

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN LECHE DE VACAS ALIMENTADAS CON
RACIONES TOTALMENTE MEZCLADAS Y DIFERENTES TIEMPOS DE
PASTOREO DURANTE LA LACTANCIA TEMPRANA**

por

Mauricio BENTANCOR CAMEJO

TESIS DE GRADO, presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, inspección, control y
tecnología de los alimentos de origen animal

ENSAYO EXPERIMENTAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2017**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:

Dra. Carolina Fiol

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Joaquín Barca

Tercer Miembro:

Dr. Juan P. Damián

Cuarto Miembro:

Dra. Ana Meikle

Quinto Miembro:

Q. F. Laura Olazabal

Autor:

Br. Mauricio Bentancor

Fecha: 8 de Agosto de 2017

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres y hermana.
- Al Dr. Joaquín Barca.
- A las co-tutoras de tesis Dra. Ana Meikle y Q. F. Laura Olazabal.
- Al Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Página de aprobación.....	2
Agradecimientos.....	3
Lista de tablas y figuras.....	5
Resumen.....	6
Summary.....	7
Introducción	
a) La lechería en Uruguay.....	8
b) Calidad de la leche.....	9
c) Ácidos grasos de interés específico.....	9
d) Composición de la leche.....	10
e) Síntesis de la grasa láctea.....	12
f) Factores que influyen en el perfil de ácidos grasos	
I. Genética.....	16
II. Momento de la lactancia.....	17
III. Alimentación	
a) Estudios en estabulación con diferentes suplementos.....	17
b) Estudios en pastoreo con suplementación.....	18
c) Uso de pasturas y Dietas Totalmente Mezcladas.....	18
Hipótesis.....	19
Objetivos.....	19
Materiales y métodos	
a) Manejo animal y parto.....	20
b) Diseño experimental y tratamientos	
I. Grupo 0.....	20
II. Grupo 1.....	20
III. Grupo 2.....	20
c) Pastura.....	21
d) Mediciones experimentales y análisis de muestras	
I. Mediciones en los animales.....	21
II. Determinación del perfil de ácidos grasos en leche y alimentos....	21
e) Análisis estadístico.....	23
Resultados.....	24
Discusión.....	27
Conclusión.....	30
Referencias bibliográficas.....	31

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

	Pág.
Tabla 1. Perfil de ácidos grasos promedio en la leche bovina. Adaptado de Moate et al. (2007).....	12
Tabla 2. Composición química y perfil de ácidos grasos de la Dieta Totalmente Mezclada (DTM) y pastura.....	22
Tabla 3. Producción y composición de leche de vacas alimentadas con Dieta Totalmente Mezclada (G0), 50% Dieta Totalmente Mezclada (DTM) y 6 h de acceso a pastoreo en una sesión (G1), 50% DTM y 9 h de acceso a pastoreo en dos sesiones (G2) a los 45 días posparto.....	24
Tabla 4. Componentes de ácidos grasos de vacas alimentadas con Dieta Totalmente Mezclada (G0), 50% Dieta Totalmente Mezclada (DTM) y 6 h de acceso a pastoreo en una sesión (G1), 50% DTM y 9 h de acceso a pastoreo en dos sesiones (G2) a los 45 días posparto.....	25
Tabla 5. Perfil de ácidos grasos de vacas alimentadas con Dieta Totalmente Mezclada (G0), 50% Dieta Totalmente Mezclada (DTM) y 6 h de acceso a pastoreo en una sesión (G1), 50% DTM y 9 h de acceso a pastoreo en dos sesiones (G2) a los 45 días posparto.....	26

Figuras

	Pág.
Figura 1. Biohidrogenación ruminal del ácido linoleico. Adaptado de Palmquist et al. (2005).....	14
Figura 2. Biohidrogenación ruminal del ácido linolénico. Adaptado de Palmquist et al. (2005).....	15
Figura 3. Rol de la $\Delta 9$ desaturasa en la síntesis de C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 (CLA) en la glándula mamaria. Adaptado de Bauman y Griinari (2003).....	16

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la alimentación a los 47 ± 12 días posparto (DPP) en vacas sometidas a un sistema mixto, basado en el uso de dieta totalmente mezclada (DTM) y distintas estrategias de pastoreo vs. DTM exclusivamente sobre el perfil de ácidos grasos (AG) en leche. Se seleccionaron vacas Holstein multíparas ($n=27$) que fueron bloqueadas acorde a la fecha probable de parto, paridad y condición corporal y asignadas a tres manejos nutricionales desde el parto por 60 DPP: alimentación *ad libitum* con DTM exclusivamente (G0; $n=9$), DTM y 6 h de acceso al pastoreo en una sesión (G1; $n=10$) o DTM y 9 h de acceso al pastoreo en dos sesiones (G2; $n=8$). Los tres tratamientos accedieron a la misma oferta de materia seca (MS) diaria, lo que difirió fue la fuente (DTM+pastoreo vs. DTM); para los grupos G1 y G2 la dieta ofrecida fue 50% de la pastura y 50% DTM y difirieron únicamente en el tiempo de pastoreo (6 vs. 9 h). El perfil de AG se determinó en leche a los 47 ± 12 DPP por un cromatógrafo gaseoso conectado a un espectrómetro de masa. La producción de leche y grasa no fue diferente entre los tratamientos. La fracción de AG *de novo* en la grasa láctea fue mayor para los grupos G0 y G1 que para el grupo G2 ($p=0.004$). La fracción de AG preformados fue mayor (27%) para el grupo G2 que para G0 ($p=0.045$), mientras que no se encontraron diferencias entre estos y el grupo G1. El contenido de ácido esteárico (C18:0) fue un 30% mayor en G2 que en G0 y G1 ($p=0.009$). No hubieron diferencias en el contenido de ácido linoleico conjugado (CLA; $p=0.12$), mientras que su precursor, el ácido *trans*-vaccénico (C18:1*trans*) fue el doble en los tratamientos pastoriles que en G0 ($p < 0.001$). La fracción de AG omega-3 fue mayor para los grupos que incluyeron pastura que para G0 ($p=0.005$), mientras que la fracción omega-6 fue superior en el grupo G0 que en G1 y G2 ($p < 0.001$). Esto generó que la relación $n6/n3$ fuera casi tres veces mayor en el grupo G0 que en los tratamientos pastoriles ($p < 0.001$). Ofertando un 50% de la dieta a partir de pasturas desde el inicio de la lactancia, se logró modificar el perfil de AG de la leche, incrementándose aquellas fracciones que son de interés para la salud humana. A su vez, el incremento en el consumo de pasto mediante un aumento en las horas de pastoreo modificó el perfil de AG mejorando aún más desde un punto de vista saludable.

SUMMARY

The objective of this study was to study the effect of nutrition at 47 ± 12 days postpartum (DPP) in dairy cows under a mixed system, based on the use of total mixed rations (TMR) and different strategies of grazing vs. TMR exclusively on the fatty acid (FA) profile in milk. Multiparous Holstein ($n = 27$) were selected and blocked according to expected calving date, parity and body condition score and assigned to three different nutritional strategies from calving to 60 DPP: accessed to a TMR *ad libitum* (G0), TMR and 6h of access time to pasture in one grazing session (G1) or TMR and 9h of access time to pasture in two sessions (G2). The three treatments G0, G1 and G2 accessed daily to the same offer of total DM differing on the diet source (TMR + pasture vs. TMR): G0 accessed to a TMR *ad libitum*, G1 and G2 accessed daily to 50% of the DM offered as pasture and 50% as TMR, differing only on the access time to paddocks (6 vs. 9 h per day). Milk FA profile at 47 ± 12 DPP was quantified using a gas chromatograph connected to a mass spectrometer. Milk and fat production did not differ between treatments. De novo FA in milk fat were greater for G0 and G1 than G2 cows. Preformed FA in milk fat at 47 ± 12 DIM were greater (+27%) for G2 than G0 cows ($p < 0.05$), while no differences between these groups and G1 were found. Stearic acid (C18:0) was 30% greater for G2 than both, G0 and G1 cows. Conjugated linoleic acid (CLA) contents in milk did not differ ($p < 0.12$), while vaccenic acid (C18:1) was 2-fold greater for grazing treatments than G0 cows ($p < 0.001$). Linolenic acid [C18:3(n-3)] was greatest for G2 cows and lowest for G0 cows ($p < 0.001$). In contrast, n-6 FA were greater for G0 than grazing cows, mainly due to linoleic acid [18:2cis(n-6)]. These results determined that n-6/n-3 FA ratio in milk was almost three times greater for G0 than G1 and G2 cows ($p < 0.001$). Offering a 50% of the diet from pasture from the start of lactation, allowed to modify the milk FA profile, increasing fractions of specific interest for human health. At the same time, increasing the time of access to pasture modified the milk FA profile improving even more from a healthy point of view.

INTRODUCCIÓN

a) La lechería en Uruguay

La lechería uruguaya ha crecido a un ritmo sostenido durante las tres décadas anteriores. El 70% de la leche producida en Uruguay es exportada, siendo la leche en polvo y queso los productos con más venta (70% y 20% respectivamente; DIEA, 2016). Esto transforma a nuestro país en un exportador de lácteos y por lo tanto la cantidad y calidad de sus sólidos son fundamentales a la hora de competir con otros sistemas.

En la última década creció en torno al 30%, con tasas anuales en los últimos años del 7% (DIEA, 2016). Este marcado incremento se explica por un aumento productivo a nivel individual (litros producidos por vaca) y en menor medida por un incremento en la carga animal (Chilibroste et al., 2012). Esta tendencia ha generado que en las últimas dos décadas la remisión a plantas procesadoras de leche haya aumentado un 50%. A su vez, en el mismo período de tiempo, el área destinada a la lechería ha disminuido cerca del 60% y el número de productores remitentes en un 15% (DIEA, 2016). Esta marcada intensificación de la lechería, ha sido acompañada con cambios en la alimentación del ganado, con una mayor utilización de concentrados y de reservas forrajeras (ensilados y fardos; DIEA, 2016), mientras que el pastoreo directo ha disminuido. No obstante, la participación del pastoreo en los sistemas de producción de leche uruguayos sigue siendo clave para su competitividad (Chilibroste et al., 2011).

Uruguay presenta uno de los costos de producción de leche más bajos a nivel internacional, explicado mayoritariamente por su base pastoril (Chilibroste, 2011). El uso de pasturas como base nutricional del ganado lechero ha sido cuestionado, ya que el consumo de materia seca se ve limitado y por lo tanto los animales no logran expresar su potencial genético (Kolver y Muller, 1998; Chilibroste et al., 2012). Se ha reportado que la producción de leche en sistemas basados en dieta totalmente mezclada (DTM), es mayor que en aquellos exclusivamente pastoriles (Bargo et al., 2002). En los sistemas de producción uruguayos se ha reportado un desequilibrio entre los aportes y requerimientos de nutrientes debido a la estacionalidad de la producción de pasto y los partos del rodeo (Chilibroste et al., 2002; Naya et al., 2002; Chilibroste et al., 2011). Frente a esta problemática, se han llevado a cabo algunos trabajos en nuestro país donde se ha evaluado la suplementación con DTM, principalmente en lactancia temprana. Estos trabajos han reportado mejoras productivas que varían entre un 5% y un 24% (Acosta et al., 2010; Meikle et al., 2012; Fajardo et al., 2012).

Si bien se ha reportado de forma sólida el impacto de la inclusión de DTM en sistemas pastoriles en términos productivos, no hemos encontrado información en cuanto al efecto del uso de estrategias de alimentación mixtas y/o tiempo de pastoreo sobre el perfil de AG en leche.

b) Calidad de la leche

La leche es un alimento de gran consumo e históricamente la industria láctea se ha focalizado en la valorización e innovación de productos por las propiedades de algunos componentes lácteos en la promoción de aspectos saludables de la leche (Bauman et al., 2006). Generalizando, la investigación nacional respecto a calidad composicional de leche se ha limitado a los términos porcentuales de los grandes componentes (proteína y grasa), siendo escasa la información generada en cuanto al perfil de AG en la leche (Artegoitia et al., 2013; Mendoza et al., 2016). En el mercado uruguayo, actualmente existen productos fortificados con algunos de estos componentes pero el proceso de producción es netamente industrial. Cabe destacar que aquellas estrategias donde se usa el agregado de alguna sustancia, van en contra de la imagen de “Uruguay Natural” (decreto N° 328029) y deja de lado el potencial que tienen los sistemas pastoriles dentro de este marco. A nivel mundial existe una creciente demanda de alimentos orgánicos, siendo la inclusión de pasto en la alimentación de los animales un punto valorado en estos sistemas (Schwendel et al., 2015). En Estados Unidos este mercado ha mostrado un crecimiento anual de un 15 a un 21% desde 1997 al 2007 (Croissant et al., 2007).

Generar información respecto de cómo se afecta la calidad de leche es de gran interés tanto para la salud de los consumidores así como para el posicionamiento de Uruguay como país exportador de lácteos frente a un mercado internacional competitivo y fluctuante. En este encuadre productivo, es necesario determinar cómo afecta el modelo de intensificación de la lechería nacional a la calidad del producto.

c) Ácidos grasos de interés específico

La leche posee ciertos compuestos denominados “bioactivos”, los cuales presentan propiedades nutraceuticas (i.g. beneficios para la salud del consumidor más allá de lo nutricional). Tal es el caso de los AG poliinsaturados (PUFA), CLA y los AG omega-3. A estos se les ha atribuido propiedades como anti cancerígeno, antihipertensivo, fortalecedor del sistema inmune, efecto antidiabético, mejorador de la mineralización ósea, preventivos de enfermedades cardiovasculares y también por poseer efectos positivos frente a la enfermedad de Alzheimer y la artritis reumatoidea (Bauman et al., 2006; Markiewicz-Keszycka et al., 2013; Bimbo et al., 2017). La dosis diaria recomendada de CLA para tales efectos es aproximadamente entre 3 y 5g/d (McGuire y McGuire, 2000; Pariza, 2004; Whigham et al., 2007), mientras que la relación omega-6/omega-3 óptima para la salud es 4/1 (Simopoulos, 2008).

Por otro lado, la grasa láctea presenta una importante cantidad de AG saturados (SFA; 70% aproximadamente), lo que poblacionalmente, se asocia con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Con respecto a esto Bauman et al. (2006) han señalado que los SFA de la leche difieren en sus propiedades y muchos de ellos no

presentan efectos negativos sobre la salud del consumidor. Los AG de cadena corta como el butírico (C4:0), caprílico (C8:0) y caproico (C10:0) presentan actividades benéficas, como anti cancerígena, antiviral y antibacteriana (Bauman et al., 2006). Los AG láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0), son los contraindicados desde un punto de vista de la salud humana ya que incrementan las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y disminuyen las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el consumidor, generando un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares (Haug et al., 2007). Los AG con configuración *trans* también han sido asociados a afecciones cardíacas, ya que incrementan las LDL a nivel sanguíneo (Haug et al., 2007). Sin embargo, en el caso de la leche la fracción *trans* está representada mayoritariamente por el C18:1*trans*-11, el cual no presenta efectos adversos, e incluso algunos autores lo han categorizado como beneficioso para la salud humana (Jutzeler van Wijlen y Colombani, 2010).

Los sistemas de producción de base pastoril o que incorporan pasturas en la alimentación, han sido relacionados con la obtención de leche con perfiles de AG beneficiosos para la salud del consumidor. Algunos estudios demuestran que la utilización de pasto en la dieta de los animales incrementa las concentraciones de CLA, PUFA (Schroeder et al., 2003; Couvreur et al., 2006; Croissant et al., 2007) y la fracción de AG omega-3 (Morales-Almaráz et al., 2010). En este sentido, Mendoza et al. (2016) y Pastorini (2016) reportaron que la utilización de DTM y pasto cortado (frente a DTM exclusivamente) mejoró el perfil de AG desde un punto de vista de la salud humana.

En Uruguay la calidad de leche (por la que se paga al productor a nivel primario) está definida por el porcentaje de los principales componentes (grasa y proteína) y por su aspecto higiénico-sanitario (recuento bacteriano y de células somáticas). No existe a nivel primario un sistema de trabajo que persiga la maximización de compuestos nutraceuticos en forma natural o que bonifique a los productores por el uso del pastoreo, tal como sucede actualmente en algunas partes de mundo (The Global Dairy, 2015). A su vez, la base pastoril que presenta la lechería uruguaya, constituye un potencial para la obtención de leche de mejor calidad para la salud humana.

d) Composición de la leche

Según el Reglamento Bromatológico Nacional (Dec. 315/994) se entiende por leche al producto de la secreción mamaria natural de vacas lecheras, obtenido por uno o varios ordeños sin la adición o sustracción alguna. El ordeño debe ser total e ininterrumpido, de animales sanos, adecuadamente nutridos y no fatigados. La recolección debe ser higiénica y sin la presencia de calostro.

La leche es un líquido secretado por la glándula mamaria de las hembras de los mamíferos luego del nacimiento de la cría, la cual presenta una composición compleja. El agua es el componente mayoritario (87%) de la leche, dando soporte físico a los demás componentes y define su estado líquido. El principal carbohidrato

de la leche es la lactosa, su principal origen está en la glucosa sanguínea; el tejido mamario la isomeriza a D- galactosa y la liga a un resto de glucosa mediante un enlace beta-1,4 glicosídico, el cual une el grupo aldehídico de la galactosa con el grupo C-4 de la glucosa (Forsyth, 1989). La lactosa es el componente responsable del 50% de la presión osmótica de la leche y esta propiedad define el volumen producido (Cant et al., 2002). Además, la leche contiene trazas de otros carbohidratos los cuales no son polisacáridos. También se encuentran compuestos como las hexosaminas y el ácido N-acetilneuramínico los cuales están unidos a proteínas y cerebrósidos. Las caseínas representan el 80% del total de las proteínas de la leche, mientras que las proteínas del lactosuero un 20%. Dentro de este último grupo las más abundantes son las albúminas y globulinas (Walstra et al., 2001). Los minerales principales son potasio, sodio, calcio, magnesio, cloro y fosfato. A su vez en menor medida se encuentran trazas de yodo, cobre, zinc y manganeso. Dentro de los ácidos orgánicos el citrato y el acetato son los más abundantes. La leche presenta enzimas, muchas de las cuales son sintetizadas en la glándula mamaria. Además, se pueden hallar enzimas de origen microbiano como las proteinasas y lipasas. Otras enzimas con actividad en la leche son la lizosima, fosfatasa y lactoperoxidasa. Las vitaminas más abundantes son el ácido ascórbico, riboflavina, tocoferoles y niacina. La leche también contiene gases disueltos, como el anhídrido carbónico, nitrógeno y oxígeno (Alais, 1985).

La materia grasa de la leche se dispone en forma de pequeñas gotas de grasa (glóbulos de grasa) en forma de emulsión en agua. Los lípidos son ésteres de AG solubles en solventes orgánicos no polares e insolubles en agua. Un AG es una molécula formada por una cadena hidrocarbonada lineal en cuyos extremos hay un grupo carboxilo y un grupo metilo. En la leche bovina los AG más abundantes son el C14:0, C16:0, C18:0 y oleico (C18:1 *cis*; Tabla 1). Aproximadamente el 98% de la grasa de la leche es una mezcla de triacilglicéridos (TAG), los cuales están formados por una molécula de glicerol y tres AG. También se encuentran disueltos otros lípidos, algunos en cantidades trazas y en su mayoría formando parte del glóbulo graso como los fosfolípidos.

Los AG pueden clasificarse de diferentes maneras. Una de ellas es por el largo de la cadena carbonada; los que presentan entre 4 a 12 carbonos son de cadena corta, entre 14 a 16 son de cadena media y los que poseen entre 18 a 22 átomos de carbono son de cadena larga (Chilliard et al., 2000). Por el número de dobles enlaces o por el grado de insaturación; aquellos que no presentan dobles enlaces (saturados) o los que presentan dobles enlaces (insaturados). Estos últimos se pueden clasificar en monoinsaturados (un doble enlace) y poliinsaturados (más de 2 dobles enlaces). Para denominar a los AG se comienza con el número total de carbonos seguido por dos puntos y la cantidad de dobles enlaces conjuntamente con el número del carbono que contiene el primer doble enlace contando a partir del extremo carboxilo. Dependiendo del lugar donde se encuentre el primer doble enlace con respecto al carbono que contiene el grupo metilo, los AG se pueden clasificar

en omega-3, 6 y 9. Cada uno de los dobles enlaces puede configurarse en una posición *cis* o *trans*; en la *cis* el AG tiene los átomos de hidrógeno en el mismo lado del doble enlace, mientras que en la configuración *trans* se sitúan en lados diferentes (Walstra et al., 2001).

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos (Media y EEM en la leche bovina). Adaptado de Moate et al. (2007).

Ácidos grasos (g/100g)	Media (g/100g)	EEM
C4:0	3.13	0.68
C6:0	1.94	0.52
C8:0	1.17	0.35
C10:0	2.48	0.73
C12:0	2.99	0.85
C14:0	10.38	1.71
C14:1	1.08	0.36
C15:0	1.05	0.33
C16:0	25.18	4.98
C16:1	1.73	0.63
C17:0	0.73	0.35
C18:0	10.51	3.59
C18:1 <i>cis</i>	20.5	5.35
C18:1 <i>trans</i>	4.25	2.63
C18:2 <i>cis</i> (n-6)	3.11	2.13
C18:2 CLA	1.03	0.66
C18:3(n-3)	0.59	0.36
C20:5	0.1	0.11
C22:6	0.07	0.07
Saturados	58.83	16.89
Monoinsaturados	27.56	8.97
Poliinsaturados	4.9	3.33

CLA: Ácido linoleico conjugado

EEM: Error estándar de la media

e) Síntesis de la grasa láctea

Los AG encontrados en la leche son originados de 4 formas o vías distintas: dietarios, generados en el rumen, liberados de reservas corporales y sintetizados *de novo* en la glándula mamaria.

Los AG dietarios o pertenecientes a la dieta son aquellos que ingresan al organismo y no sufren transformaciones a nivel ruminal (Bauman y Grinarii, 2001). Los mismos son absorbidos a nivel intestinal y transportados como TAG en complejos de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y captados por el tejido mamario mediante la acción de la enzima lipasa lipoproteica. El ácido linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) son los mayoritarios en la dieta de la vaca lechera. El C18:2 está

presente en ensilajes y granos de cereales mayoritariamente, mientras que el C18:3 es mucho más abundante en forrajes (Palmquist, 1991). Chilliard et al. (2000) han señalado que el 8% del C18:2 y el 20% del C18:3 pasan hacia el intestino sin sufrir modificaciones a nivel ruminal siendo absorbidos como tales en la glándula mamaria.

Sin embargo, la gran mayoría de los AG ingeridos son modificados a nivel ruminal mediante un proceso denominado biohidrogenación o degradación bacteriana. Este mecanismo transforma los AG insaturados (UFA) provenientes de la dieta a SFA. Palmquist et al. (2005) han sugerido que esta transformación se origina para eliminar el efecto tóxico de los UFA sobre el crecimiento bacteriano. Previamente a la biohidrogenación los TAG, glicolípidos y fosfolípidos que ingresan al rumen, sufren una hidrólisis de sus enlaces ésteres (lipólisis), por medio de las lipasas bacterianas principalmente (Chilliard et al., 2000). Harrfot et al. (1973) han reportado a este fenómeno como el factor limitante de la biohidrogenación. *Anaerovibrio lipolytica* es la bacteria ruminal con más actividad lipolítica sobre los TAG, mientras que *Butyrivibrio fibrisolvens* tiene actividad frente a los fosfolípidos y glicolípidos (Harrfot y Harzlewood, 1988). Se han descrito otros géneros bacterianos, enzimas lipolíticas de protozoarios ruminales, enzimas provenientes de la saliva de los animales y de las propias plantas que contribuyen al proceso lipolítico (Palmquist et al., 2005).

Kemp y Lander (1984) agruparon los microorganismos ruminales en dos grupos, A y B, dependiendo de las reacciones y productos que ellos generan. El proceso de biohidrogenación comienza con la isomerización de los principales PUFA presentes en la dieta, el C18:2 y C18:3. Las modificaciones ruminales que estos sufren (isomerización e hidrogenación) son presentadas en las Figuras 1 y 2.

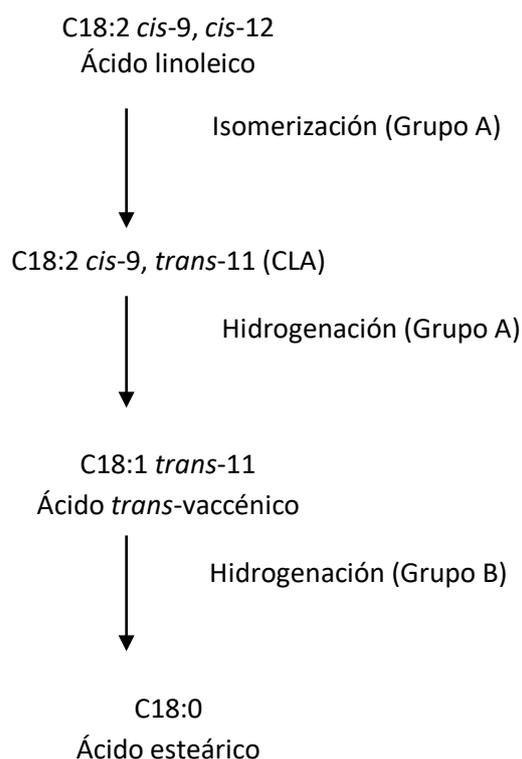


Figura 1. Biohidrogenación ruminal del ácido linoleico. Adaptado de Palmquist et al. (2005).

Tanto el C18:2 como el C18:3 sufren procesos de isomerización e hidrogenación en el rumen que generan los cambios hasta el producto final, el SFA C18:0. Es importante destacar que en este proceso, el paso que ocurre a menor velocidad es la hidrogenación del C18:1 que lo transforma a C18:0 y es por esta razón que el primero se acumula en el rumen. Éste llega al duodeno, donde es absorbido (Chilliard et al., 2000). A su vez y dado que el proceso de biohidrogenación no es completo en ninguno de sus niveles, existe salida de los compuestos intermedios, tales como el CLA y el C18:1 *trans* (Palmquist et al., 2005). Solo el 10% del contenido total de CLA en leche deriva del rumen y sus procesos de biohidrogenación incompletos, el restante 90%, es sintetizado en la glándula mamaria (Kay et al., 2004) a partir del C18:1 *trans* mediante la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa (Figura 3). Esta enzima tiene mayor actividad sobre el C18:0 y en segundo lugar por el C18:1, presentando poca actividad por aquellos ácidos grasos \leq C16:0. Esto explica la gran proporción de SFA de cadena corta y media presentes en la leche (Chilliard et al., 2000; Corl et al., 2001).

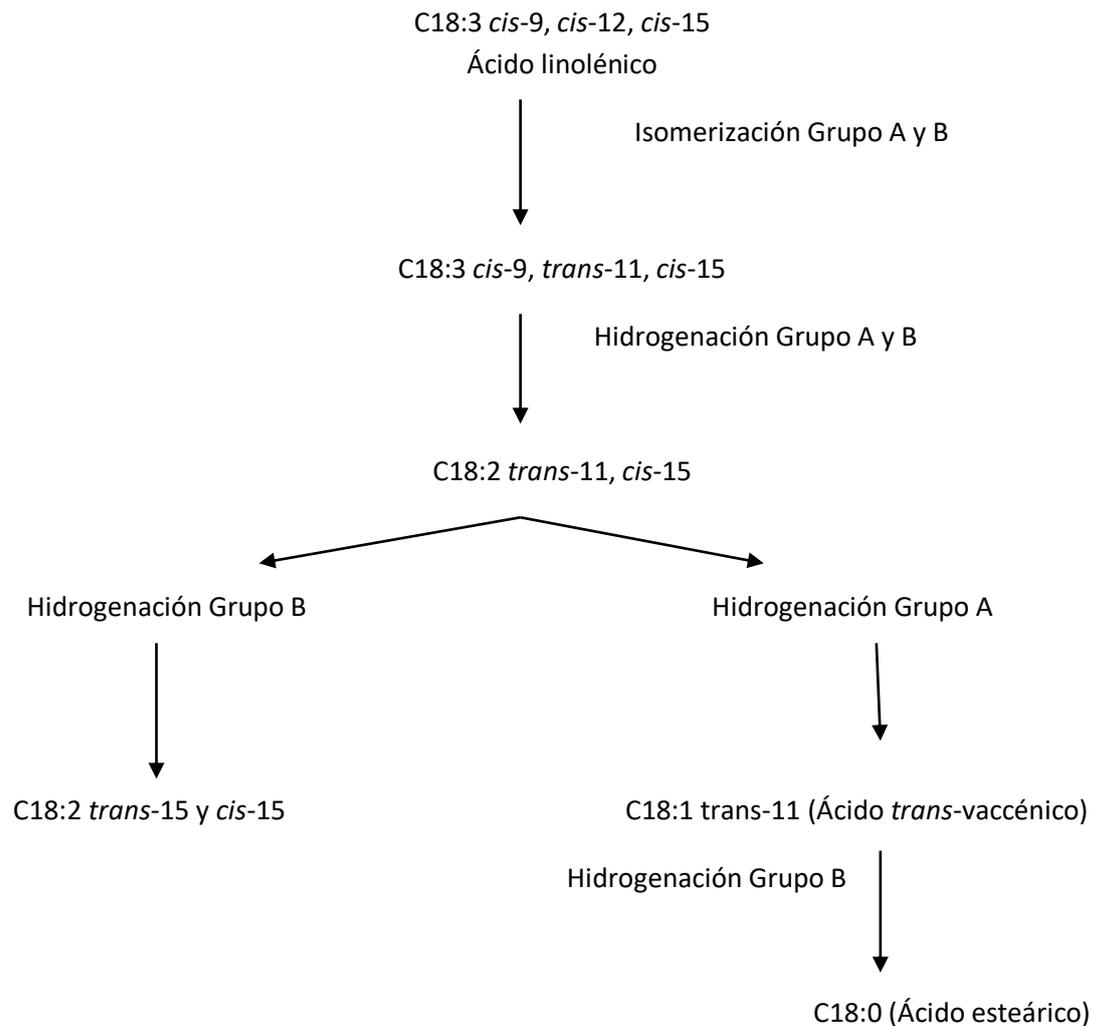


Figura 2. Biohidrogenación ruminal del ácido linolénico. Adaptado de Palmquist et al. (2005).

La grasa o tejido adiposo es una forma de tejido conjuntivo especializado en el almacenamiento de lípidos, principalmente en forma de TAG, y representa el principal reservorio de energía. Según Rukkwamsuk et al. (2000) el C16:0, C18:0 y C18:1 *cis* son los AG más abundantes en las reservas grasas de los rumiantes. En períodos con déficit energético como ocurre en el posparto (Nielsen y Jakobsen, 1994), se produce una lipólisis (o hidrólisis) de los TAG de las reservas corporales, estimulada por hormonas catabólicas. Esto conduce a una liberación de AG no esterificados (NEFA) y glicerol al torrente sanguíneo, los cuales son utilizados para cubrir necesidades energéticas (Palmquist et al., 1993). Estos compuestos son captados por la glándula mamaria y secretados en leche (Rukkwamsuk et al., 2000).

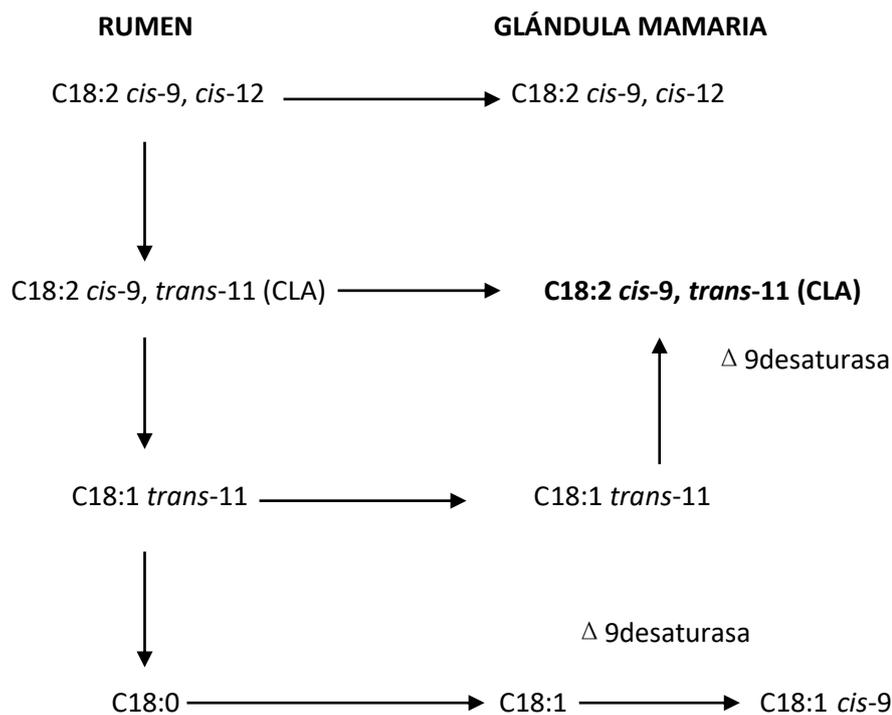


Figura 3. Rol de la $\Delta 9$ desaturasa en la síntesis de C18:2 *cis*-9, *trans*-11 (CLA) en la glándula mamaria. Adaptado de Bauman y Griinari (2003).

En los rumiantes el acetato y el beta-hidroxibutirato son las fuentes de carbono primarias utilizadas en la síntesis de AG *de novo* en la glándula mamaria. Éstos derivan de la fermentación ruminal de carbohidratos y proteínas (Jenkins, 1993). En el tejido mamario, mediante la actividad de la acetil-CoA sintasa, el acetato es convertido a acetil-CoA, principal sustrato para la síntesis de AG. Posteriormente, el acetil-CoA es transformado a malonil-CoA por la actividad de la acetil-CoA carboxilasa (ACC). Por último el malonil-CoA es condensado con otra molécula de acetil-CoA o butiril-CoA por medio de la AG sintasa (FAS) para iniciar la formación de los AG. El glicerol necesario para la esterificación de los AG, llega como tal a la glándula mamaria o puede derivar de la glucosa sanguínea. En el citoplasma del lactocito se da origen a todos los AG de cadena corta y aproximadamente el 50% de los de cadena media (Bauman y Griinari, 2001).

f) Factores que influyen en el perfil de ácidos grasos

I. Genética

La mejora genética constituye uno de los pilares básicos en la producción animal. En lechería ha sido fuertemente utilizada para incrementar no solo la producción sino también el contenido graso de la leche. Sin embargo, esto genera un perfil de AG particular. Karijord et al. (1982) informaron una correlación genética positiva entre las proporciones de AG de cadena corta y media (C4:0-C16:0) y la cantidad de grasa de la leche, mientras que la correlación fue negativa para los AG de cadena larga. Más allá de la selección genética existen diferencias naturales entre razas en cuanto al perfil de AG. Palmquist et al. (1993) reportaron que en la raza Jersey la proporción

de AG de cadena corta es de 8% a 42% mayor que en la raza Holstein independientemente de la dieta. La cantidad de C18:0 fue un 13% mayor en Jersey, mientras que el C18:1 se encuentra en mayor cantidad en vacas Holstein (Palmquist et al., 1993).

II. Momento de la Lactancia

El balance energético negativo que presentan los animales al inicio de la lactancia genera una movilización de las reservas corporales, lo que incorpora AG de cadena larga a la grasa láctea. Conjuntamente, la incorporación de estos tiene un efecto inhibitorio sobre la síntesis de AG *de novo* en la glándula mamaria (Chilliard et al., 2000). El incremento de los AG de cadena corta y media se inicia aproximadamente entre la cuarta y sexta semana posterior al parto cuando decrece la movilización de reservas y alcanza su máximo en la octava semana de lactación (Palmquist et al., 1993).

III. Alimentación

a. Estudios en estabulación con diferentes suplementos

Dhiman et al. (2000) estudiaron el uso de aceites vegetales como suplemento en la dieta de los animales. Principalmente productos con concentraciones elevadas de C18:2 y C18:3, tales como el aceite de soja y el aceite de linaza. Estos autores concluyeron que la utilización de este tipo de suplementos genera una menor producción de grasa en la leche, pero incrementa el contenido de CLA, generando un perfil de AG beneficioso para la salud humana. Investigaciones posteriores por parte de Chouinard et al. (2001) y Looor et al. (2005) demostraron hallazgos similares, en donde la utilización de aceite de linaza incrementó el contenido de CLA en la leche. Gao et al. (2009) suplementando, reportaron nuevamente un incremento de CLA, conjuntamente con un aumento de AG monoinsaturados (MUFA), PUFA y AG omega-3. El aceite de pescado presenta gran cantidad de UFA, principalmente en C18:1, C18:2, C18:3 y AG omega-3. Su uso en conjunto con semillas de girasol y lino acentúa las concentraciones de CLA en la leche, debido principalmente a un incremento de C18:1 *trans* en el rumen. La incorporación de aceite de pescado no afecta la producción de leche, aunque la cantidad de grasa en la misma se ve disminuida (Donovan et al., 2000; Chouinard et al., 2001; AbuGhazaleh et al., 2003).

Otros suplementos que se han desarrollado y evaluado en sistemas estabulados son las sales de UFA. Este tipo de grasa, en la que se produce una saponificación de los AG con calcio, es resistente en gran medida a la degradación bacteriana en el rumen, mejorando su absorción a nivel intestinal (Piperova et al., 2004; Jenkins y McGuire, 2006).

Como se puede ver existe gran cantidad de información generada en sistemas estabulados y con suplementación de distinta naturaleza, lo que contrasta con la

poca atención que se ha puesto al uso de pasturas como posible mejorador del perfil de AG (Dewhurst et al., 2006).

b. Estudios en pastoreo con suplementación

El aceite de pescado también ha sido utilizado y estudiado en vacas en pastoreo. Con respecto a esto, AbuGhazaleh y Holmes (2007) demostraron que su utilización conjuntamente con aceite de girasol mejora notoriamente las concentraciones de CLA, sin alterarse la producción de leche y de grasa. Flowers et al. (2008) suplementando vacas en pastoreo con aceite de linaza lograron aumentar la cantidad de CLA sin resentir la producción de leche. Zunong et al. (2009) reportaron resultados similares pero con la utilización de ensilado de pulpa de papa.

c. Uso de pasturas y Dietas Totalmente Mezcladas

La utilización de pasturas como base de alimentación genera una mejora en las concentraciones de MUFA, PUFA, CLA y de compuestos intermedios de la biohidrogenación como el C18:1 *trans* cuando es comparada con estrategias basadas en DTM (Ellis et al., 2006; Croissant et al., 2007). También se ha reportado una relación de omega-6/omega-3 menor en animales en pastoreo comparados con DTM (Ellis et al., 2006). Con respecto al largo de la cadena hidrocarbonada, la pastura genera una depresión en el contenido de AG de cadena corta y media en leche, mientras que se incrementan los AG de cadena larga, principalmente el CLA y el C18:3 (Kelly et al., 1998; Donovan et al., 2000; Chilliard et al., 2001; Kraft et al., 2003; Schroeder et al. 2003; Dewhurst et al., 2006). Por su parte, Couvreur et al. (2006) reportaron una relación lineal entre la oferta de pastura en el ganado y el contenido de CLA en leche. El contenido en PUFA en los forrajes es elevado, principalmente en C18:3 y esta sería una de las causas por las que el C18:1, C18:2 y C18:3 se encuentren en altas concentraciones en vacas en pastoreo (Dewhurst et al., 2001; Mackle et al., 2003; Schroeder et al., 2004; Palmquist et al., 2005).

Se debe considerar que las vacas a inicios de lactancia presentan bajas tasas de consumo y bajos tiempos efectivos en pastoreo, lo cual podría estar limitando el consumo potencial en animales con un tiempo de acceso restringido a la pastura (Chilibroste et al., 2012). Por tanto un mayor tiempo de acceso a la pastura podría compensar esta dificultad encontrada al inicio de la lactancia permitiendo un mayor tiempo de pastoreo y un mayor consumo de MS (Chilibroste et al., 2012).

La combinación de pasturas y DTM fue evaluada en nuestro país. Mendoza et al. (2016) ofreciendo pasto cortado a vacas estabuladas con una base de DTM, encontraron un incremento en leche de C18:1 *trans*, CLA y de C18:3, generando un perfil de AG beneficioso para la salud del consumidor. Este trabajo se alinea con otros reportes. Llorca et al. (2003); Bargo et al. (2006) y Morales- Almaraz et al. (2010) trabajando con sistemas mixtos donde combinaron el uso de DTM y pastoreo reportaron aumentos en las cantidades de C18:1 *trans*, CLA y C18:3.

HIPÓTESIS

La composición de la grasa láctea en vacas lecheras en lactancia temprana, principalmente las fracciones de CLA y de ácido linolénico (C18:3) se verán afectadas por dietas que integran una oferta de pastura en un 50%, respecto de DTM exclusivamente, mejorando el perfil de AG desde un punto de vista de la salud humana.

OBJETIVOS

- a)** Determinar el efecto de la alimentación en animales sometidos a dietas mixtas (DTM y pastoreo) vs. DTM sobre la producción de leche y el perfil de AG en leche a los 47 ± 12 días postparto.
- b)** Determinar el efecto de las horas de pastoreo sobre el perfil de AG en leche a los 47 ± 12 días postparto.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Manejo animal y parto

El protocolo experimental fue evaluado y aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA-UdelaR; Exp. N° 021130-006366-11).

El ensayo se realizó en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni, Ruta 3 Km 363, Paysandú, Uruguay, perteneciente a la Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Se seleccionaron 27 vacas Holstein multíparas (4.5 ± 1.81 lactancias) de partos de otoño, las cuales fueron bloqueadas por número de lactancia, fecha probable de parto, condición corporal (CC) y peso corporal 30 días previos al parto. Entre la octava y cuarta semana previa al parto se realizó una dieta para lograr una CC entre 3 y 3.5 según Edmonson et al. (1989). Luego de la cuarta semana parto, se les ofreció a los animales una dieta a base de ensilaje de maíz y concentrado comercial formulada para parto. La CC al parto (-4 ± 3 días al parto) fue de 3.2 ± 0.2 y el peso vivo fue de 753 ± 51 kg.

b) Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental fue de bloques al azar y los animales fueron asignados a uno de los tres tratamientos como fue descrito por Fajardo et al. (2015). Durante el período comprendido entre el parto y los 60 días posteriores, los tres grupos accedieron diariamente a la misma oferta de alimentos en base seca (Tabla 2). La dieta fue formulada acorde a NRC (2001) con una oferta diaria de 30kg MS, con la meta de un 15% de rechazo y una producción de leche de 40 kg/día. Los tres tratamientos fueron los siguientes:

I. Grupo 0 (G0)

El grupo G0 ($n=9$) fue alimentado en base a DTM con una relación forraje concentrado de 45/55, la misma fue ofrecida dos veces al día, 40% en la mañana y 60% por la tarde. Este grupo se mantuvo siempre en confinamiento a cielo abierto en piso de tierra y bateas de madera (frente de ataque: 1,8 m/v) para alimentación grupal y con acceso libre a la DTM y al agua.

II. Grupo 1 (G1)

El grupo G1 ($n= 10$) tuvo acceso al pastoreo luego del ordeño am desde las 08:00 a las 14:00 h y luego del ordeño pm pasaron a confinamiento (mismas condiciones que G0) con acceso a DTM (50% del peso de la dieta) ofrecida en bateas grupales y agua hasta las 04:00 am. Las proporciones de consumo registradas en este tratamiento fueron de 72.5% DTM y 27.5% de pasturas (Fajardo et al., 2015).

III. Grupo 2 (G2)

Los animales del grupo G2 ($n=8$) fueron sometidos a dos pastoreos: el primero comprendido entre las 08:00 y 14:00 h y el segundo entre las 17:00 y 20:00 h, con

un total de 9 horas de pastoreo. Por la noche pasaron a confinamiento (mismas condiciones que G0) con acceso a DTM (50% del peso de la dieta) ofrecida en bateas grupales y agua hasta las 04:00 am. Las proporciones de consumo registradas en este tratamiento fueron de 65.6%DTM y 34.4% de pastura (Fajardo et al., 2015).

c) Pastura

La pastura utilizada fue a base de *Festuca arundinacea*, *Trifolium repens* y *Lotus corniculatus* de segundo y tercer año, con una asignación objetivo de 17kg de materia seca por vaca y por día. Los potreros estaban alejados 1.7 km de la sala de ordeño, en donde una franja nueva por semana se les asignaba a los animales sobre una estimación de 15.0 kg MS/vaca/día sobre 4 cm respecto del suelo. La disponibilidad de forraje (kg MS/ha) fue estimada semanalmente utilizando el método comparativo adaptado de Haydock y Shaw (1975). El forraje cortado fue secado en estufa de aire forzado (60°C) con el fin de determinar su contenido de MS (Fajardo et al., 2015).

d) Mediciones experimentales y análisis de muestras

I. Mediciones en los animales

La producción de leche se registró diariamente en cada ordeño mediante el uso de medidores Waikato®. Semanalmente se tomaron muestras de leche de cada vaca en el ordeño am y pm con el fin de analizar la composición química de su producción mediante espectrofotometría de infrarrojo cercano (*Near Infrared Reflectance Spectroscopy-NIRS*, Milko-Scan, Fross Electric, Hillerød, Denmark).

La CC y PV de los animales se determinó semanalmente, luego del ordeño matutino sin ayuno previo. La CC fue determinada siempre por el mismo observador utilizando una escala de 5 puntos (1-flaca y 5-gorda, Edmonson et al., 1989).

I. Determinación del perfil de ácidos grasos en leche y alimentos

El perfil de AG fue determinado en muestras de leche compuestas de los dos ordeños diarios, a los 47±12 días posparto para los tres tratamientos. A su vez, se determinó el perfil de AG de la DTM y de la pastura utilizada en el ensayo (Tabla 2).

La grasa láctea se extrajo según el método de Folch et al. (1957). Los solventes de extracción fueron: metanol y cloroformo. Se realizó la metilación de los AG acorde al vigésimo quinto procedimiento descrito por IUPAC 2.301. Las soluciones de metilación utilizadas fueron: solución metanólica de NaOH 0.5N, trifluoruro de Boro al 14%, heptano y solución saturada de NaCl (Mossoba et al., 1996). Los ésteres metílicos de AG fueron analizados y cuantificados en un cromatógrafo gaseoso (Agilent Technologies 6890, Palto Alto, CA, USA) en el cual se utilizó una columna

capilar SP 2560 (100m x 0.25 mm i.d. con 0.2 µm de espesor del film; supelco Inc., Bellefonte, PA).

Tabla 2. Composición química y perfil de ácidos grasos de la Dieta Totalmente Mezclada (DTM) y pastura.

Nutriente	DTM (Media±EEM)	Pastura (Media±EEM)
MS, g/kg	492±29.8	371±21
PC, g/kg DM	149±23.7	146±7.4
FND, g/kg MS	348±41.2	531±3.3
FDA, g/kg MS	189±31.0	272±6.8
Ceniza, g/kg MS	72±8.8	10.2±0.7
ENL, Mcal/kg MS	1.63 ¹	1.50 ²
Ácidos grasos, g/100g		
C10:0	0.02	0.26
C14:0	0.11	0.55
C16:0	19.74	23.15
C16:1	0.12	0.59
C18:0	4.63	6.32
C18:1 <i>cis</i>	29.72	6.56
C18:2 <i>cis</i> (n-6)	36.97	12.19
C18:2 <i>trans</i>	0.12	Nd
C18:3(n-3)	2.35	20.01
C20:0	0.98	2.35
C20:1 <i>cis</i>	0.45	Nd
C20:2 <i>cis</i> (n-6)	0.49	Nd
C20:4(n-6)	0.32	Nd
C21:0	0.12	Nd
C22:0	1.1	4.96
C22:3	0.3	Nd
C23:0	0.31	0.97
C24:0	1.16	4.18
C25:0	0.17	0.98
C26:0	0.27	7.18
C28:0	0.11	4.65
n-6/n-3	16.06	0.61
Grasa, g/100g	7.28	2.05

Nd: no detectado

EEM: Error estándar de la media

¹ENL(Mcal/Kg MS)=1.909-(0.015*%FDA)

²ENL(Mcal/Kg MS)=2.301-(0.0289*%FDA)

Las masas de los AG se midieron utilizando un espectrómetro de masa (Agilent Technologies 5973) con ionización de impacto electrónico. Los valores de temperatura del horno de cromatógrafo gaseoso, los valores de presión y flujo del gas helio, la temperatura de la fuente de ionización y el rango de masas fueron

acordes a Artegoitia et al. (2013). Se identificó cada AG por su tiempo de retención y por su espectro de masa, los cuales fueron posteriormente cuantificados mediante la normalización de sus respectivas áreas, obteniéndose el porcentaje másico de cada uno. Las muestras fueron analizadas por duplicado y se utilizó un estándar FAME (Supelco 47885-U, Bellefonte; 37 FAME from C4:0 to C24:0), a intervalos regulares como método de control de calidad y para determinar factores de corrección de cada AG.

La composición de AG de la leche y de los alimentos fue informada como gramos de AG por 100 gramos del total de AG (g/100g). El CLA fue reportado como la suma de todos los isómeros de C18:2 con dobles enlaces conjugados tanto *cis* como *trans*.

e) Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., 2005 Cary, NC, USA.). Los datos de producción y composición de leche así como las fracciones de AG en leche fueron analizados en un diseño de bloques al azar, mediante el procedimiento MIXED. Con el tratamiento como efecto fijo y el bloque como efecto aleatorio. Se utilizó el procedimiento de Kenward-Rogers para ajustar el grado del denominador de libertad. Se realizaron pruebas de Tukey-Kramer para la comparación de las medias. Las medias se reportaron con sus respectivos errores estándar y fueron consideradas diferentes cuando $P \leq 0.05$ y las tendencias fueron identificados cuando $0.05 < P \leq 0.10$.

RESULTADOS

La producción de leche, grasa y lactosa no mostraron diferencias entre los tratamientos. El contenido en proteína fue mayor en G0 que para los tratamientos pastoriles (G1 y G2; $p = 0.011$) a los 47 ± 12 DPP (Tabla 3).

Tabla 3. Producción y composición de leche de vacas Holstein alimentadas con Dieta Totalmente Mezclada (G0), 50% Dieta Totalmente Mezclada (DTM) y 6 h de acceso a pastoreo en una sesión (G1), 50% DTM y 9 h de acceso a pastoreo en dos sesiones (G2) a los 47 ± 12 días posparto.

Parámetro	Tratamientos			EEM	p-Valor
	G0	G1	G2		
Leche, L/d	38.46	33.60	36.19	1.6	0.123
Sólidos, g/100g	12.45	11.79	11.25	0.39	0.161
Grasa, g/100g	4.14	3.73	3.40	0.31	0.299
Proteína, g/100g	3.37 ^a	3.11 ^b	2.99 ^b	0.07	0.011
Lactosa, g/100g	4.93	4.94	4.86	0.08	0.751

Sólidos= grasa+proteína+lactosa

^{a,b}medias con diferentes superíndices difieren ($p < 0.05$)

La fracción de AG *de novo* fue mayor para los tratamientos G0 y G1 que para el grupo G2 ($p = 0.004$; Tabla 4). El C10:0 y C14:0 representaron el 65% del total de esa fracción. Para estos dos AG no se encontraron diferencias entre el grupo G0 y G1, mientras que en el grupo G2 las concentraciones fueron menores ($p < 0.05$; Tabla 5).

Con respecto a la proporción de AG de origen mixto, no hubo diferencias entre los tratamientos. La concentración de C16:1 *cis* presentó una tendencia a ser mayor en los tratamientos G0 y G1 que para el G2 ($p < 0.10$; Tabla 5).

En cuanto a la fracción de AG preformados en leche, la cantidad encontrada fue mayor para el grupo G2 que para el grupo G0 ($p = 0.045$; Tabla 4), mientras que no se encontró diferencias entre éstos y el grupo G1. El C18:0 representó un 25% del total de esta fracción y fue mayor (30%) en el grupo G2 que para los tratamientos G0 y G1 ($p = 0,009$; Tabla 5).

Los tratamientos empleados no presentaron efecto sobre el grado de saturación de los AG (SAT, MUFA, PUFA), ni en la relación saturado/insaturado (Tabla 4).

Tabla 4. Componentes de ácidos grasos en leche de vacas alimentadas con Dieta Totalmente Mezclada (G0), 50% DTM y 6 h de acceso a pastoreo en una sesión (G1), 50% DTM y 9 h de acceso a pastoreo en dos sesiones (G2) a los 47±12 días posparto.

Origen de AG, g/100g AG	Tratamientos			EEM	p-valor
	G0	G1	G2		
De novo (C4:0-C15:1)	23.09 ^a	20.07 ^a	15.34 ^b	1.38	0.004
Mixtos (C16:0+C16:1)	37.3	34.91	34.66	1.83	0.561
Preformados (>C17:0)	39.49 ^b	45.10 ^{a,b}	50.09 ^a	2.68	0.045
Saturación de AG, g/100g AG					
Saturados	68.73	64.67	64.45	2.15	0.335
Monoinsaturados	27.09	30.91	31.16	1.95	0.301
Poliinsaturados	4.12	4.41	4.43	0.23	0.588
Saturados/insaturados	2.35	1.93	1.84	0.21	0.235
n-3	0.41 ^b	0.66 ^a	0.79 ^a	0.06	0.005
n-6	2.75 ^a	2.05 ^b	1.99 ^b	0.07	<0.001
n-6/n-3	8.31 ^b	3.48 ^a	2.64 ^a	0.67	<0.001
<i>Trans</i>	2.79 ^b	5.19 ^a	5.94 ^a	0.42	0.001
C14:1/C14:0	0.08 ^a	0.08 ^a	0.05 ^b	0.01	0.013
C16:1/C16:0	0.06	0.06	0.04	0.01	0.205
C18:1/C18:0	2.60	2.73	2.02	0.27	0.162
Δ^9 desaturasa	0.30	0.31	0.30	0.02	0.783
RCLA	0.23	0.21	0.15	0.03	0.200

AG: ácido graso

Δ^9 desaturasa: actividad desaturasa; $(C16:1cis + C18:1cis + C18:2 CLA + C14:1cis)/(C14:0 + C16:0 + C18:0 + C18:1trans + C16:1cis + C18:1cis + C18:2 CLA)$

RCLA: $C18:2 CLA/C18:1trans$

^{a,b} medias con diferentes superíndices difieren ($p < 0.05$)

El contenido de CLA en leche fue casi el doble en los tratamientos que integraron el pastoreo (G1 y G2) respecto de G0 (Tabla 5), pero no fue estadísticamente significativo ($p = 0.12$). La fracción *trans* fue mayor para los tratamientos que incluyeron pastura en la dieta (G1 y G2) que para el grupo G0 ($p = 0.001$; Tabla 4), atribuible a las concentraciones encontradas de C18:1*trans* ($p = 0.001$) y C18:2 *trans* ($p = 0.001$; Tabla 5).

La fracción de AG omega-3 fue mayor para los tratamientos pastoriles G1 y G2 que para el G0 ($p = 0.005$, Tabla 4). Al mismo tiempo, las concentraciones de C18:3 n-3, las cuales representaron el 84% del total de la fracción de AG omega-3, fueron mayores en los grupos G1 y G2 ($p < 0.001$; Tabla 5). Por el contrario, la fracción de AG omega-6 fue mayor para el grupo G0 que para G1 y G2 ($p < 0.001$). El contenido en C18:2*cis* n-6, 89% del total de AG omega-6, fue mayor para el grupo G0 que para

los grupos G1 y G2 ($p < 0.001$). Estos resultados determinaron que la relación n6/n3 fuera superior para el grupo G0 que para G1 y G2 ($p < 0.001$).

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos en leche de vacas alimentadas con Dieta Totalmente Mezclada (G0), 50% DTM y 6 h de acceso a pastoreo en una sesión (G1), 50% DTM y 9 h de acceso a pastoreo en dos sesiones (G2) a los 47 ± 12 días posparto.

AG (g/100g)	Tratamientos			EEM	P-valor
	G0	G1	G2		
C6:0	0.44 ^{x,y}	0.47 ^x	0.30 ^y	0.05	0.076
C8:0	0.58 ^{x,y}	0.53 ^x	0.36 ^y	0.06	0.057
C10:0	2.23 ^a	1.82 ^a	1.16 ^b	0.19	0.003
C11:0	0.10 ^a	0.06 ^{a,b}	<0.01 ^b	0.02	0.027
C12:0	3.69 ^a	2.74 ^b	1.87 ^c	0.26	0.001
C12:1cis	0.14 ^a	0.08 ^b	<0.01 ^c	0.01	<0.001
C13:0	0.24	0.17	0.16	0.03	0.119
C14:0	11.98 ^a	11.09 ^a	9.39 ^b	0.63	0.031
C14:1cis	0.98 ^a	0.85 ^a	0.49 ^b	0.08	0.001
C15:0	2.29 ^x	1.93 ^{x,y}	1.57 ^y	0.21	0.089
C16:0	35.28	32.98	33.22	1.82	0.634
C16:1cis	1.78 ^x	1.72 ^x	1.26 ^y	0.16	0.067
C16:1trans	0.25	0.2	0.18	0.08	0.812
C17:0	1.66	1.81	1.88	0.16	0.659
C18:0	9.60 ^b	10.51 ^b	13.95 ^a	0.92	0.009
C18:1cis	21.09	23.23	23.65	1.69	0.552
C18:1trans	2.04 ^b	4.01 ^a	4.71 ^a	0.34	<0.001
C18:2cis(n-6)	2.49 ^a	1.71 ^b	1.83 ^b	0.1	<0.001
C18:2 CLA	0.39	0.75	0.65	0.12	0.118
C18:2trans	0.47 ^b	0.86 ^a	1.00 ^a	0.07	<0.001
C18:3(n-3)	0.28 ^c	0.54 ^b	0.74 ^a	0.05	<0.001
C19:0	0.14 ^y	0.22 ^{x,y}	0.39 ^x	0.07	0.072
C19:1	0.11	0.09	0.05	0.02	0.17
C20:0	0.15 ^b	0.14 ^b	0.18 ^a	0.01	0.016
C20:4(n-6)	0.15 ^a	0.11 ^b	0.10 ^b	0.01	0.002
Otros	1.16	1.34	0.95	0.13	0.115

AG: ácido graso CLA: ácido linoleico conjugado

Otros: C4:0 + C15:1 + C16:2 + C17: 1cis + C18:2cis + C18:2trans(n-6) + C18:3cis + C18:3(n-6) + C20:1cis + C20:1trans + C20:2cis (n-3) + C20:2 cis (n-6) + C20:3 cis (n-3) + C20:3 (n-6) + C20:4 (n-3) + C20:5 (n-3) + C21:0 + C22:0 + C22:1cis + C22:3 + C22:4 + C22:5 (n-3) + C22:5 (n-6) + C23:0 + C24:0 + C24:1cis + C25:0 + C26:0

^{a,b,c} medias con diferentes superíndices difieren ($p < 0.05$)

^{x,y} medias con diferentes superíndices difieren ($0.05 < p \leq 0.10$)

DISCUSIÓN

La producción de leche correspondiente a los 47 ± 12 días posparto no fue afectada por los tratamientos. La inclusión de pasto en un 27.5 y 34.4% en los tratamientos G1 y G2 respectivamente no generó cambios significativos en producción de leche. Similares hallazgos han reportado Vibart et al. (2008) y Soriano et al. (2001) en donde la inclusión en un 32 y 30% respectivamente de pastura no generó diferencias significativas en producción de leche con respecto a una dieta 100% DTM. En cuanto al contenido en sólidos totales, grasa y lactosa no hubo diferencias entre los grupos, en tanto el contenido en proteína fue mayor en G0 que para los tratamientos pastoriles. Los efectos de la alimentación sobre la concentración de proteína son menores que los observados en la concentración de grasa, pero está claramente establecido que existe una directa relación con el consumo de energía, la cual puede ser aumentada incrementando el consumo de concentrados (Emery, 1978; Depeters y Cant, 1992) como sucedió en el grupo alimentado a base de DTM. A su vez se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento, donde el grupo G0 consumió aproximadamente un 25% más de MS diaria que los tratamientos en pastoreo. Vibart et al. (2008) sugirieron una mayor eficiencia de conversión cuando los animales incluyen pasturas en su dieta respecto a DTM exclusivamente.

El contenido de AG preformados a los 47 ± 12 DPP fue afectado por los tratamientos. El grupo G2 presentó mayor cantidad respecto de G0, lo que es coherente con hallazgos reportados previamente (Loor et al., 2003; Bargo et al., 2006; Morales-Almaráz et al., 2010). El incremento en el contenido de AG preformados en el tratamiento G2 puede deberse a un aumento en la movilización de grasa corporal y/o un incremento en la utilización de lípidos provenientes de la dieta (Palmquist et al., 1993). El consumo de pasturas conduce a un consumo mayor de AG de cadena larga e insaturados; siendo el C18:3 el más abundante (Dewhurst et al., 2006). Es interesante resaltar que las pasturas utilizadas y analizadas en este trabajo presentaron una cantidad de C18:3 menor a lo esperable acorde a la bibliografía (Dewhurst et al., 2006). A su vez, se observaron altas concentraciones de AG saturados de cadena muy larga como el ácido eicosanoico (C20:0) y el ácido octacosanoico (C28:0). Estos compuestos, considerados ceras, se localizan en la cutícula de las plantas y son el resultado de las defensas de la planta ante el estrés por sequía. Siendo esto coherente con lo que sucedió en este experimento (Fajardo et al., 2015). En situaciones de sequía y estrés de las plantas, también se incrementan ciertos metabolitos secundarios como los fenoles, compuestos que tienen la capacidad de disminuir la lipólisis y la biohidrogenación a nivel ruminal (Buccioni et al., 2012). Viendo esto se puede suponer que la concentración de AG preformados insaturados de la leche de vacas del grupo G2 sea el resultado de una combinación entre los AG dietarios sumado a una tasa menor de biohidrogenación ruminal. La movilización de reservas también contribuye a explicar el contenido de AG preformados en el grupo G2. De hecho los animales de este grupo perdieron más condición corporal respecto de G0 (Fajardo et al., 2015). En este sentido, la

cantidad de C18:0 fue mayor para el grupo G2 que para los grupos G0 y G1. Rukkhuamsuk et al. (2000) han reportado que este AG siendo uno de los principales provenientes de la lipólisis (movilización de reservas) no se acumula en el hígado, siendo excretado en leche en grandes cantidades.

El contenido en AG *de novo* fue afectado por los tratamientos, donde el grupo G2 presentó menores cantidades que los grupos G0 y G1. Hecho atribuible al contenido de AG de cadena larga e insaturados de evidente llegada a la glándula mamaria en el grupo G2, los cuales son potentes inhibidores de la síntesis de AG *de novo* (Dhiman et al., 1999; Chilliard et al., 2000).

La menor síntesis de AG *de novo* sumado a un menor grado de saturación en G2 sugieren una glándula mamaria menos activa. Esto sería consistente con la liberación de AG de cadena larga desde el tejido adiposo y/o las cantidades aumentadas de PUFA de la dieta de G2 que reducen la actividad de las enzimas mamarias ACC y FAS (Chilliard et al., 2000).

Con respecto al contenido de CLA, no se encontraron diferencias entre los tratamientos, a diferencia de algunos trabajos (Loor et al., 2003; Morales-Almaráz et al., 2010) que reportaron mayores contenidos de CLA al comparar DTM y pastoreo vs. DTM (ambos experimentos con un mínimo de consumo diario de pastura del 21,5%). Es necesario mencionar que estos trabajos han sido realizados en otros momentos de la lactancia (185 y 94 DPP; Loor et al., 2003 y Morales-Almaráz et al., 2010; respectivamente). Esto es de particular importancia ya que el momento de la lactancia influye sobre el perfil de AG y específicamente sobre el contenido de CLA, el cual aumenta y se estabiliza con el transcurso de la lactancia (Stoop et al., 2009). La gran mayoría del CLA en leche es sintetizado en la glándula mamaria vía desaturación del C18:1*trans* por la acción de la Δ 9 desaturasa (Bauman, 2000). Aunque el contenido de CLA no fue diferente entre los tratamientos, la cantidad de su precursor el C18:1*trans* fue el doble en los tratamientos que integraron el pastoreo y esto se alinea a reportes anteriores (Morales-Almaraz et al., 2010). El C18:1*trans* es un producto mayoritariamente originado de la biohidrogenación incompleta a nivel ruminal del C18:2 y C18:3 (Griinari y Bauman, 1999). Entonces, cuando los alimentos aportan cantidades importantes de C18:2 y C18:3, el C18:1*trans* generado escapa del rumen y es absorbido en el duodeno (Bauman y Griinari, 2001).

Con respecto a la fracción n-3 en leche, fue mayor para los tratamientos pastoriles (G1 y G2) que para G0. El contenido de C18:3n-3 en la grasa láctea difirió entre los tres tratamientos siendo el mayor para G2 y el menor para G0. Esto es consistente con el trabajo de Morales-Almaraz et al. (2010) donde encontraron mayores cantidades de C18:3n-3 con 12 vs 6 h de pastoreo (con una diferencia de 12.7% de consumo de MS diaria de pastura) y la menor cantidad en el tratamiento 100% DTM. Dado que los tejidos de los rumiantes no sintetizan este AG (Chilliard et al., 2000), el incremento del mismo en la grasa láctea en nuestro estudio se explica por el

pastoreo (con alta proporción de C18:3; 20% en pastura vs 2.3% en DTM) que aporta PUFA que escapan de la biohidrogenación ruminal (Dewhurst et al., 2006). De hecho, Lock y Bauman (2004) han sugerido que hasta un 15% de C18:3 podría escapar de la biohidrogenación ruminal. Por otra parte, la fracción n-6 en leche fue mayor para las vacas G0 que en las vacas en pastoreo, lo que es consistente con el perfil de AG de la DTM. En conjunto esto generó que la relación n-6/n-3 en leche de animales que pastorearon desde el inicio de la lactancia fuera significativamente menor que en los que no pastorearon y esto se alinea a reportes anteriores (Petit et al., 2004).

CONCLUSIÓN

Ofertando un 50% de la dieta a partir de pasturas desde el inicio de la lactancia, manteniendo un nivel de producción competitivo, se logró modificar el perfil de AG de la leche, incrementándose aquellas fracciones que son de interés para la salud humana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AbuGhazaleh AA, Holmes LD (2007) Diet Supplementation with Fish Oil and Sunflower Oil to Increase Conjugated Linoleic Acid Levels in Milk Fat of Partially Grazing Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 90:2897–2904.
2. AbuGhazaleh AA, Schingoethe DJ, Hippen AR, Kalscheur KF (2003) Conjugated Linoleic Acid and Vaccenic Acid in Rumen, Plasma, and Milk of Cows Fed Fish Oil and Fats Differing in Saturation of 18 Carbon Fatty Acids. *Journal of Dairy Science* 86:3648–3660.
3. Acosta Y, Karlen H, Villanueva N, Mieres JM, La Manna A (2010) Intensificación: el rol de la alimentación. *Jornada Técnica de Lechería. Serie Actividades de Difusión No. 610, San José, Uruguay.* p 55-62.
4. Alais Ch (1985) *Ciencia de la leche: principios de tecnología lechera.* 4ª ed, Barcelona, Reverte, 873p.
5. Artegoitia V, Meikle A, Olazábal L, Damián JP, Adrien ML, Mattiauda D, Bermudez J, Torre A, Carriquiry M (2013) Milk casein and fatty acid fractions in early lactation are affected by nutritional regulation of body condition score at the beginning of the transition period in primiparous and multiparous cows under grazing conditions. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition* 97(5):919-932.
6. Bargo F, Delahoy JE, Schroeder GF, Baumgard LH, Muller LD (2006) Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated linoleic acid in milk. *Animal Feed Science and Technology* 131:226–240.
7. Bargo F, Muller LD, Delahoy JE, Cassidy TW (2002) Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *Journal of Dairy Science* 85(11):2948-63.
8. Bauman DE, Mather IH, Wall RJ, Lock AL (2006) Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *Journal of Dairy Science* 89:1235–1243.
9. Bauman DE, Griinari JM (2003) Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition* 23:203–227.
10. Bauman DE, Griinari JM (2001) Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science* 70:15–29.
11. Bauman DE (2000) Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeorhesis revisited. En: Cronjé P.B. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Growth, and Reproduction.* New York, ed. PJ Cronje, pp. 311–27.

12. Bimbo F, Bonanno A, Nocella G, Viscecchia R, Nardone G, De Devitiis B, Carlucci D (2017) Consumers' acceptance and preferences for nutrition-modified and functional dairy products: A systematic review. *Appetite* 113:141-154.
13. Buccioni A, Decandia M, Minieri S, Molle G, Cabiddu A (2012) Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Animal Feed Science and Technology* 174:1– 25.
14. Cant JP, Trout DR, Qiao F, Purdie NG (2002) Milk Synthetic Response of the Bovine Mammary Gland to an Increase in the Local Concentration of Arterial Glucose. *Journal of Dairy Science* 85:494-503.
15. Chilibroste P, Soca P, Mattiauda D (2012). Estrategias de alimentación en Sistemas de Producción de Leche de base pastoril. *Pasturas 2012: Hacia una ganadería competitiva y sustentable*. Balcarce: INTA. pp. 91-100.
16. Chilibroste P, Soca P, Mattiauda DA (2011) Balance entre oferta y demanda de nutrientes en sistemas pastoriles de producción de leche: potencial de intervención al inicio de la lactancia. XV Congreso Latinoamericano de Buiatría, XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. 8-10 Junio 2011. Pp. 91-97.
17. Chilibroste P (2011) IFCN Dairy Report 2011, International Farm Comparisson Network . 2011. Vol: 1, pp. 210, Edicion: 1. Editorial: IFCN Dairy Reserach Center, Kiel. Co-editor y Co-autor.
18. Chilibroste P, Naya H, Urioste JI (2002) Evaluación cuantitativa de curvas de lactancia de vacas holando en Uruguay. Implicancias biológicas de las curvas de producción multifásica. *Revista Argentina de Producción Animal* 22(supl 1): 358-359.
19. Chilliard Y, Ferlay A, Doreau M (2001) Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Science* 70:31–48.
20. Chilliard Y, Ferlay A, Mansbridge RM, Doreau M (2000) Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann Zootech* 49:181–205.
21. Chouinard PY, Corneau L, Butler WR, Chilliard Y, Drackley JK, Bauman DE (2001) Effect of Dietary Lipid Source on Conjugated Linoleic Acid Concentrations in Milk Fat. *Journal of Dairy Science* 84:680–690.
22. Corl BA, Baumgard LH, Dwyer DA, Griinari JM, Phillips BS, Bauman DE (2001) The role of $\Delta 9$ desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *Journal of Nutritional Biochemistry* 12: 622–630.

23. Couvreur S, Hurtaud C, Lopez C, Delaby L, Peyraud JL (2006) The Linear Relationship Between the Proportion of Fresh Grass in the Cow Diet, Milk Fatty Acid Composition, and Butter Properties. *Journal of Dairy Science* 89:1956–1969.
24. Croissant AE, Washburn SP, Dean LL, Drake MA (2007) Chemical Properties and Consumer Perception of Fluid Milk from Conventional and Pasture-Based Production Systems. *Journal of Dairy Science* 90:4942–4953.
25. Depeters E, Cant J (1992) Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *Journal of Dairy Science* 75 (8): 2043-2070.
26. Dewhurst RJ, Shingfield KJ, Lee MRF, Scollan ND (2006) Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology* 131:168–206.
27. Dewhurst RJ, Scollan ND, Youell SJ, Tweed JKS, Humphreys M (2001) Influence of species, cutting date and cutting interval on the fatty acid composition of grasses. *Grass Forage Science* 56:68–74.
28. Dhiman TR, Satter LD, Pariza MW, Galli MP, Albright K, Tolosa MX (2000) Conjugated Linoleic Acid (CLA) Content of Milk from Cows Offered Diets Rich in Linoleic and Linolenic Acid. *Journal of Dairy Science* 83:1016–1027.
29. Dhiman TR, Anand GR, Satter LD, Pariza MW (1999) Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science* 82: 2146–2156.
30. DIEA (2016). Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Estadísticas agropecuarias. Montevideo, Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>. Fecha de consulta: 8/06/2017.
31. Donovan DC, Schingoethe DJ, Baer RJ, Ryali J, Hippen AR, Franklin ST (2000) Influence of Dietary Fish Oil on Conjugated Linoleic Acid and Other Fatty Acids in Milk Fat from Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 83:2620–2628.
32. Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G (1989) A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72:68-78.
33. Ellis KA, Innocent G, Grove-White D, Cripps P, McLean WG, Howard CV, Mihm M (2006) Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. *Journal of Dairy Science* 89:1938–1950.

34. Emery R (1978) Feeding for increased milk protein. *Journal of Dairy Science* 61 (6):825-828.
35. Fajardo M, Mattiauda DA, Motta G, Genro TC, Meikle A, Carriquiry M, Chilbroste P (2015) Use of mixed rations with different access time to pastureland on productive responses of early lactation Holstein cows. *Livestock Science* 181:51–57.
36. Fajardo M, Mattiauda D, Meikle A, Carriquiry M, Gil J, Motta G, Guala G, Ortega G, Pelaez D, Sorhouet P, Souza F, Chilbroste P (2012) Performance of Holstein dairy cows under different feeding strategies in early lactation. *Journal of Dairy Science* 95(E-Suppl 2): 367-372.
37. Flowers G, Ibrahim SA, AbuGhazaleh AA (2008) Milk fatty acid composition of grazing dairy cows when supplemented with linseed oil. *Journal of Dairy Science* 91:722–730.
38. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226:497-509.
39. Forsyth IA (1989) Growth factors in mammary gland function. *Journal of Reproduction and Fertility* 85:759-770.
40. Gao Y, Sun T, Jianguo L (2009) Effect of oilseeds rich in linoleic and linolenic acids on milk production and milk fatty acid composition in dairy cows. *Frontiers of Agriculture in China* 3(3): 311–318.
41. Griinari JM, Bauman DE (1999) Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. En: Yurawecz M, Mossoba M, Kramer J, Pariza M, Nelson G. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Champaign, AOCS, Vol 1, pp.180-185.
42. Harfoot CG, Hazlewood GP (1988) Lipid metabolism in the rumen. En: Hobson PN. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Amsterdam, ed. PN Hobson, pp. 285–322.
43. Harfoot CG, Noble RC, Moore JH (1973) Food particles as a site for biohydrogenation of unsaturated fatty acids in the rumen. *Biochemical Journal* 132:829-832.
44. Haug A, Hostmark AT, Harstad OM (2007) Bovine milk in human nutrition- a review. *Lipid in Health and Disease*. 6: 25-41.
45. Haydock KP, Shaw NH (1975) The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Animal Production Science* 15(76):663-670.
46. Jenkins TC, McGuire MA (2006) Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *Journal of Dairy Science* 89:1302–1310.
47. Jenkins TC (1993) Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 76:3851-3863.

48. Jutzeler van Wijlen R and Colombani P (2010) Grass-based ruminant production methods and human bioconversion of vaccenic acid with estimations of maximal dietary intake of conjugated linoleic acids. *International Dairy Journal* 20:433-448.
49. Karijord O, Standal N, Syrstad O (1982) Sources of variation in composition of milk fat. *Z Tierzuchtg Zuchtgsbiol* 99: 81–93.
50. Kay JK, Mackle TR, Auldist MJ, Thomson NA, Bauman DE (2004) Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. *Journal of Dairy Science* 87:236–378.
51. Kelly ML, Kolver ES, Bauman DE, Van Amburgh ME, Muller LD (1998) Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 81:1630–1636.
52. Kemp P, Lander DJ (1984) Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *Journal of General Microbiology* 130:527-533.
53. Kolver ES, Muller LD (1998) Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science* 81 (5): 1403-1411.
54. Kraft J, Collomb M, Mockel P, Sieber A, Jahreis G (2003) Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids. *Lipids* 38:657–664.
55. Lock AL, Bauman DE (2004) Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197–1206.
56. Loor JJ, Ferlay A, Ollier A, Doreau M, Chilliard Y (2005) Relationship Among Trans and Conjugated Fatty Acids and Bovine Milk Fat Yield Due to Dietary Concentrate and Linseed Oil. *Journal of Dairy Science* 88:726–740.
57. Loor JJ, Soriano FD, Lin X, Herbein JH, Polan CE (2003) Grazing allowance after the morning or afternoon milking for lactating cows fed a total mixed ration (TMR) enhances trans11-18:1 and cis9,trans11-18:2 (rumenic acid) in milk fat to different extents. *Animal Feed Science and Technology* 109:105-119.
58. Mackle TR, Kay JK, Auldist MJ, McGibbon AKH, Philpott BA, Baumgard LH, Bauman DE (2003) Effects of abomasal infusion of conjugated linoleic acid on milk concentration and yield from pasture-fed dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86:644–652.
59. Markiewicz-Keszycka M, Lipinska P, Czyzak-Runowaska G, Wojtowski J (2013) Fatty acid profile of milk. A review. *Bulletin-Veterinaty Institute in Pulawy* 57: 135-139.

60. McGuire MA, McGuire MK (2000) Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *Journal of Animal Science* 77:1-8.
61. Meikle A, Adrien L, Mattiauda D, Chilbroste P (2012) Sward condition on metabolic endocrinology during early postpartum in primiparous grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95(E-Suppl 2): 289-297.
62. Mendoza A, Cajarville C, Repetto JL (2016) Short communication: Intake, milk production, and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *Journal of Dairy Science* 99:1938–1944.
63. Moate PJ, Chalupa W, Boston RC, Lean IJ (2007). Milk fatty acids. I. Variation in the concentration of individual fatty acids in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 90: 4730-4739.
64. Morales-Almaraz E, Soldado A, Gonzalez A, Martinez-Fernandez A, Dominguez-Vara A, de la Roza-Delgado B, Vicente F (2010) Improving the fatty acid profile of dairy cow milk by combining grazing with feeding of total mixed ration. *Journal of Dairy Research* 77:225–230.
65. Mossoba MM, Yurawecz MP, Roach JAG, McDonald RE, Flickinger BD, Perkins EG (1996) Analysis of Cyclic Fatty Acid Monomer 2-Alkenyl-4,4-dimethyl-oxazoline Derivatives by Gas Chromatography–Matrix Isolation–Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:3193–3196.
66. Naya H, Urioste JI, Chilbroste P (2002) Evaluación cuantitativa de curvas de lactancia de vacas holando en Uruguay. 2. Ajuste de un modelo bifásico. *Revista Argentina de Producción Animal* 22 (supl. 1):357-358.
67. Nielsen MO and Jakobsen K (1994) Changes in mammary uptake of free fatty acids, triglyceride, cholesterol and phospholipid in relation to milk synthesis during lactation in goats. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109A:857–867.
68. NRC (National Research Council) (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. 7^a ed. National Academic Press, Washington DC.
69. Palmquist DL, Lock AL, Shingfield KJ (2005) Biosynthesis of Conjugated Linoleic acid in Ruminants and Humans. *Advances in Food and Nutrition Research*.50:179-217.
70. Palmquist DL, Beaulieu AD, Barabano DM (1993) ADSA foundation symposium: Milk fat synthesis and modification. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science* 76:1753.
71. Palmquist DL (1991) Influence of source and amount of dietary fat on digestibility in lactating cows. *Journal of Dairy Science* 74:1354–1360.

72. Pariza MW (2004) Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79(6):1132-1136.
73. Pastorini (2016) Combinación de diferentes niveles de raigrás y ración totalmente mezclada en dietas de vacas lecheras: efecto sobre el desempeño productivo y eficiencia de utilización de los nutrientes. Tesis. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, 60p.
74. Petit HV, Germiquet C, Lebel D, (2004) Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87:3889-3898.
75. Piperova LS, Moallem U, Teter BB, Sampugna J, Yurawecz MP, Morehouse KM, Luchini D, Erdman RA (2004) Changes in Milk Fat in Response to Dietary Supplementation with Calcium Salts of Trans-18:1 or Conjugated Linoleic Fatty Acids in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 87:3836–3844.
76. Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto 315/994. Segunda Edición. Disponible en: https://extranet.who.int/nutrition/gina/sites/default/files/URY%201994%20Reglamento%20Bromatol%C3%B3gico%20Nacional_0.pdf. Fecha de consulta: 12/06/2017.
77. Rukkwamsuk T, Geelen MJH, Druip TAM, Wensing T (2000) Interrelation of fatty acid composition in adipose tissue, serum, and liver of dairy cows during the development of fatty liver postpartum. *Journal of Dairy Science* 83:52–59.
78. Schroeder GF, Gagliostro GA, Bargo F, Delahoy JE, Muller LD (2004) Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. *Livestock Production Science* 86:1 –18.
79. Schroeder GF, Delahoy JE, Vidaurreta I, Bargo F, Gagliostro GA, Muller LD (2003) Milk Fatty Acid Composition of Cows Fed a Total Mixed Ration or Pasture Plus Concentrates Replacing Corn With Fat. *Journal of Dairy Science* 86:3237–3248.
80. Schwendel BH, Wester TJ, Morel PCH, Tavendale MH, Deadman C, Shadbolt NM, Otter DE (2015) Invited review: Organic and conventionally produced milk— An evaluation of factors influencing milk composition. *Journal of Dairy Science* 98:721-746.
81. Simopoulos AP (2008) The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Experimental Biology and Medicine* 233:674-688.
82. Soriano FD, Polan CE, Miller CN (2001) Supplementing pasture to lactating holstein fed a total mixed ration diet. *Journal of Animal Science* 84:2460-2468.

83. Stoop WM, Bovenhuis H, Heck JLM, van Arendonk JAM (2009) Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Sci* 92:1469–1478.
84. The Global Dairy (2015) Disponible en: <http://theglobaldairy.com/noticias/farmers-earning-premiums-for-milk-from-grass-fed-night-milked-cows-43238>. Fecha de consulta: 14/07/17.
85. Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ (2006) *Dairy Science and Technology*. New York. Taylor y Francis, 782pp.
86. Whigham LD, Watras AC, Schoeller DA (2007) Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 85(5):1203-1211.
87. Vibart RE, Vivek F, Burns JC, Huntington GB, Green JT Jr (2008) Performance of lactating dairy cows fed varying levels of total mixed ration and pasture. *Journal of Dairy Research* 75:471-480.
88. Zunong M, Tuerhong T, Okamoto M, Hongo A, Hanada M (2009) Effects of a potato pulp silage supplement on the composition of milk fatty acids when fed to grazing dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 152:81–91.