



Efectos del suministro de alimentación diferencial sobre la concentración de ácidos conjugados del linoleico (CLA) en leches de cabra

Rodríguez, M. A.⁽ⁱ⁾; Pellegrini, P.^(iv); Gagliostro, G.⁽ⁱⁱⁱ⁾; Gatti, P.⁽ⁱ⁾; Castañeda, R.⁽ⁱ⁾; Muset, G.⁽ⁱⁱ⁾;

⁽ⁱ⁾INTI-Lacteos

⁽ⁱⁱ⁾INTI-Coordinación Provincia de Buenos Aires

⁽ⁱⁱⁱ⁾INTA Balcarce Estación Experimental

^(iv)Becario SECyTI

Introducción

La leche y sus derivados lácteos representan una fuente valiosa de energía y nutrientes. El término genérico de alimento funcional se utiliza para identificar alimentos y/o componentes de los mismos que poseen propiedades adicionales sobre la salud de los consumidores. Existe un reconocimiento general sobre ciertos alimentos como los lácteos que ejercen una acción preventiva frente a la aparición de enfermedades degenerativas en el ser humano. Actualmente, la investigación se orienta hacia la valoración de dichos alimentos obtenidos naturalmente frente a la utilización de ingredientes de síntesis.

La composición en ácidos grasos de la leche de cabra es uno de los parámetros de mayor influencia sobre el valor funcional del producto y dicha composición es modificable a través de la suplementación estratégica. Los ácidos linoleicos conjugados constituyen una mezcla de isómeros del ácido linoleico (C18:2) con dobles ligaduras en las posiciones 7 y 9; 9 y 11; 10 y 12 ó 11 y 13 además de variaciones geométricas del tipo cis-cis, cis-trans, trans-cis o trans-trans. El isómero cis-9, trans-11 CLA representa más del 90% del total de CLA en leche. Los CLA resultan predominantemente consumidos en los productos lácteos y presentarían importantes propiedades benéficas sobre la salud humana: prevención del cáncer, efectos anti-aterogénicos y anti-diabetogénicos.

La suplementación dietaria de la alimentación de la cabra es la vía más rápida y eficaz para modificar la calidad de la grasa láctea a fin de producir naturalmente leche y derivados lácteos con calidad funcional. Es un producto que puede utilizarse para sustituir a la leche de vaca en la alimentación infantil o en casos de intolerancia digestiva o alergia a esta última.

El objetivo del presente trabajo fue conocer el impacto del suministro de aceite de pescado solo y en combinación con aceite de girasol sobre el perfil de ácidos grasos de la leche de cabra con especial énfasis en las concentraciones de CLA.

Metodología / Descripción Experimental

El ensayo de campo se llevó a cabo en el Establecimiento La Piedra, situado en la localidad de Batán, Pcia de Buenos Aires. Se realizó sobre un total de 123 cabras en ordeño de raza Saanen, se apartaron 10 animales al azar que se encontraban en el 7^o y 8^o mes de lactancia.

El plan de alimentación tuvo una duración de 20 días. Durante los primeros 6 días todos los animales recibieron la misma alimentación para conocer la composición basal en AG de la grasa butirosa. En el sexto día y previo a la implementación de los tratamientos alimenticios se extrajeron muestras para el análisis del perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa. A partir del séptimo día de ensayo las cabras fueron divididas al azar en dos grupos de cinco animales cada uno. En el tratamiento 1 (T1) las cabras fueron suplementadas con 30 g de aceite de pescado (AP), mientras que en el tratamiento 2 (T2) los animales recibieron 30 g de AP y 150 g de aceite comercial de girasol (AGi). Las dosis fueron ajustadas a fin de aportar un 1% (AP) y un 5% (AGi) del consumo total. El perfil de ácidos grasos de los aceites utilizados para la suplementación de las cabras se presenta en la Tabla 1.-

El forraje de base estuvo representado por un verdeo de trigo con consumo a voluntad. El aceite de pescado fue desodorizado y saborizado para mejor aceptación. En ambos tratamientos, los aceites fueron suministrados en mezcla con el grano de maíz y las cabras se racionaron en forma individual atadas en estacas y utilizando potes

separados.

Tabla 1: Composición en ácidos grasos del aceite de pescado y de girasol utilizado en la suplementación de las cabras experimentales.

Ácido graso %	Aceite de pescado	Aceite de girasol
C14:0	3,77 (±0,76)	
C14:1		
C15:0	0,62 (±0,00)	
C15:1	0,40 (±0,38)	
C16:0	19,02 (±2,82)	5,8 (±0,07)
C16:1	5,78 (±0,62)	
C16:2		
C16:3		
C17:0	0,45 (±0,057)	
C17:1	0,45 (±0,049)	
C18:0	3,06 (±0,198)	3,2 (±0,00)
C18:1	24,57 (±1,04)	32,6 (±0,32)
C18:2 n6	17,04 (±0,969)	55,2 (±0,16)
C18:3 n3	1,49 (±0,035)	0,3 (±0,02)
C18:4 n3	2,58 (±2,55)	
C20:4 n3	1,12	
C20:5 n3 (EPA)	6,71 (±0,24)	
C22:6 n3 (DHA)	11,02 (±1,259)	
Total AG saturados	26,92	9,00
Total AG insaturados	71,16	88,1
Total n-6	17,04	55,2
Total n-3	22,92	0,3
Relación n-6/n-3	0,74	184

Al final del periodo de alimentación experimental (día 20) se tomaron muestras adicionales de leche de cada cabra para la determinación del perfil de ácidos grasos en leche.

La metodología de análisis se desarrollo en base a antecedentes que están incluidos en la Norma IRAM 5650 Parte II. La extracción de la grasa butirosa se realizó colocando partes iguales de leche cruda y de una solución de un agente tensioactivo compuesta por 12 ml de Tritón X-100, 50 ml de alcohol isopropílico, 2,5 g de urea, 25 g de hexametáfosfato de sodio y la cantidad de agua destilada cantidad necesaria para preparar 500 ml de solución. La extracción fue llevada a cabo en una estufa a una temperatura de 90 °C. La capa superior o fase grasa obtenida fue removida de la capa acuosa y transferida a un vial de almacenamiento. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron obtenidos a partir de 45 mg de grasa butirosa agregando a la misma 0,3 ml de una solución al 10% de metóxido de sodio en metanol.

El proceso de metilación y esterificación se llevo a cabo en un baño de agua a 67°C en agitación constante durante un minuto para permanecer luego en reposo durante tres minutos más a la misma temperatura. Posteriormente se agregó a la muestra una mezcla (1:1) de cloruro de calcio y sílica gel y se agitó en un dispositivo Vortex. Se incorporaron 1,5 ml de disulfuro de carbono y se centrifugó durante 10 min. a 1800 rpm. El sobrenadante

fue transferido a un vial de vidrio quedando listo para su análisis por cromatografía gas-líquida. Para tal fin se inyectó 1 µl de cada muestra en un cromatógrafo gaseoso (Agilent 6890 series plus) sobre una columna capilar (Restek 2340, 60m x 0,25mm x 0,2 µm). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: temperatura inicial del horno 180 °C durante 19 minutos, con rampa de 5 °C/min. hasta alcanzar una temperatura final de 215 °C durante 4 minutos. Se utilizó nitrógeno como gas carrier con un flujo de 20 ml/min. La temperatura del inyector fue de 250°C y la del detector de ionización de llama (FID) fue mantenida a 300 °C.

Los isómeros individuales de CLA (cis9,trans11-18:2; trans10,cis12-18:2; trans9,trans11-18:2; cis9,cis11-18:2) fueron identificados utilizando estándares específicos provistos por Matreya Inc. (Cat# 1255; 1254; 1257; 1256). Los estándares individuales para el trans-C18:1, C20:4, C20:5 y C22:6 fueron comprados a Sigma (cat# V1381; A9298; E2012; D2659).

Los resultados se expresan en gramos de cada ácido graso/100 g del total de ácidos grasos (porcentaje en peso).

Resultados

El aceite de pescado presentó valores moderados de EPA y de DHA con un porcentaje alto de C18:2n6. La composición en ácidos grasos del aceite de pescado puede variar en función a la época del año, la especie utilizada y el proceso de elaboración.

Desde el punto de vista de maximizar las concentraciones de CLA en leche, la presencia de C18:2n6. en el aceite de pescado resulta favorable e inclusive aconsejable ya que parte del C18:2n6 será transformado directamente en CLA y en el isómero precursor (el trans 11-C18:1) a nivel ruminal. El aceite de girasol presentó valores normales de C18:2 n6.

El perfil inicial y final de ácidos grasos en la leche obtenidos para cada tratamiento se presenta en el Tabla 2.

Las concentraciones de CLA en leche resultaron fuertemente incrementadas ante el aporte de aceite de pescado (+592% respecto a basal, y ante la combinación de ambos aceites (860%) respecto al nivel de pre-suplementación. El CLA representa un compuesto intermedio en la hidrogenación ruminal del ácido linoleico (cis-9, cis-12 C18:2) a ácido esteárico (C18:0). El ácido trans-11 C18:1 (o ácido vaccénico) resulta un intermediario común en la biohidrogenación del ácido linoleico. La reducción ruminal del trans-11 C18:1 es incompleta y conduce a una acumulación del compuesto.

El paso final en la biohidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados es la producción de ácido esteárico (C18:0).

Tabla 2: Composición en ácidos grasos de leche de cabras suplementadas con 30 ml de aceite de pescado (T1) y con aceite de pescado (30 ml) más aceite de girasol (150 ml) (T2).

Ácido graso (%)	T1 Inicial	T1 Final	T2 Inicial	T2 Final
C6:0	1,81	1,7	1,68	1,55
C8:0	2,41	2,79	2,1	2,42
C10:0	9,1	11,19	8,13	8,41
C10:1	0,35	0,72	0,34	0,37
C12:0	4,28	6,9	3,89	3,86
C12:1	0,12	0,16	0,11	0,04
C14:0	10,97	11,51	10,95	8,5
C14:1 + isoC15 :0	0,79	0,56	0,68	0,41
C15:0	1,38	1,85	1,39	1,07
C15:1	0,27	0,25	0,27	0,16
C16:0	29,26	27,18	31,01	21,68
C16:1	1,5	2,3	1,61	1,12
C17:0	0,99	1,23	0,95	0,7
C17:1	0,35	0,33	0,37	0,2
C18:0	8,33	1,15	8,02	1,93
C18:1trans	1,42	7,02	1,38	19,25
C18:1	20,36	8,4	20,82	9,98
C18:2	1,44	1,44	1,48	1,89
C18:3	0,62	0,34	0,61	0,2
CLA				
9 cis 11trans	0,89	6,16	1,03	9,89
10 trans, 12 cis	-	-	0,01	-
9 cis, 11 cis	0,02	0,03	0,05	0,05
9 trans, 11 trans	-	0,05		0,11
Total CLA	0,91	6,24	1,09	10,05
C20:4	0,12	0,27	0,13	0,22
C20:5 n3 (EPA)	0,07	0,27	0,09	0,1
C22:6 n3 (DHA)	0,06	0,52	0,06	0,2

La ausencia de un incremento significativo en la concentración de C18:2 en leche ante el aporte suplementario de aceite de girasol (55% de C18:2n 1) sugiere una importante actividad de biohidrogenación ruminal del compuesto.

La drástica disminución en la concentración en leche del ácido esteárico (C_{18:0}) en ambos tratamientos y el incremento significativo en la concentración láctea de trans-C_{18:1} sugieren que el aceite de pescado resultó efectivo como inhibidor a nivel ruminal de la biohidrogenación completa de trans-C_{18:1} a C_{18:0}.

El aceite de pescado es rico en ácidos grasos de tipo C₂₀ - C₂₂ incluyendo a los ácidos n-3 eicosapentanoico (EPA, C_{20:5} n-3) y

docosahexanoico (DHA, C_{22:6} n-3) (Cuadro 1) que inhibirían la acción de las reductasas. El ácido n-3 DHA sería el principal compuesto activo presente en el aceite de pescado que favorece la acumulación del trans-C_{18:1} en el rumen y la presencia de alguna fuente de ácido linoleico (aceite de girasol o de soja) amplificaría el citado efecto.

En el presente trabajo, una mayor disponibilidad del precursor del CLA a nivel mamario (el trans-C_{18:1}) explicaría el enorme impacto del aceite de pescado sobre la concentración de CLA en la leche de las cabras del T1 ya que ambos ácidos grasos correlacionaron positivamente.

Los resultados del presente ensayo confirman que la cabra responde de manera contundente a la suplementación lipídica en cuanto a la concentración de CLA en la leche. En efecto, concentraciones de CLA de hasta un 5,1% han sido observadas en respuesta a la suplementación con aceite de girasol al 6% de la ración en ausencia de aceite de pescado.

El rango de concentración en leche de trans-C_{18:1} y el de CLA resultó muy amplio. Ello implica poder ajustar la suplementación de la cabra a fines de lograr la mejor relación entre ambos o ajustar la concentración individual de cada uno a través del manejo nutricional de los animales.

Se ha postulado que un consumo diario de 0,8 g/día de CLA podría ejercer un efecto terapéutico sobre el cáncer en una persona de unos 70 kg. de peso vivo. Cabe comentar que el consumo juzgado preventivo de CLA sería aún unas diez veces menor al enunciado. Los efectos reductores sobre la aterosclerosis se alcanzarían a partir de consumos diarios cercanos a los 0,25 g de CLA y los efectos adelgazantes o anti-obesidad de los CLA no están claramente establecidos ni aceptados en el ser humano

Conclusiones

La suplementación de la cabra con aceite de pescado sólo o combinado con aceite de girasol resultó una estrategia efectiva para obtener naturalmente leches y derivados lácteos diferenciados por sus propiedades potencialmente benéficas para el ser humano.

El aporte simultáneo de ambos aceites permitió obtener una leche de muy alta concentración en CLA y en trans-C_{18:1} disminuyendo a su vez en forma significativa el índice de aterogenicidad del producto.

Esta leche permitiría satisfacer la dosis de CLA sugerida como potencialmente anticancerígeno y antiaterogénica en el ser humano a un bajo consumo diario de producto.

La cantidad más adecuada de aceite de girasol capaz de mejorar la relación CLA/trans-C_{18:1} en leche merece ser determinada experimentalmente.

El suministro de aceite de pescado como único suplemento lipídico permitió incrementar significativamente las concentraciones de CLA en leche con una mejor relación CLA/trans- C18:1 y un enriquecimiento relativamente bajo de los ácidos grasos de la serie omega tres (EPA y DHA). Puesto que el rango de concentración en leche de trans-C18:1 y el de CLA en las cabras suplementadas resultó muy amplio resultaría factible ajustar la suplementación de la cabra a fines de lograr la mejor relación entre ambos compuestos o ajustar la concentración individual de cada uno a través del manejo nutricional de los animales. Resultará necesario conocer si ciertos ácidos grasos de configuración trans cuya concentración resulta aumentada por la suplementación con aceites son realmente desaconsejados para la salud de los consumidores.

Referencias

- AbuGhazaleh, A.A. and Jenkins, T.C. 2004. Short communication: docosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 87, 1407-1050.
- Baer, R.J., Ryali, J., Schingoethe, D.J., Kasperson, K.M., Donovan, D.C., Hippen, A.R. and Franklin, S.T. 2001. Composition and properties of milk and butter from cows fed fish oil. *J. Dairy Sci.* 84, 345-353.
- Bernard, L., Leroux, C. and Chilliard, Y. 2005. Characterisation and nutritional regulation of the main lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. Book of conferences of the 10. International Symposium on Ruminant Physiology, Copenhagen (DK), 2004, 30 August - 4 September. In: K. Sejrsen, T. Hvelplund and M.O. Nielsen (Eds), *Ruminant physiology: Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*. Wageningen Academic Publishers (NL). (In press).
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R.M. and Doreau, M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.* 49, 181-205.
- Chilliard, Y., Ferlay, A. and 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. *Liv. Prod. Sci.*, 70,31-48.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J. and Lamberet, G. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science*, 86,1751-1770.
- Chilliard, Y. and Ferlay, A. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 467-492.
- Chilliard, Y., Rouel, J., Ferlay, A., Bernard, L., Gaborit, P., Raynal-Ljutovac, K. and Lauret, A. 2005. Effects of type of forage and lipid supplementation on goat milk fatty acids and sensorial properties of cheeses. In: "Future of the Sheep and Goat Dairy Sector", Special issue of the International Dairy Federation, No 0501/part 5, 297-304.
- Chilliard, Y., Rouel, J., Ferlay, A., Bernard, L., Gaborit, P., Raynal-Ljutovac, K., Lauret, A. and Leroux, C. 2006. Optimising goat's milk and cheese fatty acid composition. Chapter 12 in "Improving the fat content of foods", Woodhead Publ. Ltd. (UK), 281-312.
- Donovan, D.C., Schingoethe, D.J., Baer, R.J., Ryali, J., Hippen, A.R. and Franklin, S.T. 2000. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83, 2620-2628.
- Doreau, M., Chilliard, Y., Rulquin, H. and Demeyer, D.I. 1999. Manipulation of milk fat in dairy cows. In: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds.). *Recent advances in animal nutrition* Nottingham University Press, Nottingham, pp.81-109.
- Gagliostro, G.A. 2004. Control nutricional del contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche y su presencia en alimentos naturales funcionales. 1. Efectos sobre la salud humana. *Rev.Arg.Prod.Anim.* 24(3-4): 113-136.
- Gagliostro, G.A.; Rodríguez M.A., Pelegrini P.; Gatti P; Museo G; Castañeda RA; Colombo D y Chillirad Y. Efectos del suministro de aceite de pescado solo o en combinacin con aceite de girasol sobre las concentraciones de ácido linoleico conjugado (CLA) y omega 3 en leche de cabra. *Revista Argentina de Producción animal* 26 – 2006
- Griinari, J.M., Dwyer, D.A., McGuire, M.A., Bauman, D.E., Palmquist, D.L. and Nurmela, K.V.V. 1998. Trans octadecaenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 81, 1251-1261.
- Griinari, J.M. y Bauman, D.E. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. Pages 180-20- 0 en *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Volume 1. M.P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J.K.G. Framar, M.W. Pariza and G.J. Nelson, eds. AOCS Press, Champaign, IL.
- Holman, R.T. 1998. The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health. *J. Nutr.* 128, 427S-433S. Ip, C., Banni, S., Angioni, E. Carta, G., McGinley, J., Thompson, H.J., Barbano, D. y Bauman D. 1999. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.* 129:2135-2142.
- Kitessa, S.M, Gulati, S.K., Ashes, J.R., Fleck, E., Scott, T.W. and Nichols, P.D. 2001. Utilisation of fish oil in ruminants. II. Transfer of fish oil fatty acids into goat's milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* 89,201-208.
- Loor, J.J., Ferlay, A., Ollier, A., Ueda, K., Doreau, M. and Chilliard, Y. 2005a. High-Concentrate Diets and Polyunsaturated Oils Alter Trans and Conjugated Isomers in Bovine Rumen, Blood, and Milk. *Journal of Dairy Science.* 88. 3986-3999.
- Loor, J.J., Doreau, M., Chardigny, J.M., Ollier, A., Sebedio, J.L. and Chilliard, Y. 2005b. Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of transfatty acids and conjugated linoleic acid

Para mayor información contactarse con:
M. Alejandra Rodriguez – alerod@inti.gov.ar