasa intramuscular de los rumiantes alimentados con pasturas de una composición botánica diversa se ha asociado con el incremento en el flujo de ácido vaccénico C18:1  $t11$  desde el rumen el cual es principal precursor de la producción endógena de ALC  $c9t11$ . Este efecto se ha asociado a la presencia de algunos metabolitos secundarios que se encuentran en las pasturas diversas, y que se sugieren como potenciales modificadores de la biohidrogenación ruminal (Lourenco *et al.*, 2008). La presencia de compuestos secundarios en las plantas tales como polifenoles y terpenoides pueden inhibir los microorganismos que hidrogenan en el rumen.

En zonas con estaciones, estos compuestos se ven afectados ampliamente por la estación climática debido a cambios asociados a la composición botánica de la pastura. Se ha observado (Fedele *et al.*, 2005) que en invierno cuando en las pasturas predominan las gramíneas la leche es rica en hidrocarburos y alcoholes y en primavera cuando surgen diferentes especies vegetales los compuestos

predominantes son alcoholes y cetonas. Debido a que la composición botánica de la pastura nativa cambia de un dominio de monocotiledóneas (gramíneas) en invierno a un dominio de dicotiledóneas (leguminosas y herbáceas) en primavera, esta variabilidad modifica el contenido de compuestos secundarios en la dieta y se refleja en la presencia de compuestos como alcoholes y sesquiterpenos en la leche (16.280 vs 93.190 ng/g MS y 209 vs 3.332 ng/g MS, respectivamente).

La abundancia de sesquiterpenos en la leche producida bajo pasturas diversas puede confirmar el por qué durante esta estación los quesos tienen un sabor más acentuado.

Lourenco *et al.* (2008) discuten sobre las diferencias en relación a los cambios en la digesta ruminal y duodenal, los cuales incrementan los contenidos de C18:3n3 en leche y grasa intramuscular debido a la alimentación con trébol rojo o blanco y pasturas diversas, sin embargo estos incrementos pueden no ser atribuidos necesariamente al incremento en la oferta de ácido linoléico C18:3-n3 sino a un efecto sobre la fermentación ruminal. Las explicaciones recaen sobre el incremento en el flujo de C18:3n3 desde el rumen debido a la disminución en la lipólisis ruminal, y la literatura genera evidencias sobre el papel de la polifenoloxidasas, la cual es particularmente activa en el trébol rojo (Dewhurst *et al.*, 2003b).

Las dietas con ensilaje de trébol rojo incrementaron la concentración de algunos ácidos grasos benéficos especialmente C18:3-n3 en la grasa de la leche comparada a las dietas con ensilaje de trébol blanco. Esto se confirma con las observaciones de Dewhurst *et al.* (2003a), quienes encontraron un efecto similar sobre el perfil de ácidos grasos a través de la alimentación con ensilaje que incluían trébol rojo. En la tabla 5 se presenta el flujo y la biohidrogenación de diferentes ácidos grasos en el rumen y en la tabla 6 el contenido de ácidos grasos en la leche. En estas tablas se puede observar como la incorporación de trébol rojo modifica la fermentación ruminal y la incorporación de ácidos grasos en la leche, favoreciendo el ácido graso poliinsaturado C18:3-n3 y el ALC.

**Tabla 5.** Flujo y Biohidrogenación de ácidos grasos en el rumen, con ensilajes de diferentes especies.

	Tipos de ensilajes			
	RG	RG+TR	TR	TB
Consumo total ácidos grasos C18 (g/d)	301 <sup>c</sup>	340 <sup>c</sup>	323 <sup>c</sup>	472 <sup>a</sup>
C18:2	98 <sup>ab</sup>	117 <sup>a</sup>	122 <sup>a</sup>	139 <sup>a</sup>
C18:3	84 <sup>b</sup>	99 <sup>b</sup>	77 <sup>c</sup>	203 <sup>a</sup>
Flujo duodeno (g/d)				
C18:0	210	214	202	273
C18:1 t11	16.8 <sup>a</sup>	18.5 <sup>ab</sup>	20.3 <sup>a</sup>	21.5 <sup>a</sup>
C18:2 c9t11	1.8 <sup>c</sup>	2.5 <sup>b</sup>	3.9 <sup>a</sup>	1.7 <sup>c</sup>
C18:2	11.6 <sup>d</sup>	14.3 <sup>c</sup>	17.0 <sup>b</sup>	23.7 <sup>a</sup>
C18:3	4.7 <sup>c</sup>	6.6 <sup>c</sup>	10.4 <sup>b</sup>	14.2 <sup>a</sup>
Biohidrogenación C18:3 (%)	95.2 <sup>a</sup>	93.3 <sup>a</sup>	88.5 <sup>b</sup>	93.3 <sup>a</sup>

RG: Ryegrass, TR: Trébol rojo, TB: Trébol blanco.

<sup>a,b</sup> Medias con letras diferentes en la misma fila son diferentes significativamente  $p < 0.05$ .

Fuente: Dewhurst et al. (2003b).

**Tabla 6.** Contenido de ácidos grasos en la leche con ensilajes de diferentes especies.

	Tipos de ensilajes			
	RG	RG+TR	TR	TB
Leche, kg/d	23.5 <sup>a</sup>	23.7 <sup>a</sup>	25.6 <sup>b</sup>	33.2 <sup>a</sup>
Grasa, %	3.73 <sup>a</sup>	3.67 <sup>a</sup>	3.91 <sup>a</sup>	3.52 <sup>b</sup>
Ácidos grasos leche mg/g de grasa				
C18:2 c9t11	3.7 <sup>b</sup>	4.5 <sup>a</sup>	4.2 <sup>a</sup>	3.4 <sup>b</sup>
C18:1 t11	11.6 <sup>b</sup>	13.8 <sup>a</sup>	13.1 <sup>a</sup>	10.6 <sup>b</sup>
C18:3	0.95 <sup>c</sup>	1.4 <sup>b</sup>	3.0 <sup>a</sup>	1.9 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Medias con letras diferentes en la misma fila son diferentes significativamente  $p < 0.05$ .

RG: Ryegrass, TR: Trébol rojo, TB: Trébol blanco

Fuente: Dewhurst et al. (2003b).

Como se puede apreciar, el papel de un metabolito secundario presente en el trébol rojo desencadena una serie de efectos a nivel ruminal. La polifenol oxidasa está involucrada en la reacción de pardeamiento de las hojas de trébol rojo cuando se cortan o se pican y se expone al aire. Esto inicia el proceso de pardeamiento por oxidación de los fenoles endógenos a quinonas, las cuales contienen sitios electrofilicos. Estos sitios reaccionan con los sitios nucleofilicos de otros compuestos tales como proteína y se ha demostrado que reducen la proteólisis y lipólisis *in silo* (Lee et

al., 2007). La lipólisis medida como la disminución proporcional de los lípidos de membrana fue reducida con el incremento en la actividad de la polifenol oxidasa. La biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados C18:3-n3 y C18:2-n6 fue significativamente más baja con la actividad de la polifenol oxidasa después de 24 horas de incubación 53 y 57% para C18:2 y 65 y 74 para C18:3 respectivamente (Lee et al., 2004).

Otro grupo de metabolitos secundario a los cuales se atribuyen modificaciones en las poblaciones ruminales y por lo tanto cambios en el patrón de fermentación ruminal que puede incrementar el flujo de precursores parcialmente hidrogenados son los taninos. Los taninos han demostrado tener efecto sobre la disminución de cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*, una de las especies más importantes que biohidrogenan en el rumen, pasando de  $1.1 \times 10^6$  a  $1.1 \times 10^5$  cuando se cambió de una dieta compuesta por trébol blanco y ryegrass a una dieta con *Lotus corniculatus* (Min et al., 2002).

La incorporación en la dieta de leguminosas taníferas como el *Lotus* ha demostrado tener efecto sobre el contenido de ácidos grasos benéficos en la leche ya que incrementó las concentraciones de C18:3-n3 de 11 a 15 mg/g de grasa al cambiar de una pastura de Ryegrass a *Lotus corniculatus*. Khiaosa-Ard et al. (2009), utilizando Rusitec encontraron inhibición del último paso de la biohidrogenación ruminal de ácido linoléico por taninos condensados suplementados como 7.89% de la materia seca de la dieta. Esto permitió un incremento significativo en la acumulación de vaccénico en los residuos del alimento comparado con el control. Por esta razón que se plantean las leguminosas taníferas como un nuevo potencial para incrementar los compuestos benéficos en la leche (Shultz et al., 1992)

### Selección de pasturas

En Colombia, es evidente la gran variación en los contenidos de ALC en la leche, esta variación está relacionada de manera importante con las variaciones en la dieta. En los sistemas de producción de leche especializada de la Sabana



de Bogotá, caracterizadas por el uso de pasturas monocultivo de kikuyo y ryegrass no se conoce de manera detallada cómo las estrategias de manejo del pastoreo tales como la edad de rebrote en las diferentes especies pueden modificar el contenido de ALC en la leche. Es evidente que la asociación de gramíneas y leguminosas genera cambios en la fermentación ruminal relacionado con la presencia de metabolitos secundarios en las leguminosas, este hecho plantea la posibilidad de desarrollar asociaciones estratégicas para la Sabana de Bogotá, de acuerdo a las condiciones agroecológicas, que permitan hacer una caracterización del perfil de ácidos grasos en las asociaciones, información que no se dispone actualmente, y evaluar cómo este tipo de pasturas puede modificar el contenido de ácidos grasos en la leche con énfasis en compuestos bioactivos benéficos para la salud humana como lo son los ácidos grasos polinsaturados entre los cuales se encuentra el ALC *c9t11*.

Castro *et al.* (2008), evaluó la calidad nutricional, asociación y palatabilidad de 6 gramíneas para clima frío, seleccionadas por su adaptación al medio y producción de biomasa en la Unidad de Recursos Genéticos Forrajeros de la Universidad Nacional de Colombia. De esta evaluación se han generado una serie de alternativas forrajeras para los sistemas de producción de leche especializada.

El nivel de ALC en la leche producida en pasturas adaptadas a los diferentes sistemas de producción de lechería especializada, y que según la revisión anterior, son pasturas que tendrían potencial para incrementar los niveles de ALC, permiten plantear estrategia para la identificación de nichos de producción de leche con características particulares por la presencia de compuestos benéficos para la salud humana.

## Referencias

Adnoy T, Haug A, Sorheim O, Thomassen MS, Varszegi Z, Eik L. Grazing on mountain pastures – does it affect meat quality in lambs? *Livest Prod Sci* 2005; 94:25-31.

Aguilar OX, Moreno BM, Pabón ML, Carulla JE. Efecto del consumo de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) o raigrás (*Lolium hybridum*) sobre la concentración de ácido linoleico

Las evaluaciones deben iniciar desde el conocimiento de los perfiles de ácidos grasos de las diferentes especies, y así generar un conocimiento adicional de la calidad nutricional de las pasturas, luego, incluir factores de manejo como la edad de rebrote y las diferentes asociaciones gramínea-leguminosa, y concluir con las evaluaciones de los diferentes factores de manejo de las pasturas sobre el perfil de ácidos grasos de la leche.

## Consideraciones finales

El interés general que ha surgido por la presencia de compuestos bioactivos en la grasa de los rumiantes y teniendo en cuenta que los sistemas en pastoreo presentan ventajas comparativas frente a sistemas con raciones totales mezcladas para incrementar los contenidos de estos compuestos se hace necesario adelantar investigaciones que resulten en la generación de estrategias de manejo del pastoreo para optimizar la presencia de ácidos grasos insaturados en leche y carne. Es necesario tener en cuenta las características de adaptación de los forrajes a los diferentes nichos de producción, pues se constituyen en una herramienta fundamental para la selección de nuevas especies forrajeras con capacidad de adaptación y con alto contenido de ácidos grasos insaturados.

La incorporación de leguminosas en pasturas se constituye no sólo en una estrategia para incrementar el contenido de ácidos grasos insaturados en la leche, sino como una alternativa de mitigación del impacto ambiental de los sistemas ganaderos en Colombia a través de la reducción en el uso de fertilizantes nitrogenados, generando un impacto positivo importante sobre la sostenibilidad y rentabilidad del sistema productivo.

conjugado y el perfil de ácidos grasos de la grasa láctea. *Livestock Res Rural Devel* 2009; 21:4.

Aro A, Mannisto S, Salminen I, Ovaskainen ML, Kataja VO, Uusitupa M. Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutr Canc* 2000; 38:151-157.

Bauchart D, Vérité R, Remond 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, Corl BA, Peterson DG. The biology of conjugated linoleic acids in ruminants. En: Advances in conjugated linoleic acid research. vol 2. Champaign IL: AOCS press; 2003. p. 146-173.
- Belury MA, Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. Annual Rev Nutr 2002; 22:505-531.
- Bessa RJ, Santos-silva JJ, Ribeiro MR and Portuga AV. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. Livest Prod Sci 2000; 63:201-211.
- Blas C. Cambios en el perfil de ácidos grasos en productos animales en relación con la alimentación animal y humana. Importancia del ácido linoleico conjugado. I. Rumiantes. XX curso de especialización FEDNA. 2004:79-100.
- Boeckert C, Vlaeminck B, Fievez V, Maignien L, Dijkstra J, Boon N. Accumulation of trans C18:1. Fatty acids in the rumen after dietary algal supplementation is associated with changes in the *Butyrivibrio* community. Appl Environ Microbiol 2008; 74:6923-6930.
- Boufaïed H, Chouinard PG, Tremblay GF, Michaud R, Petit HV, Michaud M, Bélanger G, Fatty acids in forages. I. Factors affecting concentrations. Can J Anim Sci 2003; 83:501-511.
- Castro E, Mojica JE, León JM, Pabón ML, Carulla JE. Productividad de pasturas y producción de leche bovina bajo pastoreo de gramínea y gramínea + *Lotus uliginosus* en Mosquera, Cundinamarca. Rev Med Vet Zoot 2008; 55:9-21.
- Chin SF, Liu W., Storkson JM, Ha YL, 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.
- Chilliard Y, Ferlay A, Doreau M. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cows diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. Livest Prod Sci 2001; 70:31-48.
- Cook ME, Miller CC, Park Y, Pariza MW. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. Poult Sci 1993; 72:1301-1305.
- Corl BA, Baumgard LH, Lance H, Dwyer DA, Griinari JM, Phillips BS and Bauman DE. The role of 9 desaturase in the production of cis-9 trans -11 CLA. J Nutr Biochem 2001; 12:622-630.
- Collomb M, Schmid A, Sieber R, Wechsler D, Ryhanen EL. Conjugated linoleic acid in milk fat: Variation and physiological effects. J Dairy Sci 2006; 16:1347-1361.
- Dewhurst RJ, King PJ. Effects of extended wilting, shading and chemical additives on the fatty acids in laboratory grass silages. Grass Forage Sci 1998; 53:219-224.
- Dewhurst RJ, Scollan ND, Lee MRF, Ougham HJ, Humphreys MO. Forage breeding and management to increase the beneficial fatty acid content of ruminant products. Proc Nutr Soc 2003a; 62:329-336.
- Dewhurst RJ, Evans RT, Scollan ND, Moorby JM, Merry OR, Wilkins RJ. comparison of grass and legume silages for Milk Production. 2. *In vivo* and *in sacco* Evaluations of Rumen Function. J Dairy Sci 2003b; 86:2612-2621.
- Dewhurst RJ, Shingfield KJ, Lee MR, Scollan ND. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. Anim feed sci technol 2006; 131:168.
- Dorland V, Wettstein HR, Aeschlimann G, Leunberger H, Kreuzer M. Preference of dairy cows for ryegrass, white clover and red clover, and its effects on nutrient supply and milk quality. Arch Anim Nutr 2007; 61:371-389.
- Elgersma A, Ellen G, Van der Horst H, Muuse BG, Boer H, Tamminga S. Comparison of the fatty acid composition of fresh and ensiled perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), affected by cultivar and regrowth interval. Anim Feed Sci Technol 2003a; 108:191-205.
- Elgersma A, Tamminga S, Ellen G. Comparison of the effects of grazing and zero-grazing of grass on milk fatty acid composition of dairy cows. Grassland Science in Europe 2003; 8:271-274.
- Elgersma A, Ellen G, Van der Horst H, Muuse BG, Boer H, Tamminga S. Influence of cultivar and cutting date on fatty acids composition of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Grass Forage Sci 2004; 59:104.
- Elgersma A, Tamminga S, Ellen G. Modifying milk composition through forage. Anim Feed Sci Technol 2006; 131:207-225.
- Fedele V, Claps S, Rubino R, Sepe I, Cifuni GF. Volatile compounds in herbage intake by goats in two different grazing seasons. Options Méditerranéennes 2005; Serie A: 67
- Ferlay A, Martin B, Pradel PH, Coulon JB, Chilliard Y. Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in Tarentise and Montbeliarde cow breeds. J Dairy Sci 2006; 89:4026-4041.
- Fukuda S, Suzuki Y, Murai M., Asanuma N, Hino, T. Isolation of a novel strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that isomerizes linoleic acid to conjugated linoleic acid without hydrogenation, and its utilization as a probiotic for animals. J Appl microbiol 2006; 100:787-794.
- Gagliostro GA. Control nutricional del contenido de ácido linoleico conjugado CLA en leche y su presencia en alimentos funcionales naturales. Efectos sobre la salud humana. Rev Arg Prod Anim 2004; 24:113.
- Griinari JM, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nörmela KV, Barman DE. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta$ 9-desaturase. J Nutr 2000; 130:2285-2291.
- Harfoot CG, Hazlewood GP. Lipid metabolism in the rumen. *in* P. N. Hobson. The rumen microbial ecosystem. 1988. Ed Elsevier Applied Science, New York; 1988. p. 285-322.
- Harwood JL. Plant acyl lipids: structure, distribution and analysis. *in* P. K. Stumpf, ed. The biochemistry of plants. Academic Press. New York Vol. 4. NY: 1980. p.2-48.
- Hayek MG, Han SN, Wu D, Watkins BA, Meydani M, Dorsey JL, Smith DE, Meydani SN. Dietary conjugated linoleic

- acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrIBR mice. *J Nutr* 1999;129:32-38.
- Houseknecht KL, Vanden Heuvel JP, Moya-camarena S, Portocarrero CP, Peck IW,p., Nickel KP, Belury MA. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty *falfa* rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 244:678-682.
- Instituto Interamericano de Cooperación Agropecuaria. La agroindustria de lácteos y derivados en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Agrociencias 2006.
- Ip MM, Masso-welch PA, Shoemaker SF, Shea-eaton WK. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. *Exp Cell Res*. 1999; 250:22-34.
- Khanal RC, Dhiman TR, Boman RL. Changes in fatty acid composition of milk from lactating dairy cows during transition to and from pasture. *Livest Sci*. 2007; 114:164-175.
- Khiaosa-Ard R, Bryner DF, Scheeder MRL, Wettstein HR, Leiber F, Kreuzer M, and Soliva CR. Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal  $\alpha$ -inolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *J Dairy Sci* 2009; 92:177-188.
- Kim YJ, Rui L, Bond DR, Russell JB. Effect of Linoleic Acid Concentration on Conjugated Linoleic Acid Production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38 Applied and Environmental Microbiology 2000; 66:5226-5230.
- Ledoux M, Chardigny JM, Darbois M. Fatty acid composition of France butters, with special emphasis on conjugated linoleic acid (CLA) isomers. *J Food Compos Anal* 2005; 18:409-425.
- Lee M, Lorna RF, Parfitt J, Scollan ND, Minchin FR. Lipolysis in red clover with different polyphenol oxidase activities in the presence and absence of rumen fluid. *J Sci Food Agric* 2007; 87:1308-1314.
- Lee MRF, Winters AL, Scollan Nd, Dewhurst RJ, Mkanminchin T. Plant-mediated lipolysis and proteolysis in red clover with different polyphenol oxidase activities. *J Sci Food Agric* 2004; 84:1639-1645.
- Li Y, Seibert MF, Ney DM, Grahn M, Grant AL, Allen AL, Watkins B. Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF-I and IGF binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed (n-6) or (n-3) fatty acids. *J Bone Miner Res* 1999; 14:1153-1162.
- Li Y, Watkins BA. Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin E2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. *Lipids* 1998; 33:417-425.
- Lourenco MG, Van Ranst B, Vlaeminck S, De Smet S, Fievez V. Influence of different dietary forages on the fatty acid composition of rumen digesta as well as ruminant meat and milk. *Anim Feed Sci Technol* 2008; 145:418-437.
- Meřuchová B, Blařko J, Kubinek R, Górová R, Dubravská J, Margetin M and Soják L. Seasonal variations in fatty acid composition of pasture forage plants and CLA content in ewe milk fat *Small Ruminant Research* 2008; 78: 56-65.
- Min B, Attwood G, Reilly K, Sun W, Peters J, Barry T, McNabb W. *Lotus corniculatus* condensed tannins decrease in vivo populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. *Can J Microbiol* 2002; 48:911-21.
- National Research Council Carcinogens and anticarcinogens in the human diet: A comparison of naturally occurring and synthetic substances. Washington: National Academy Press 1996.
- O'Shea M, Devery R, Lawless F, Murphy J, Stanton C. Milk fat conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of human mammary MCF-7 cancer cells. *Anticancer Res* 2000; 20:3591-3601.
- Ostrowska E, Muralitahran M, Cross RF, Bauman DE, Dunshea FR. Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. *J Nutr* 1999; 129:2037-2042.
- Park Y, Albright KJ, Storkson JM, Liu W, Cook ME, Pariza MW, Park YY. Changes in body composition in mice during feeding and withdrawal of conjugated linoleic acid. *Lipids* 1999; 34:243-248.
- Ribeiro CVD, Eastridge JL, Firkins JL, St-Pierre NR, Palmquist DL. Kinetics of Fatty acid biohydrogenation in vitro. *J Dairy Sci* 2007; 90:1405-1416.
- Rico JE, Moreno B, Pabón ML, Carulla J. Composición de la grasa láctea de la sabana de Bogotá con énfasis en ácido ruménico - CLA cis-9, trans-11. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2007; 20:30-39.
- Ritzenthaler K, Michelle K, McGuire RF, Shultz TD, Nairanjana D, McGuire MA, Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *J Nutr* 2001; 131:1548-1554.
- Schonberg S and Krokan HE. The inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives (CLA) of linoleic acid on the growth of human tumor cells lines is in part due to increased lipid peroxidation. *Anticancer Res* 1995; 15:1241-1246.
- Shultz TD, Chew BP, Seaman WR, Luedecke LO. Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and b-carotene on the in vitro growth of human cancer cells. *Cancer Lett* 1992; 63:125-133.
- Turek JJ, Li Y, Schoenlein IA, Allen KGD, Watkins BA. Modulation of macrophage cytokine production by conjugated linoleic acids is influenced by the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio. *J Nutr Biochem* 1998; 9:258-266.
- Turner SA, Waghorn GC, Woodward SL, Thomson NA. Condensed tannins in birdsfoot refoil (*Lotus corniculatus*) affect the detailed composition of milk from dairy cows. *N Z Soc Anim Prod* 2005; 65:283-289.
- Vandorland B, Wettstein H, Aechlimann G, Leuenberger H, Kreuzer M. Preference of dairy cows for ryegrass, white clover and red clover, and its effects on nutrient supply and milk quality. *Arch Anim Nutr* 2007; 61:371-389.
- Varadyova Z, Kisidayova S., Siroka P, Dusan JAL. 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.
- Witkowska IM, Wever C, Gort G, and Elgersman A. Effects of Nitrogen rate and regrowth interval on perennial ryegrass fatty acid content during the growing season. *Agron J* 2008;100:1371.