

Importancia de los ácidos grasos omega-3 en la nutrición materno infantil. Estrategias de preservación de omega-3 en la leche materna.

Relevance of omega-3 fatty acids in maternal & child nutrition. Strategies for omega-3 conservation in breast milk.

Trabajo de Fin de Grado

ANYA TRUJILLO GONZÁLEZ

Tutorizado por Dra. Ana Bolaños Martín y Lic. Sara García Ravelo.

Grado en Biología. Junio 2017.

ÍNDICE

RESUMEN	1
<i>Palabras clave</i>	1
ABSTRACT	2
<i>Keywords</i>	2
INTRODUCCIÓN	3
<i>Lípidos, ácidos grasos esenciales y derivados de cadena larga</i>	4
<i>Lipasas</i>	7
<i>Peroxidación lipídica</i>	8
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
<i>Obtención y procesamiento de las muestras</i>	12
<i>Análisis bioquímicos de las muestras</i>	13
<i>Extracción de lípido total</i>	13
<i>Determinación de clases lipídicas</i>	13
<i>Determinación de proteínas</i>	14
<i>Determinación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)</i>	15
<i>Análisis estadístico</i>	16
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	24
CONCLUSIONS	25
BIBLIOGRAFÍA	26

RESUMEN

La leche materna es el compuesto alimenticio que proporciona al recién nacido nutrientes para su crecimiento y desarrollo, ofreciendo protección contra patologías propias del lactante. La lactancia materna debe continuar presente aunque existan causas que lo impidan como la incorporación materna a la vida laboral o el ingreso hospitalario de neonatos. Un atributo nutricional de la leche materna es su perfil lipídico que aporta energía y, especialmente, su contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) n-6 y n-3, esenciales para el desarrollo del cerebro y de la retina.

El objetivo del presente ensayo ha sido evaluar el efecto de la refrigeración prolongada de leche materna fresca sobre su contenido en lípido y proteína, perfil de clases lipídicas y el estado oxidativo de los lípidos. Muestras de leche materna de madres donantes fueron almacenadas en nevera a 4⁰C y tras 0, 24 y 72 horas de almacenamiento, se analizó su contenido de lípido total y proteína, clases lipídicas y niveles de TBARs (especies reactivas al ácido tiobarbitúrico) como indicador de la peroxidación lipídica.

Los resultados mostraron que la refrigeración prolongada de la leche materna no produjo cambios significativos en su contenido de lípido total, proteínas y niveles de TBARs. Sin embargo, en la leche refrigerada durante 72 horas se obtuvo un incremento progresivo y significativo de los niveles de diacilglicéridos (DAG), ácidos grasos libres y colesterol, así como un descenso del contenido en triglicéridos (TG). Estos resultados si bien indican una lipólisis de la grasa láctea, no muestran signos de degradación oxidativa. Por tanto, este hallazgo señala que la leche almacenada bajo las condiciones antes descritas, mantiene sus cualidades para ser administrada al lactante.

PALABRAS CLAVE: lactancia materna, leche humana, almacenamiento refrigerado, ácidos grasos, peroxidación lipídica.

ABSTRACT

Breast milk provides benefits for a proper newborn growth and development, offering protection against typical infant's pathologies. Breastfeeding should continue even if there are interferences including return to work of mother or newborns hospitalization. Breast milk lipid profile is the nutritional component which supplies energy, and especially important is its n-6 and n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) content due to its essential role in brain and retinal development.

The objective of the present study was to evaluate the effect of prolonged refrigeration of fresh human milk on its total lipid and protein content, lipid profile, and lipids oxidative status. Breast milk samples from donor mothers were stored under refrigeration at 4°C and after 0, 24 and 72 hours were analyzed its total lipid and protein content, lipid class composition and TBARs levels as lipid peroxidation indicator.

The results showed that prolonged refrigeration did not affect the total lipid and protein concentration and preserved its lipid oxidative status. However, breast milk lipid profile after 72 hours at 4°C indicate a progressive and significant increase of diacylglycerides (DAG), free fatty acids and cholesterol levels, as well as a decrease of triglyceride (TG) content. So, the prolonged refrigeration of fresh human milk for 72 hours despite indicates a limited lipolysis during storage, no exhibit signs of lipid oxidative degradation. This finding indicates that milk stored under the described conditions maintained its overall qualities suitable for infant feeding.

KEYWORDS: breastfeeding, human milk, refrigerated storage, fatty acids, lipid peroxidation.

INTRODUCCIÓN

La leche materna es un fluido biológico que contiene una gran disponibilidad de nutrientes, bajo contenido antigénico y numerosos componentes bioactivos, para cubrir todos los requerimientos nutricionales e inmunológicos del lactante y asegurar su correcto crecimiento y desarrollo **(1)**.

En la producción de leche materna se puede distinguir: la leche de pretérmino (producida en caso de parto prematuro), el calostro (producido entre 3 y 4 días después del parto), la leche de transición (producida entre el 4º y el 15º día postparto) y la leche madura (producida a partir de los 15 días postparto) **(2)**. El calostro posee gran cantidad de inmunoglobulinas, en especial inmunoglobulina A (IgA), lactoferrina, linfocitos, macrófagos, oligosacáridos, citoquinas y otros factores defensivos. Además, es rico en factores de crecimiento que estimulan la maduración del aparato digestivo y de los sistemas de defensa **(1)**. La leche de transición se considera de composición intermedia porque va variando día a día hasta alcanzar la condición de leche madura. Esta última posee una composición compleja que cambia dentro de la toma, a lo largo del día, entre ambas mamas y entre diferentes madres **(2)**. Aporta beneficios nutricionales e inmunológicos al neonato, no solo en periodo de lactancia, sino a lo largo de su vida **(3)**.

La leche materna madura es una mezcla homogénea estructurada en tres fases: la fracción emulsión que contiene glóbulos de grasa (crema de la leche), la fracción suspensión formada por micelas de caseína y la fracción solución compuesta por constituyentes hidrosolubles (suero de la leche) **(4)**. La cantidad de estos componentes oscila dentro de las diferentes etapas de la lactogénesis y a lo largo de una toma completa, con lo que el lactante recibe un producto dinámico y variable de características distintas adaptadas a sus necesidades **(1)**.

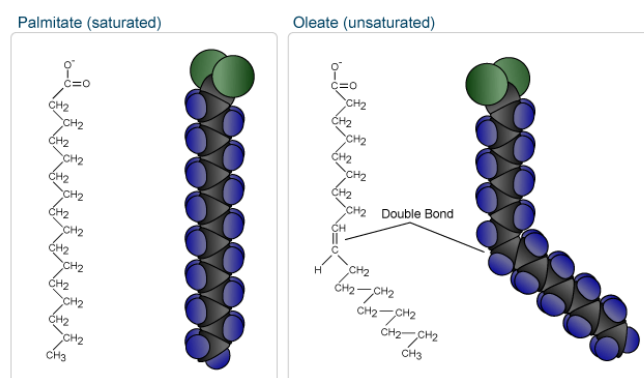
La leche materna madura consta principalmente de un 88% de agua. Las proteínas que la conforman son un 30% de caseína (micelas complejas de caseinato y fosfato de calcio) y un 70% de proteínas del suero (alfa-lactoalbúminas, seroalbúmina, beta-lactoglobulinas, inmunoglobulinas, glicoproteínas, lactoferrina, lisozimas, enzimas, moduladores de crecimiento, hormonas y prostaglandinas). El principal hidrato de carbono que contiene es la lactosa, la cual facilita la absorción de calcio y hierro, componentes imprescindibles en el crecimiento y desarrollo del bebé. Entre los diferentes oligosacáridos destaca la galactosa y el ácido siálico por su implicación en el desarrollo cerebral **(5)**.

Las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) varían con la concentración de la grasa de la leche, mientras que las vitaminas hidrosolubles y los minerales (fósforo, hierro, zinc, etc.) están relacionados con la ingesta materna **(1)**.

Los lípidos son la principal fuente de energía y componente más variable que contiene la leche materna. Su concentración va aumentando hasta 15 días después del parto y manteniéndose luego relativamente estable durante el todo el periodo de lactancia. Los principales lípidos que la conforman son los triglicéridos (TG), los fosfolípidos, los ácidos grasos y el colesterol (1). Estos son secretados como glóbulos de grasa y están constituidos por un 98% de TG y recubiertos por una membrana hidrofílica que contiene colesterol, fosfolípidos y glicoproteínas. Dentro de los ácidos grasos encontramos una composición relativamente estable de un 43% de ácidos grasos saturados y un 57% de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (1).

Lípidos, ácidos grasos esenciales y derivados de cadena larga

Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas con carácter hidrofóbico y solubles en disolventes orgánicos, siendo los más simples los ácidos grasos que se componen de un grupo hidrofílico unido a un extremo de una cadena hidrocarbonada. Se clasifican en función de su longitud de cadena, de su grado de saturación y de su posición en dobles enlaces. Normalmente, presentan un número par de átomos de carbono (12-14) y pueden ser saturados si los átomos de carbono están unidos por enlaces covalentes o insaturados si contienen uno o varios dobles enlaces; recibiendo los nombres de monoinsaturados o poliinsaturados, respectivamente. Dentro de los AGPI, se consideran altamente insaturados los formados por 20 o más átomos de carbono y con 3 o más dobles enlaces (Highly Unsaturated Fatty Acids (HUFAs)) también llamados Long-Chain PolyUnsaturated Fatty Acids (LC-PUFAs). La posición del doble enlace más cercano al grupo metilo terminal, determina la serie (n) u omega (ω) 3, 6, 7 ó 9. Aquellos ácidos grasos que presentan una cabeza polar en contraposición a una cola hidrocarbonada hidrófoba, son los lípidos polares y aquellos carentes de grupos polares son los lípidos neutros (3) (Figura 1).



Dept. Biol. Penn State ©2002

Figura 1. Izquierda: ácido graso saturado (palmitato). Derecha: ácido graso insaturado (oleato).

Se diferencian los ácidos grasos esenciales que no son sintetizados de *novo* por el ser humano, como el ácido linoleico (linoleic acid (LA)) y ácido α -linolénico (linolenic α -acid (LNA)) que son los precursores del ácido araquidónico (AA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) **(3)**. La síntesis de los AGPI tiene lugar a nivel microsomal y/o mitocondrial, a través de la acción de enzimas elongasas y desaturasas que se encargan de la adición de átomos de carbono y dobles enlaces a la cadena hidrocarbonada. A partir del ácido oleico (C18:1n-9) por la acción de las enzimas delta-12 (Δ 12) y delta-15 (Δ 15) desaturasa, tiene lugar la formación del LA y LNA que son precursores de los AGPI esenciales de la serie n-6 y n-3, respectivamente. Esto sucede en algunas plantas y microorganismos. Y a partir de dichos precursores, tras varios procesos de elongación-desaturación en los que intervienen las enzimas delta-6 (Δ 6) y delta-5 (Δ 5) desaturasa, se obtiene el AA, EPA y el DHA **(6)** (Figura 2). Se establece que las tasas de conversión del LA hasta AA y de LNA hasta DHA, están influenciadas por diversos factores como la genética, el sexo y la cantidad de ácido graso precursor en la dieta **(8)**.

Debido a que los seres humanos carecen de Δ 12 y Δ 15 desaturasa, y que la capacidad de síntesis de los HUFAs (AA, EPA y DHA) a partir de sus precursores de cadena corta (LA y LNA) es sólo entorno a un 0,1%, estos ácidos grasos esenciales deben ser suministrados a través de la dieta al igual que sus derivados de cadena larga, especialmente, durante el embarazo y la lactancia **(7)**, sobre todo en este último periodo debido a que el cerebro del neonato está en periodo de máximo desarrollo y se programa también su metabolismo **(8)**.

Las enzimas responsables de la elongación y desaturación de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) están presentes de forma muy precoz en el hígado fetal, pero con una baja actividad. Los AGPI-CL de las series n-6 y n-3 que el feto capta intraútero derivan del transporte placentario, lo cual depende de las concentraciones de estos ácidos grasos que tenga la madre procedentes de su dieta. Durante los primeros días de vida comienza la síntesis endógena de los AGPI-CL a partir de los precursores provenientes de la dieta, con una variación individual considerable, tanto en recién nacidos a término como recién nacidos pretérmino.

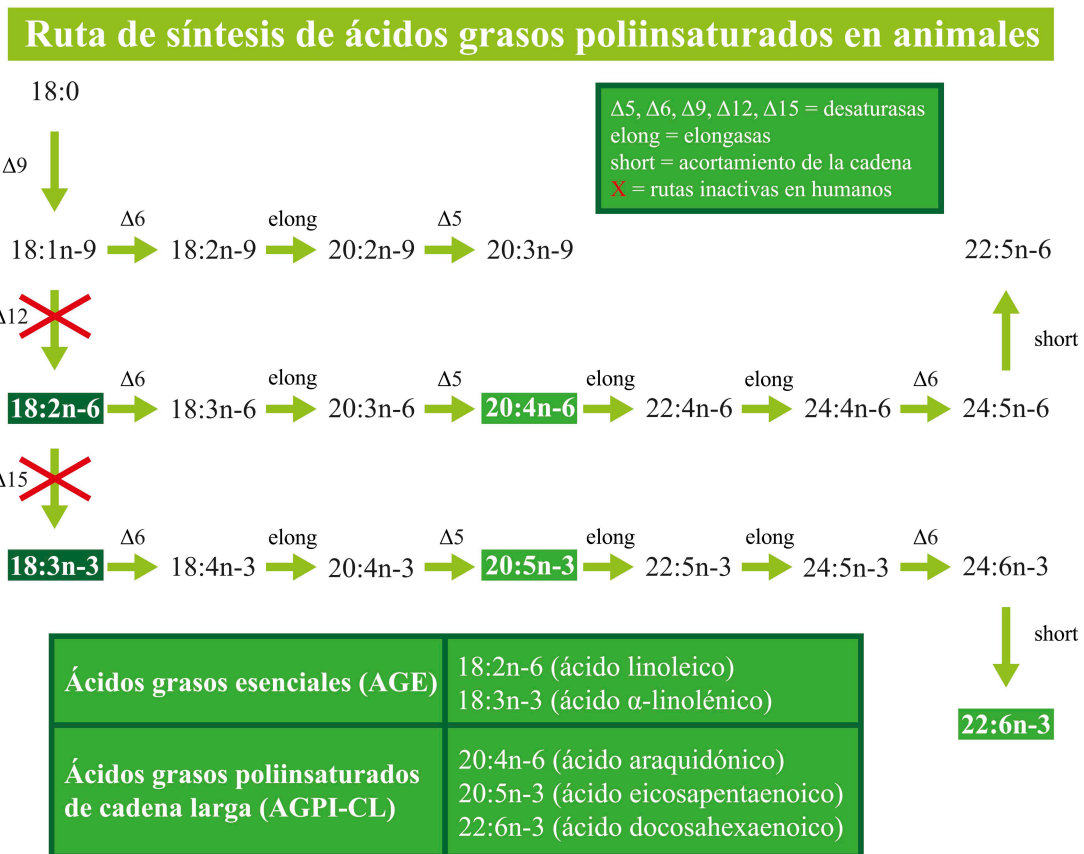


Figura 2. Ruta de síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en animales.

Los AGPI-CL están localizados en órganos de gran importancia como el cerebro, el cerebelo y la retina, y también en los fosfolípidos de la bicapa lipídica de todas las membranas celulares, cuya participación se extiende a todas sus funciones, señales hormonales, actividad de receptores y regulación de la expresión génica (8). Concretamente, el DHA actúa en el desarrollo estructural y funcional de los sistemas visual-sensorial, perceptual y cognitivo del lactante. Este junto con el EPA activan los receptores de proliferación de peroxisomas que controlan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos, la glucosa, la adipogénesis (3,8) y la formación de ácidos biliares (15).

A partir de ácidos grasos de 20 átomos de carbono como el AA y el EPA, se forman unos derivados lipídicos bioactivos con importantes funciones fisiológicas: los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) (3). Donde las prostaglandinas y leucotrienos de la familia n-6 (derivados del AA) se comportan como factores proinflamatorios y los de la familia n-3 (derivados del EPA) como antiinflamatorios (8). Estos mediadores lipídicos bioactivos, tienen funciones sobre la inmunidad (linfocitos, células asesinas, citosinas,

inmunoglobulinas E (IgE) **(3)**, la coagulación sanguínea, la tensión arterial, la vasoconstricción y la vasodilatación (respuesta inflamatoria), el edema, la agregación plaquetaria y el remodelado óseo **(8)**. Además, a partir del DHA también se producen resolvinas y protectinas con importantes funciones inmunológicas **(9)**.

Durante la gestación existe una estrecha correlación entre los ácidos grasos esenciales de la madre y del neonato, debido a que estos disminuyen en la madre de forma continua conforme avanza el embarazo, mientras que en el feto van aumentando con la edad gestacional. De tal forma que la suplementación de la gestante con DHA, determina un incremento de las concentraciones de este ácido graso en su leche **(8)**.

Lipasas

La leche materna contiene al menos dos lipasas de TG, la lipasa estimulada por suero o más conocida como lipoproteínlipasa (LPL) que se encuentra en la fracción emulsión (crema de la leche), y la lipasa estimulada por sales biliares (bile salt stimulate lipase (BSSL)) que se localiza en la fracción solución (suero) y se activa en el tracto digestivo del lactante **(22,23)**. Aunque por sí sola la LPL no es muy eficaz *in vitro*, se ayuda de las lipasas preduodenales (lingual y gástrica), actuando en condiciones de pH bajo. Ambas enzimas se inactivan cuando llegan al duodeno del lactante, donde la BSSL presenta una actividad mayor en la digestión de la grasa láctea **(38)**.

La LPL ejerce su función en primera instancia en la glándula mamaria en el proceso de la lactogénesis, liberando ácidos grasos y monoacilglicéridos (MAG) de los TG circulantes maternos, para posteriormente ser incorporados a la fracción lipídica de la leche, sin función conocida en la digestión neonatal **(3,10,23)**. En contraposición, la BSSL se activa en el intestino del lactante por las sales biliares primarias colato y chenodeoxicolato, ejerciendo una función de ayuda a la digestión de la grasa hidrolizando los TG, dando lugar a diacilglicéridos (DAG) y MAG debido a la rotura de los enlaces ésteres y, en consecuencia, ácidos grasos libres que serán absorbidos en el intestino del lactante **(1,2,23)**.

El lactante consume una dieta alta en grasa en un periodo de inmadurez de secreción de lipasa pancreática y conjugación de sales biliares. Las enzimas lipasas son esteroespecíficas y por tanto los tres enlaces éster de los TG no son igualmente susceptibles a la hidrólisis. La lipólisis preferente en las posiciones Sn1 en los TG es una característica esteroespecífica común de algunas lipasas, incluida la LPL, la cual ataca preferiblemente el enlace éster primario **(17,35)**. La actividad de esta enzima es inhibida por sales biliares, por lo que parece improbable que tenga alguna función fisiológica en la digestión de la grasa intestinal infantil.

Aún así, este proceso se compensa con la acción de la BSSL en el intestino del lactante mediante la hidrólisis de los TG en sus tres posiciones (Sn1, Sn2 y Sn3), mejorando la absorción de grasas y facilitando la digestión **(11,23,41)**.

Por otra parte, la leche humana contiene una esterasa independiente de sales biliares que es responsable de un 3,3% de la actividad esterásica total, cuya actividad incrementa ligeramente con el almacenamiento en frío **(19)**. Se ha podido demostrar que estas enzimas lácteas tienen una secuencia génica idéntica a la esterasa de colesterol pancreática **(51)**.

Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es uno de los procesos de oxidación más importantes que se desencadenan en el organismo, por acción directa del oxígeno o de otros agentes oxidantes sobre los AGPI de la membrana celular. Este mecanismo genera daños directos en la misma y en los orgánulos celulares, liberando radicales libres y formando productos de carácter tóxico como el malonaldehído (MDA) **(13)**, un pigmento rosa cristalino que se forma cuando los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos (productos de la lipoperoxidación) reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) **(14)**.

Para prevenir los procesos de oxidación, la leche materna contiene un gran número de antioxidantes de tipo enzimático (catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx)) y no enzimático (albúminas, bilirrubina, cisteína, ácido úrico, coenzima Q₁₀, lactoferrina y vitaminas A, C y E) **(14)**. El contenido de antioxidantes de la leche materna madura depende de factores maternos como la edad y el número de gestas, la dieta, la frecuencia de la lactancia, el estado de salud, la medicación o el entorno. Los neonatos están expuestos a un gran estrés oxidativo debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el parto, por la disminución de los componentes de la barrera antioxidante como la vitamina E o GPx, aunque la actividad de las enzimas antioxidantes se ven incrementadas durante la lactancia **(16)**.

Ciertos estudios señalan que la refrigeración y la congelación de la leche materna causan una disminución significativa de los niveles de los antioxidantes individuales, incluyendo la vitamina A, C y E **(18)**. Sin embargo, en otros casos se apunta a una conservación de estatus antioxidante de la leche materna refrigerada **(10)**.

La oxidación de la grasa láctea requiere la hidrólisis previa de los TG y la liberación de ácidos grasos libres mediante la acción de enzimas lipasas, dando lugar a un descenso de pH **(14)**. Este proceso genera una fuente de energía metabólica ya que los ácidos grasos de cadena corta y media se utilizan para obtener energía. Mientras que los ácidos grasos de cadena larga

son ampliamente utilizados para la síntesis de membranas celulares y moléculas bioactivas, como lipoxinas, resolvinas, protectinas y maresinas (9,23). Sin embargo, estos AGPI donde incluimos el AA, EPA y DHA, son altamente susceptibles a la oxidación (12). Los radicales libres, como el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), atacan lípidos que contienen dobles enlaces carbono-carbono mediante la extracción de un hidrógeno de un carbono con la inserción de un oxígeno, resultando radicales de peróxido lipídico e hidroperóxidos. Este proceso inicia la oxidación de la cadena de fosfolípidos poliinsaturados que conduce a un deterioro de la función de la membrana (12,21).

El proceso general de la peroxidación lipídica ocurre en tres etapas: iniciación, propagación y terminación. En la fase de iniciación los prooxidantes como el $\text{HO}\cdot$ reducen el hidrógeno alílico formando el radical lipídico ($\text{L}\cdot$) centrado en el carbono. En la fase de propagación el $\text{L}\cdot$ reacciona rápidamente con el oxígeno para formar un radical peróxido lipídico ($\text{LOO}\cdot$) que a su vez extrae un hidrógeno de otra molécula lipídica, generando un nuevo $\text{L}\cdot$ y un hidroperóxido lipídico ($\text{LOOH}\cdot$), dando lugar a una reacción en cadena de oxidación de los AGPI. Sin embargo, este proceso puede ser frenado (fase de terminación) mediante la acción de antioxidantes como la vitamina E (Figura 3) (12,21).

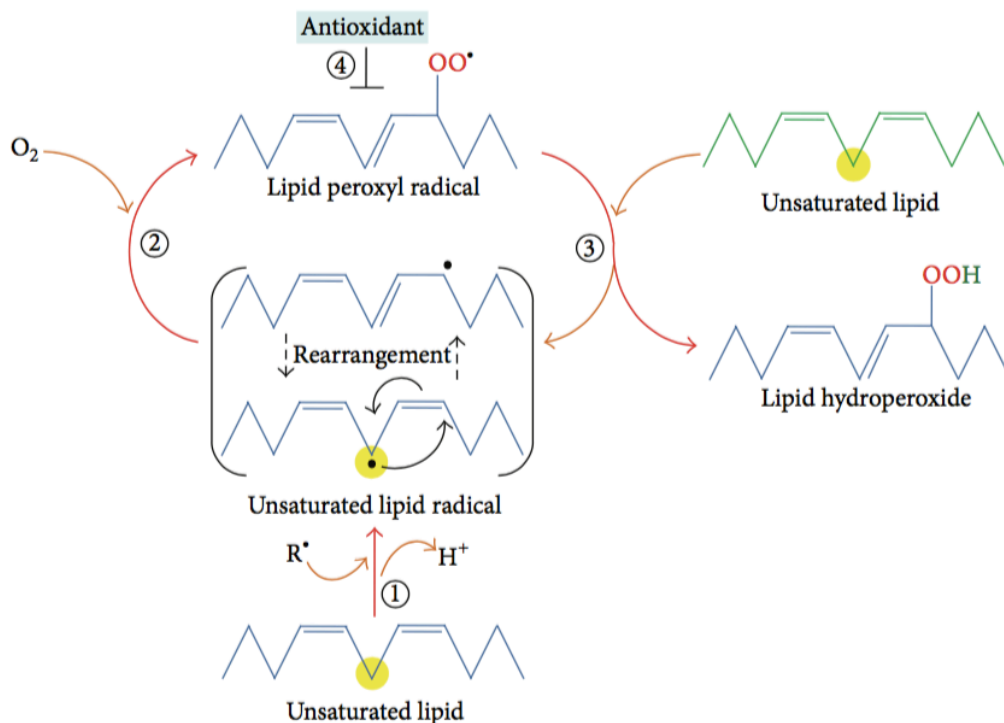


Figura 3. Proceso de peroxidación lipídica.

La reacción de oxígeno con los lípidos insaturados produce una amplia variedad de productos de oxidación. Los principales productos de la peroxidación lipídica son los LOOH· y aldehídos, y los secundarios son el MDA, el propanol, el hexanal y el 4-hidroxinonal (4-HNE). El MDA debido a su reacción con el TBA, ha sido utilizado como biomarcador de la peroxidación lipídica de AGPI omega-6 (ω -6) y omega-3 (ω -3). Considerándose por tanto, uno de los marcadores más populares y fiables que determina el estrés oxidativo en situaciones clínicas, debido a la alta reactividad y toxicidad que presenta **(12,21)**. El método analítico se basa en la reacción del MDA con el TBA, para formar aductos cromógenos y fluorescentes de MDA-TBA muy estables y que son cuantificables por espectrofotometría de absorción visible o por fluorimetría **(12, 21)**.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

La incorporación de las madres al mercado laboral, hace imprescindible la extracción de la leche y su posterior almacenamiento para continuar con la lactancia en su ausencia. Al igual que se desarrolla como una práctica clínica común en las unidades de cuidados intensivos neonatales (NICU), mayormente en lactantes prematuros y/o de bajo peso al nacer, por la vulnerabilidad que presentan. En estos casos, el correcto almacenamiento de la leche materna madura es esencial para garantizar su contenido y calidad, justificando los procesos de manipulación previa a la ingesta, con el fin de promover y asegurar la continuidad de la lactancia.

El contenido graso de la leche materna puede sufrir procesos de oxidación durante su almacenamiento en nevera. Este mecanismo requiere como paso previo la hidrólisis de los TG constituyentes y la liberación de los ácidos grasos por acción de las lipasas, enzimas presentes y activas en la leche humana, con la consiguiente liberación de AGPI altamente susceptibles a la peroxidación lipídica. Por tanto, si bien los protocolos de conservación de la leche materna aseguran su calidad para el consumo del lactante, es posible que la fracción lipídica pueda verse alterada por dicha causa. Considerando además la importancia de las funciones de los ácidos grasos esenciales de la serie ω -3 en las primeras etapas de la vida, nuestra hipótesis de trabajo postula que el contenido proteico y lipídico de la leche materna madura podrían verse afectados por su almacenamiento en nevera hasta un máximo de 72 horas, condiciones recomendadas en los protocolos de manipulación (24).

Objetivo general

El presente estudio tiene el propósito de evaluar el efecto de la refrigeración prolongada de leche materna fresca, sobre su composición proteica y lipídica, así como el estado oxidativo de los lípidos que la componen.

Objetivos específicos

1. Determinar si el almacenamiento de la leche materna madura a 4⁰C a tiempos 0, 24 y 72 horas desde su extracción, modifica el contenido proteico y lipídico, así como el perfil de clases lipídicas.
2. Evaluar la posible degradación de los lípidos lácteos a 0, 24 y 72 horas de almacenamiento, mediante la determinación de las especies reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARs), producto de la peroxidación lipídica y por ello considerado un buen marcador del proceso oxidativo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y procesamiento de las muestras

El presente estudio se llevó a cabo con leche materna madura donada por 10 mujeres voluntarias que acudieron a las instalaciones de BabyShower Tenerife S.L. (BabyShower) en La Gallega, Santa Cruz de Tenerife. Las muestras de leche fueron extraídas mecánicamente y almacenadas en recipientes estériles especializados con cierre hermético para seguidamente, tras su identificación, ser trasladadas en hielo y oscuridad al laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias (ULL), donde se procedió con los análisis (Figura 4).

Las participantes fueron informadas por escrito del interés y objeto de estudio, obteniendo un consentimiento informado de libre participación. A su vez, rellenaron un cuestionario con la finalidad de recoger datos maternos como edad, peso, altura y tiempo de lactancia, los cuales fueron firmados y archivados para su posterior consulta. Todos los tratamientos y procesados de las muestras cumplen la normativa vigente del Comité de Ética de la ULL y del ABM Clinical Protocol: Human Milk Storage Information for Home Use for Full-Term Infants of The Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee, 2010 (24).

En el laboratorio las muestras fueron alicuotadas y almacenadas en nevera a 4°C durante 0, 24 y 72 horas (n=10 por grupo) (Figura 5). A las correspondientes horas de mantenimiento en nevera, se procedió a realizar la extracción lipídica y el perfil de clases lipídicas, siendo las muestras de 0 horas, consideradas como control del experimento. Así mismo, de cada muestra de leche se obtuvieron alícuotas para determinar el contenido en proteína y los niveles de TBARs, a las respectivas horas de mantenimiento en nevera.



Figura 4. Recipiente recolector de leche. Figura 5. Proceso de alicuotado.

Análisis bioquímicos de las muestras

Extracción de lípido total

La composición química de las moléculas lipídicas determina el grado de solubilidad en solventes orgánicos, teniendo en cuenta el equilibrio que se genera entre dichos solventes y la polaridad de las mismas. Este hecho fundamenta gran parte de las técnicas metodológicas utilizadas para la óptima extracción lipídica y análisis, respectivamente **(25)**.

Los lípidos y en particular los AGPI, son moléculas con una alta susceptibilidad oxidativa, por lo que debe procurarse minimizar el riesgo de oxidación de las muestras. La congelación inmediata a -80°C de la leche materna madura y la conservación del lípido aislado a -20°C en condiciones de oscuridad y en atmósfera de N_2 , además del uso de antioxidantes, son algunos de los procedimientos básicos a poner en práctica en el proceso de extracción lipídica, para minimizar el riesgo de oxidación.

Los lípidos totales fueron extraídos según Christie (1982) **(25)** como modificación del método de Folch *et al.*, (1957) **(26)**. Las muestras con un volumen de 0,5 ml se disolvieron en una mezcla de cloroformo/metanol (2:1, v/v), conteniendo 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante. Tras la evaporación del solvente orgánico con flujo continuo de N_2 y sometimiento de las muestras a vacío durante toda la noche, el contenido de lípido total fue determinado gravimétricamente. Los lípidos aislados fueron resuspendidos en cloroformo/metanol (2:1, v/v) y conservados a -20°C en viales sellados bajo atmósfera de N_2 , hasta el momento de su análisis para la determinación de las clases lipídicas.

Determinación de clases lipídicas

La cromatografía en capa fina es el principal método utilizado para la separación analítica de clases lipídicas. Estas migrarán a diferentes alturas en función de su polaridad y de las diferentes interacciones establecidas entre la fase estacionaria y la fase móvil **(25)**.

Las clases lipídicas fueron determinadas por cromatografía en capa fina de alta resolución (High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)) de doble desarrollo **(27)**, para lo que se utilizaron placas de HPTLC de sílica gel 60 de 10 x 10 cm (Meck, Darmstadt, Alemania).

Para eliminar posibles impurezas que hubieran podido interferir en la correcta determinación de las clases lipídicas y con el fin de asegurar la completa deshidratación de la sílice, las placas fueron preparadas antes de su uso incorporando en toda su longitud 10 ml de cloroformo/metanol (2:1, v/v) y seguidamente se introdujeron en una estufa a 110°C durante 30 minutos.

A continuación se cargó en las placas una cantidad de lípido total de 30 μl por muestra. Para el desarrollo de los lípidos polares se utilizó una mezcla de solventes metil-

acetato/isopropanol/cloroformo/metanol/KCl 0,25% (25:25:25:10:9, v/v) y para el desarrollo de los lípidos neutros, una mezcla de hexano/dietil-éter/ácido acético (80:20:2, v/v). Una vez desarrolladas las placas con las dos mezclas de solventes, se tiñeron pulverizándolas con una solución de acetato cúprico al 3% en ácido ortofosfórico al 8% y, posteriormente, se introdujeron en una estufa a 160°C de 10 a 15 minutos. La cuantificación de las clases lipídicas se realizó utilizando el visualizador de imagen Camag TLC (Muttenez, Suiza) a una longitud de onda de 370 nm. Y para la identificación de cada clase lipídica se usaron estándares proporcionados por Sigma Co. (St. Louis, MO, EE.UU.).

Determinación de proteínas

La determinación del contenido de proteína se realizó según el método de Lowry (1951) (28) que consiste en una doble reacción colorimétrica, donde los reactivos interactúan con la proteína para dar un compuesto coloreado.

Inicialmente, se preparó la disolución estándar de albúmina bovina (Bovine Standard Albumin (BSA)) donde se utilizó una serie de concentraciones crecientes de BSA a partir de un stock de 1,46 mg/ml de BSA de Bio-Rad, a las que se les añadió 20 µl de la disolución digestora (1M de NaOH, 0,25% dodecilsulfato sódico (sodium dodecyl sulfate (SDS))). Posteriormente, se pusieron ambas a 60°C durante 1 hora y entraron en contacto mediante digestión proteica y, se les añadió 10 µl de solución A (1-5% NaOH, 1% Cu₂SO₄) para que se formara un complejo proteico coloreado debido al Cu⁺⁺ y el N₂ de los enlaces peptídicos. A continuación se hizo reaccionar la mezcla con 80 µl de solución B (reactivo de Folin) para resaltar el color formado y aumentar la sensibilidad, obteniendo un color azulado que fue medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm a los 15 minutos de incubación. La pendiente de la recta y la ordenada en el origen fueron valores necesarios para determinar el contenido proteico de las muestras. La solución digestora empleada se obtuvo disolviendo 4 g de NaOH y 0,25 g de SDS en 100 ml de H₂O destilada y, debido a que esta solución precipita a temperatura ambiente, se calentó antes de su uso.

Para el análisis de las muestras se realizó una dilución de las mismas (1:50) con el fin de obtener el ajuste adecuado a la curva patrón. Tomándose 100 µl de muestra y diluyéndose en 4.900 µl de ddH₂O. De estas disoluciones se tomaron 100 µl y siguiendo el protocolo para realizar la recta de calibrado, se le añadieron 20 µl de la solución digestora y se sometieron a 60°C durante 1 hora. Trascurrido ese tiempo de incubación se le agregaron 10 µl de solución A y 80 µl de solución B, después de haber pasado 10 minutos de la retirada de temperatura de

las muestras. Esto generó una reacción colorimétrica que fue medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm.

Los blancos realizados en el experimento fueron los siguientes:

- Blanco de albúmina: 10 μ l de albúmina + 90 μ l de ddH₂O.
- Blanco de muestra: 10 μ l de muestra + 90 μ l de ddH₂O.
- Blanco de reactivo: 10 μ l de ddH₂O + 10 μ l de solución A + 80 μ l de solución B.

Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)

Uno de los índices más frecuentes utilizados para estimar el daño oxidativo a lípidos, es la determinación de TBARs (42). Este procedimiento mide el MDA formado como producto final de la degradación de hidroperóxidos generados por la oxidación de los lípidos. El compuesto que se crea es un cromógeno de color rojo, cuya concentración se determina espectrofotométricamente a 532-535 nm. Método que se empleó para estimar la oxidación de los lípidos en la leche materna madura, del presente trabajo.

Este producto final de la peroxidación lipídica (MDA) es el sustrato que reacciona con el TBA. El MDA *in vivo* tiene una vida media muy corta debido a que reacciona rápidamente con grupos amino libres procedentes de los fosfolípidos, aminoácidos y proteínas presentes en el suero, dando productos fluorescentes que compiten con dicho sustrato para unirse al TBA. Por esta razón, las muestras se almacenaron a -80⁰C hasta el momento de determinar las sustancias reactivas al TBA, con el fin de evitar el fenómeno de lipoperoxidación *in vitro*. El método consiste en llevar a cabo la reacción en medio ácido y a alta temperatura. La reacción de descomposición de hidroperóxidos a MDA es una reacción de generación de radicales libres. De este modo, cuando coexisten ácidos grasos no oxidados en el medio de reacción, tiene lugar una autooxidación, razón por la que se añade BHT como agente antioxidante en el proceso de determinación de TBARs.

Para realizar la recta patrón se empleó el 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), uno de los precursores del MDA más ampliamente utilizado, el cual se hidroliza en medio ácido. Para ello se prepararon 2 soluciones patrón de dicho compuesto a concentraciones diferentes: 1/10⁵ y 1/10⁶. Para determinar la concentración de MDA se utilizó una disolución de TBA al 0,8%, así como SDS y ácido acético (20%, pH=3,5). Dicha mezcla se calentó posteriormente al baño maría a 95⁰C durante 1 hora para desarrollar la máxima coloración tanto en las muestras como en los patrones. Pasado ese tiempo se introdujeron en hielo durante 3 minutos para parar la reacción y se les añadió agua destilada y butanol pirimidina (15:1). Posteriormente se centrifugó a 10.000 g (4⁰C) durante 3'. Los sobrenadantes fueron recogidos y se procedió a la

lectura de las absorbancias a 532 nm. El ácido acético que añadimos en el procedimiento proporciona las condiciones de pH necesarias para que se forme el aducto TBA-MDA.

Análisis estadístico

Con la finalidad de contrastar el efecto del tiempo de almacenamiento en nevera sobre el contenido en lípido y proteína, niveles de TBARs, así como el perfil de clases lipídicas de la leche materna, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). En este caso se desarrolló un ANOVA de 1 vía, ya que disponemos de un factor (tiempo de almacenamiento en nevera) que presenta tres niveles (0, 24 y 72 horas de almacenamiento).

Las variables de estudio han sido: contenido lipídico y proteico, niveles de TBARs y composición en clases lipídicas. Previamente al desarrollo de dicho análisis, se contrastaron las hipótesis de normalidad, homocedasticidad e independencia. Para determinar la bondad de ajuste de los datos numéricos a una distribución normal, se utilizó el test de Normalidad de Kolmogorov-Smirnoff para una muestra. El test de Levene se utilizó para comprobar la homogeneidad de las varianzas (homocedasticidad). Y para comprobar la independencia de los datos y asegurar que la muestra es aleatoria, se aplicó el test de Rachas.

Los datos, expresados como media \pm desviación típica estándar, fueron analizados con el paquete estadístico IBM SPSS Statistic 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, E.E.U.U.). La significación estadística establecida ha sido $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Las muestras de leche materna procedentes de madres donantes, se analizaron con la finalidad de ver si existen diferencias en el contenido de lípidos y perfil de clases lipídicas, proteínas y de sustancias reactivas con TBA, tras el almacenamiento refrigerado a 4^oC durante 0, 24 y 72 horas.

En las tablas de resultados 1 y 2 se muestran los datos referentes al contenido lipídico y proteico, los niveles de TBARs, así como el perfil de clases lipídicas de las muestras de leche materna ensayadas en las condiciones anteriormente descritas. Si bien no se observan diferencias significativas en las concentraciones de lípido total y proteínas, al igual que en los valores de TBARs entre las muestras control y las almacenada durante 24 y 72 horas (Tabla 1), los resultados de clases lipídicas revelan un efecto del almacenamiento sobre el perfil de la grasa láctea (Tabla 2).

Mientras que los porcentajes de clases lipídicas polares, entre las que se incluyen la esfingomielina (ESF), la fosfatidil colina (FC), la fosfatidil serina (FS), fosfatidil inositol (FI), la fosfatidil etanolamina (FE), los monoacilglicéridos (MAG) y los ésteres de colesterol (EC), no sufren variación con el tiempo de almacenamiento en nevera, sí que hay efecto significativo del tiempo de almacenaje sobre ciertas clases lipídicas de carácter neutro (Tabla 2). Concretamente, los niveles de DAG y ácidos grasos libres aumentan de forma progresiva y significativa desde 0 hasta 72 horas de mantenimiento en nevera. En específico, los ácidos grasos libres y DAG aumentan un 167,2% y 118,5% respectivamente mientras que los TG disminuyen un 22,8% de forma significativa a las 72 horas de almacenamiento (Tabla 2 y Figura 6). Por otra parte, a la misma vez que los niveles de colesterol incrementan significativamente un 29,8% con la refrigeración prolongada, los ésteres de colesterol muestran una tendencia a la disminución con el almacenaje (Tabla 2 y Figura 7).

Tabla 1. Contenido en lípido total, proteína y TBARs de leche materna madura refrigerada a 4⁰C durante 0, 24 y 72 horas.

	0 h	24 h	72 h
LT (mg/ml)	38,14 ± 15,61	34,32 ± 15,02	31,76 ± 12,98
Proteína (mg/ml)	19,01 ± 4,78	19,04 ± 5,49	19,95 ± 5,11
TBARs (nmloles_MDA/mg_proteína)	1,03 ± 0,18	1,00 ± 0,21	1,15 ± 0,29

N=30. Datos expresados como media ± SD. LT, lípido total; MDA, malonaldehído.

Tabla 2. Perfil de clases lipídicas de leche materna madura refrigerada a 4⁰C durante 0, 24 y 72 horas.

	0 h	24 h	72 h
ESF	0,73 ± 0,35	0,74 ± 0,36	0,50 ± 0,17
FC	0,66 ± 0,32	0,51 ± 0,28	0,40 ± 0,18
FS+FI	0,71 ± 0,38	0,65 ± 0,41	0,61 ± 0,41
FE	0,93 ± 0,74	0,77 ± 0,63	0,96 ± 0,63
MAG	0,70 ± 0,58	0,83 ± 0,88	0,82 ± 0,73
DAG	3,29 ± 1,08 ^c	4,67 ± 1,20 ^b	7,19 ± 1,25 ^a
COL	4,82 ± 1,18 ^b	4,94 ± 1,11 ^{ab}	6,26 ± 0,99 ^a
AGL	8,06 ± 3,06 ^b	12,95 ± 5,42 ^b	21,54 ± 6,45 ^a
TG	74,70 ± 4,37 ^a	69,96 ± 5,43 ^a	57,65 ± 7,31 ^b
EC	6,71 ± 2,65	5,07 ± 1,65	4,49 ± 3,17
LP	3,74 ± 1,98	3,42 ± 2,01	3,29 ± 1,63
LN	96,26 ± 1,98	96,58 ± 2,01	96,71 ± 1,63

N=30. Datos expresados como media ± SD.

AGL, ácidos grasos libres; COL, colesterol; DAG, diacilglicéridos; ESF, esfingomielina; EC, ésteres de colesterol; FC, fosfatidil colina; FE, fosfatidil etanolamina; FI, fosfatidil inositol; FS, fosfatidil serina; LN, lípidos neutros; LP, lípidos polares; MAG, monoacilglicéridos; TG, triglicéridos. ^{a,b,c} = p ≤ 0,05.

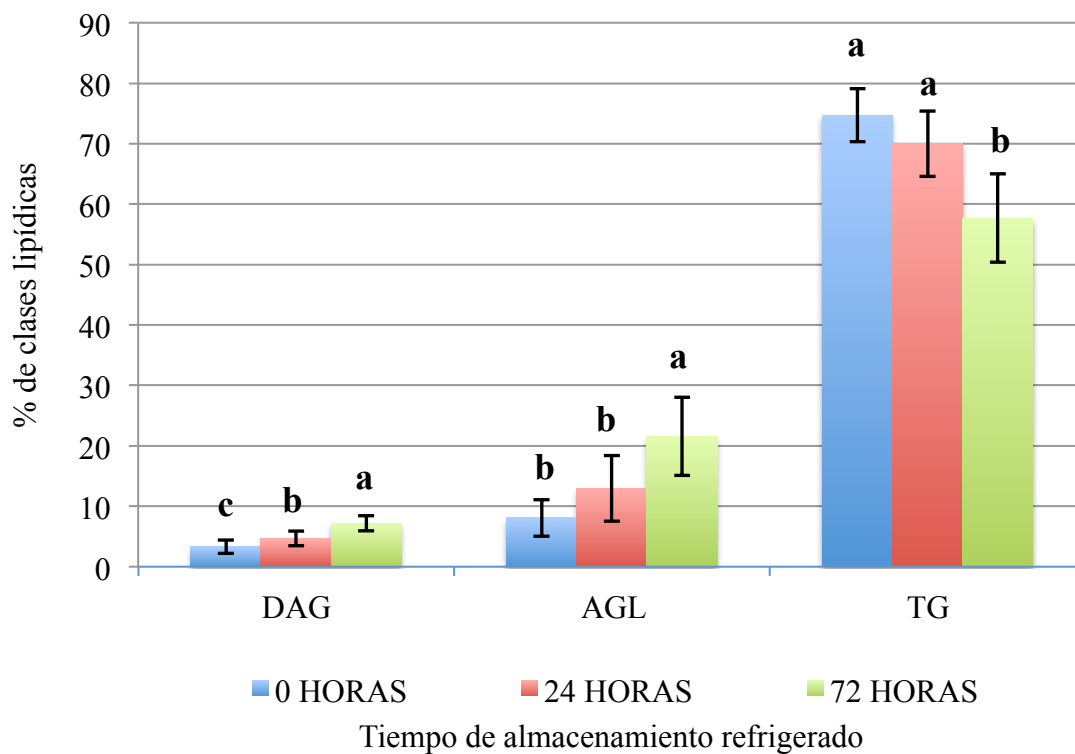


Figura 6. Contenido en diacilglicéridos (DAG), ácidos grasos libres (AGL) y triglicéridos (TG) de leche materna madura a 0, 24 y 72 horas de refrigeración en nevera.

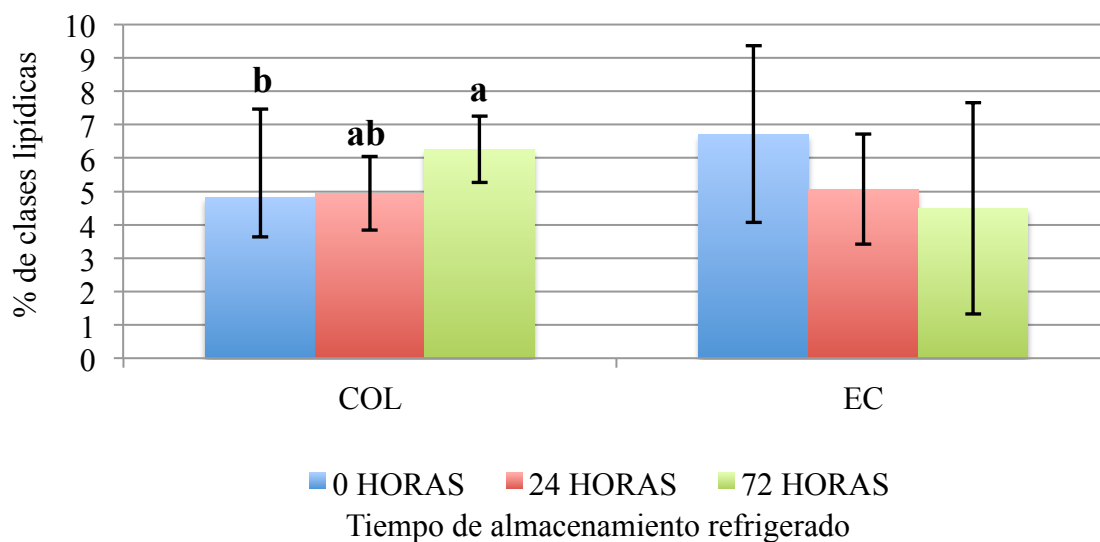


Figura 7. Contenido en colesterol (COL) y ésteres de colesterol (EC) de leche materna madura a 0, 24 y 72 horas de refrigeración en nevera.

DISCUSIÓN

La infancia es un periodo vulnerable en la que los primeros 6 meses de vida del bebé, dependen de una única fuente de nutrición que es la leche materna, para la correcta maduración y desarrollo de sus órganos **(1)**. Las necesidades nutricionales del feto y del recién nacido se ven incrementadas en el embarazo y la lactancia debido al rápido crecimiento, por ello es esencial ingerir AGPI-CL porque influyen positivamente en el neurodesarrollo fetal y del bebé, con posteriores beneficios en la etapa adulta **(8)**. También la lactancia materna aporta efectos protectores sobre enfermedades infecciosas, especialmente gastrointestinales (diarreicas), reduciendo la morbilidad y mortalidad infantil **(30,40)**.

La evidencia reciente demuestra que la madurez neural del lactante está directamente relacionada con las concentraciones de AGPI-CL de la leche materna **(39)**. Por ello, una disminución de la ingesta alimenticia de ácidos grasos ω -3, asociada a un desbalance dietario de la relación de las series ω -6 y ω -3, afecta negativamente a las mujeres en edad fértil y periodo de gestación **(8)**. Razón por la que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda y concluye que la lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses de edad, reporta múltiples beneficios tanto para el lactante como para la madre que amamanta **(30,31)**.

Una práctica actual en los hogares que ofrece gran comodidad a las madres, es el uso de la leche materna refrigerada que permite continuar con la lactancia en su ausencia, así como el uso que se le da en las NICU para los neonatos en régimen de ingreso hospitalario. Numerosos estudios continúan investigando sobre el almacenamiento de leche materna recién extraída, para garantizar la máxima conservación de sus propiedades nutricionales e inmunológicas, para que sean lo más similares a las de la leche directa del seno materno. El presente ensayo ha querido estudiar el efecto que produce la conservación refrigerada de la leche materna madura, en su perfil proteico y lipídico. Así como también observar qué sucede en las diferentes clases lipídicas y concentración de sustancias reactivas al TBA, indicador de la peroxidación lipídica.

Los resultados obtenidos muestran que no existe efecto del tiempo de almacenamiento a 4°C hasta un máximo de 72 horas, en el contenido lipídico y proteico, y sustancias reactivas al TBA de la leche materna ensayada. Sin embargo, sí se observan diferencias significativas en el perfil lipídico y, más concretamente, en ciertos lípidos neutros como los DAG, el colesterol, los ácidos grasos libres y los TG. Con todo ello se pretende informar del efecto observado en la leche y contrastar resultados con la información obtenida de publicaciones de otros autores. Con el fin de poder estimar si la práctica de almacenar este líquido biológico en

las condiciones ensayadas afecta a la estabilidad de la grasa láctea y de la proteína, para contribuir al fomento de la prolongación de la lactancia.

Existe variabilidad de resultados en publicaciones científicas debido a diferencias en el diseño de los estudios y los enfoques metodológicos empleados. La leche humana es un alimento fresco y vivo con muchas propiedades y nutrientes que cambian con el almacenamiento. Si bien existen evidencias de que la conservación de la leche materna puede ser segura y permite la nutrición óptima al bebé cuando la lactancia directa no es posible (24).

El estudio del efecto del almacenamiento sobre los componentes de la leche materna es muy diverso; la mayoría se han centrado en los efectos bacteriológicos, nutricionales e inmunológicos de la misma (18,45). Por ejemplo, se ha demostrado la inocuidad de la leche refrigerada a 4°C evaluando la capacidad de crecimiento bacteriano, en muestras almacenadas hasta las 72 horas e incluso después de 4-8 días, bajo condiciones estandarizadas (24). Otros autores reportan que la integridad de la leche materna fresca no se ve afectada después de 5 días de almacenamiento a 4°C, teniendo en cuenta la frecuencia con la que el refrigerador se abría cada día (43).

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo se ha centrado en estudiar qué sucede con la composición lipídica y proteica de la leche materna en el almacenamiento por el valor nutricional que ofrecen, para poder determinar que el empleo de esta práctica preserva de forma óptima dichos componentes.

Un estudio previo muestra que la refrigeración prolongada a 4°C durante 96 horas, no afecta al perfil de ácidos grasos de la leche materna, mientras que los niveles ácidos grasos libres aumentan 2,2 veces (1,1-2,4%) con el almacenamiento (10), lo cual está en concordancia con nuestros resultados. En nuestro estudio, aunque el contenido en lípido total se mantiene estable durante todo el procedimiento, al igual que en estudios similares previos (43,44,47), se observa un aumento de 2,67 veces en el contenido de ácidos grasos libres (8,1-21,5%) en la leche materna almacenada a 4°C durante 72 horas. Igualmente se detecta un aumento de los DAG de 2,2 veces. Este aumento de los ácidos grasos libres y DAG asociado a un descenso de 1,3 veces de los TG, es probablemente el resultado de la acción de las lipasas de la leche materna sobre los TG, lo cual es apoyado por estudios previos que indican una lipólisis durante el almacenamiento en frío de este fluido biológico (43,44,45). Además, aunque no llega a ser significativa, otros autores indican una ligera reducción de los niveles de TG de la leche durante la refrigeración, a pesar de observar una reducción significativa del pH, lo cual es un indicio del incremento de ácidos grasos libres en la leche (33).

Debido a que la leche materna contiene dos lipasas, una dependiente de sales biliares (BSSL) que es activa en el intestino del lactante y, por tanto, inactiva en la leche materna (19) y otra LPL independiente de sales; la actividad lipolítica encontrada en la leche refrigerada almacenada a 4°C en el presente ensayo, podría ser mayormente adscrita a esta última, lo cual también es sugerido por otros autores (29,37,50). Por otra parte, el incremento significativo del colesterol libre durante el tiempo de almacenamiento en frío, de igual forma que el descenso notable de los ésteres de colesterol a las 72 horas de almacenaje, indican con esta tendencia que se ha producido una acción hidrolítica por las esterasas independientes de sales biliares contenidas en la leche materna. Estas esterasas han sido descritas y valorada su actividad en ensayos previos sobre leche materna almacenada a diferentes temperaturas (19,52). En conjunto, se podría sugerir que la actividad de las lipasas y esterasas de la leche materna refrigerada, pueden contribuir favorablemente a la digestión inicial de la grasa láctea hasta el consumo por el lactante.

Respecto al contenido proteico de la leche materna, a pesar que está descrito que el proceso de refrigeración puede generar proteólisis (36,43), otros estudios observan que esta disminución no es significativa (33,47). Estos datos están en la misma línea que los resultados que hemos obtenido, ya que la leche materna del presente ensayo no muestra un descenso en el contenido proteico con un nivel de significación, hasta un máximo de 72 horas en refrigeración. Por otra parte, este hallazgo podría tener relación con un estudio previo que evidencia una proteólisis mínima de la leche materna a 15 y 25⁰C de almacenamiento, sugiriendo que las proteínas de la leche probablemente mantienen su estructura y función durante el almacenamiento a corto plazo, incluso a temperatura ambiente (46).

Atendiendo al proceso oxidativo de la leche se señala que la formación de peróxidos lipídicos, probablemente por la mayor presencia de ácidos grasos libres que genera la actividad lipolítica sobre los TG durante el almacenamiento, está en relación con la capacidad antioxidante total (CAT) de la leche humana (18). Aunque algunos autores defienden la reducción de la práctica de almacén y uso posterior de la leche materna, debido a que han comprobado que la refrigeración causa una disminución de la CAT de la misma (18), otros observan una CAT invariable después del proceso de almacenamiento (10).

Si bien la CAT es determinada en numerosos ensayos como indicador del estado antioxidante de la leche, imprescindible para mantener la integridad de sus componentes, los niveles de TBARs son ampliamente analizados como indicador del proceso de la peroxidación lipídica. En cuanto a la degradación de la grasa láctea, estudios previos señalan

que los niveles de TBARs aumentan en leche materna refrigerada **(13,32)**, lo cual podría ser debido a un desbalance de los sistemas antioxidantes.

Sin embargo, los resultados del presente estudio, en concordancia con los resultados obtenidos por Bertino *et al.* **(10)** y Michalski *et al.* **(48)**, muestran una ausencia de variación en los niveles de TBARs de la leche materna a lo largo del proceso de refrigeración. Este hallazgo indica que no hay evidencias de peroxidación lipídica, principalmente de los ácidos grasos libres producidos y presentes en la leche después de 72 horas a 4⁰C. Todo ello podría ser debido a que la capacidad antioxidante de la leche permaneció invariable bajo las condiciones ensayadas, estando apoyado por hallazgos previos que indican una conservación del poder antioxidante de la leche materna refrigerada **(10)**. Este hecho es particularmente relevante para bebés pretérmino, quienes tienen una capacidad antioxidante reducida siendo más vulnerables al estar expuestos a estrés oxidativo causado por infecciones, radicales de oxígeno, transfusiones de sangre, nutrición parenteral, etc. **(49)**.

Preservar los componentes nutricionales de la leche materna madura almacenada, es fundamental para la correcta alimentación y salud del neonato, así como un apoyo en el fomento de la lactancia. Considerando que los ensayos sobre dichos nutrientes estudiados, son una práctica segura y eficaz, cuando la lactancia no puede desarrollarse directamente a través del seno materno.

El presente estudio aporta nuevos datos sobre el perfil lipídico de la leche materna en condiciones de almacenamiento refrigerado a lo largo del tiempo hasta un máximo de 72 horas, siguiendo los protocolos establecidos para este fin. Sin embargo, sería relevante continuar desarrollando este campo mediante el empleo de un número mayor de muestras y mayor tiempo de almacenaje, para continuar observando el comportamiento de la grasa y de las proteínas de la leche materna, así como poder determinar la actividad lipolítica y oxidativa mediante el empleo de técnicas complementarias.

CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en el presente ensayo muestran que la refrigeración prolongada de la leche fresca a 4⁰C hasta 72 horas no afecta su contenido lipídico total.
2. Las concentraciones de las fracciones de lípido polar y lípido neutro de la leche de las madres donantes no varían a lo largo del tiempo de almacenamiento.
3. La refrigeración prolongada de la leche materna modifica el perfil de clases lipídicas del lípido neutro. Los triglicéridos disminuyen a la vez que los diacilglicéridos y los ácidos grasos libres aumentan de forma significativa y progresiva, lo cual podría señalar lipólisis en los triglicéridos de la grasa láctea.
4. El colesterol incrementa de forma significativa con el proceso de almacenaje de la leche en frío. Este hecho apunta a una actividad de las esterasas no dependientes de sales biliares sobre los ésteres de colesterol, los cuales disminuyen notablemente durante el periodo de refrigeración ensayado.
5. Los niveles de proteínas de las muestras de leche materna no muestran ninguna variación en su contenido total, lo cual pondría indicar una ausencia de proteólisis en el tiempo transcurrido de almacenaje.
6. Los niveles de TBARs determinados en este ensayo nos muestran que no aparecen indicadores de una oxidación lipídica, al no variar su contenido en la leche hasta 72 horas en refrigeración. Si bien existe una lipólisis activa en condiciones de almacenamiento refrigerado a 4⁰C, los ácidos grasos presentes en la leche, no sufren procesos oxidativos y por lo tanto la calidad de la grasa láctea permanece invariable.

CONCLUSIONS

1. The results obtained in the present study indicate that prolonged refrigeration of fresh milk at 4⁰C up to 72 hours do not affect its total lipid content.
2. Polar lipid and neutral lipid fraction proportions of breast milk do not vary over the storage time.
3. Prolonged refrigeration of human milk changed the neutral lipid class profile. A decrease of triglycerides, as well as a significantly and progressively increase of the diacylglycerides and free fatty acids, may indicate triglycerides lipolysis of milk fat during storage.
4. Cholesterol increases significantly at the same time that cholesterol esters decrease with prolonged refrigeration of breast milk, which could be ascribed to the activity of non-bile salt esterases.
5. Breast milk total protein content does not vary during cold storage, suggesting an absence of proteolysis.
6. Unchanged TBARs levels of breast milk during prolonged refrigeration point out the lack of lipid oxidation during storage. Despite a limited lipolysis during storage was observed, no sings of fatty acid oxidation were detected, and consequently the quality of milk fat remained unaffected.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) **Shellhorn, C. Valdés, V.** 1995. La leche humana, composición, beneficios y comparación con la leche de vaca. Extraído y adaptado del Manual de Lactancia para profesionales de la salud. Comisión de Lactancia MINSAL, UNICEF. Chile.
- (2) **Lawrence, R.A., Lawrence, R.M.** 2007. Bioquímica de la leche materna. p. 111-183. Lactancia Materna. Una guía para la profesión médica. Sexta edición. Ed. Elsevier Mosby. Madrid.
- (3) **García-López, R.** 2011. Composición e inmunología de la leche humana. Acta Pediátrica de México. Vol. 32, No. 4, p. 223-230.
- (4) **Lozano, M.J.** 2004. Lactancia Materna. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHPN-AEP. p. 279-286.
- (5) **Odent, M.** 2003. Composición y propiedades de la leche materna. Curso de Medicina Naturista. p. 7-16.
- (6) **Sprecher, H., Luthria, D.L., Mohammed, B.S., Baykousheva, S.P.** 1995. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. Journal of Lipid Research. Vol. 36, p. 2471-2477.
- (7) **Williams, C.M., Burdge, G.** 2006. Long-chain n-3 PUFA: plant v. Marine sources. Proc Nutr Soc. Vol. 65, No. 1, p. 42-50.
- (8) **Campoy, C., Cabero, L., Sanjurjo, P., Serra-Majem, L., Anadón, A., et al.** 2010. Actualización, recomendaciones y consenso sobre el papel de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la gestación, lactancia y primer año de vida. Medicina Clínica. Vol. 135, No. 2, p. 75-82.
- (9) **Charles, N., Serhan, Ph.D.** 2006. Nuevos mediadores químicos en la resolución de la inflamación: resolvinas y protectinas. Anesthesiology Clinical North America. Vol. 24, p. 341-364.
- (10) **Bertino, E., Giribaldi, M., Baro, C., Giancotti, V., Pazzi, M., et al.** 2013. Effect of Prolonged Refrigeration on the Lipid Profile, Lipase Activity, and Oxidative Status of Human Milk. Original Article: Hepatology and Nutrition. Vol. 56, No. 4, p. 390-396.
- (11) **Vega, S., Gutiérrez, R., Radilla, C., Ramírez, A., Pérez, J.J., et al.** 2012. La importancia de los ácidos grasos en la leche materna y en las fórmulas. Grasas y Aceites. Vol. 63, No. 2, p. 131-142.
- (12) **Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S.** 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Article ID 360438, p. 1-31.
- (13) **Miranda, M., Gormaz, M., Romero, F.J., Silvestre, D.** 2011. Estabilidad de la capacidad antioxidante y pH en leche humana refrigerada durante 72 horas: estudio longitudinal. Nutrición Hospitalaria. Vol. 26, No. 4, p. 722-728.
- (14) **Castillo-Castañeda, P.C., Gaxiola-Robles, R., Méndez-Rodríguez, L.C., Zenteno-Savín, T.** 2014. Defensas antioxidantes en leche materna en relación al número de gestas y a la edad de las madres. Nutrición Hospitalaria. Vol. 30, No. 3, p. 540-547.
- (15) **Cooper G.M., Hausman R.E.** 2004. La Célula. Ed. Marbán. Madrid. España. p. 426-432.
- (16) **Szlagatys-Sidorkiewicz, A., Zagierski, M., Jankowska, A., Luczak, G., Macur, K., et al.** 2012. Longitudinal study of vitamins A, E and lipid oxidative damage in human milk throughout lactation. Early Human Development. Vol. 88, p. 421-424.
- (17) **Wang, C.S., Kuksis, A., Manganaro, F.** 1982. Studies on the Substrate Specificity of Purified Human Milk Lipoprotein Lipase. Lipids. Vol. 17, No. 4. P. 278-284.
- (18) **Arun, X., Rai, K., Hegde, A.M.** 2011. Total Antioxidant Concentration of Breast milk – An Eye-opener to the Negligent. J Health TH Popul Nutr. Vol. 29, No. 6, p. 605-611.
- (19) **Clark, R.M., Hundrieser, K.E., Brown, P.B.** 1984. The effect of temperature and length of storage on bile salt-stimulated lipase and esterase in human milk. Nutr Res. Vol. 4, p. 957-960.

- (20) Araujo, A., Valente, F., Porto, H., Dunshee, A., Lopes, M.E. 2011. Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. *Early Human Development*. Vol. 87, p. 577-580.
- (21) Hoving, E.B., Laing, C., Rutgers, H.M. Teggler, M., Van Doormaal, J.J., *et al.* 1992. *Clínica Química Acta*. Vol. 298, p. 63-76.
- (22) Hernell, O., Olivecrona, T. 1974. Human milk lipases. Serum-stimulate lipase. *Journal of Lipid Research*. Vol. 15, p. 367-374.
- (23) Manson, W.G., Weaver, L.T. 1997. Fat digestion in the neonate. *Archives of Disease in Childhood*. Vol. 76, p. 206-211.
- (24) Eglash, A., Bunik, M., Chantry, C.J., Howard, C.R., Lawrence, R.A., *et al.* 2010. ABM Clinical Protocol #8: Human Milk Storage Information for Home Use for Full-Term Infants (Original Protocol March 2004; Revision #1 March 2010). The Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee. *Breastfeeding Medicine* Vol. 5, No. 3.
- (25) Horwitz, W., Latimer, G.W. 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18th Edition. USA.
- (26) Folch, J., Lees, M., Sloane, G.H. 1957. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *J. Biology. Chemical*. Vol. 193, p. 265-275.
- (27) Olsen, R.E., Henderson, R.J. 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol.129, No. 2, p. 189-197.
- (28) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis, A., Randall, R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal Biology Chemistry*. Vol. 193, p. 265-275.
- (29) Davanz, R., Travan, L., Demarini, S. 2010. Storage of human milk: accepting certain uncertainties. *Journal Human Lactation*. Vol. 26, p. 233-234.
- (30) Macías, S.M., Rodríguez, S., Ronayne, P.A. 2006. Leche materna: composición y factores condicionantes de la lactancia. *Archivos Argentinos de Pediatría*. Vol. 104, No. 5, p. 423-430.
- (31) Organización Mundial de la Salud. 2002. Estrategia mundial para la alimentación del lactante y del niño pequeño. WHA55.25, p. 1-30.
- (32) Miranda, M., Muriach, M., Almansa, I., Jareño, E., Bosch-Morell, F., *et al.* 2004. Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. *Biofactors*. Vol. 20, p. 129-137.
- (33) Ghoshal, B., Lahiri, S. 2012. Changes in Biochemical Contents of Expressed Breast Milk on Refrigerator Storage. *Indian Pediatrics*. Vol. 49, No. 16, p. 836-837.
- (34) Martin, J.C., Bougnoux, P., Antonie, J.M., Lanson, C.C. 1993. Triacylglycerol structure of human colostrum and mature milk. *Lipids*. Vol. 28, No. 7, p. 637-643.
- (35) Wang, C.S., Kuksis, A., Manganaro F. 1982. Studies on the substrate specificity of purified human milk lipoprotein lipase. *Lipids*. Vol. 17, No. 4, p. 278-284.
- (36) Maury, E., Sequera, S., Sánchez, D., Bravo, A., Romero, M., *et al.* 2010. Variaciones en la composición proteica de la leche madura durante el almacenamiento por congelación. *Pediatría (Asunción)*. Vol. 37, No. 3, p. 187-194.
- (37) Lavine, M., Clarck, R.M. 1987. Changing patterns of free fatty acids in breast milk during storage. *Journal Pediatric Gastroenterol Nutrition*. Vol. 6, p. 769-774.
- (38) Hernell, O., Olivecrona, T. 1974. Human milk lipase. II Bile salt-stimulated lipase. *Biochimica et Biophysica Acta* 369, p. 234-244.
- (39) Brenna, J.T., Varamini, B., Jensen, R.G., Diersen-Schade, D.A., Boettcher, J.A., *et al.* 2007. Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. *Am J Clin Nutr*. Vol. 85, p. 1457-1464.

- (40) **Geddes, D.T., Prescott, S.** 2013. Development Origins of Health and Disease: The Role of Human Milk in Preventing Disease in the 21st Century. *Journal of Human Lactation*. Vol. 29, p. 123-127.
- (41) **Watkins, J.B.** 1985. Lipid Digestion and Absorption. *Official Journal of the American Academy of Pediatrics*. Vol. 75, p. 151-156.
- (42) **Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.** 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry*. Vol. 95, p. 351-358.
- (43) **Slutzah, M., Codipilly, C.N., Potak, D., Clark, R.M., Schanler, R.J.** 2009. Refrigerator Storage of Expressed Human Milk in the Neonatal Intensive Care Unit. *The Journal of Pediatrics*. Vol. 156, No. 1, p. 26-28.
- (44) **Lavine, M., Clark, R.M.** 1987. Changing patterns of free fatty acids in breast milk during storage. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. Vol. 6, No. 5, p. 769-774.
- (45) **Romeu-Nadal, M., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C.** 2008. Effect of cold storage on vitamins C and E and fatty acids in human milk. *Food Chemistry*. Vol. 106, p. 65-70.
- (46) **Hamosh, M., Ellis, L.A., Pollock, D.R., Henderson, T.R., Hamosh, P.** 1996. Breastfeeding and the Working Mother: Effect of Time and Temperature of Short-term Storage on Proteolysis, Lipolysis, and Bacterial Growth in Milk. *Pediatrics*. Vol. 97, No. 4.
- (47) **Ezz El Din, Z.M., Abd El Ghaffar, S., El Gabry, E.K., Fahmi, W.A., Bedair, R.F.** 2004. Is stored expressed breast milk an alternative for working Egyptian mothers? *Eastern Mediterranean Health Journal*. Vol. 10, No. 6, p. 815-821.
- (48) **Michalski, M.C., Calzada, C., Makino, A., Michaud, S., Guichardant, M.** 2008. Oxidation products of polyunsaturated fatty acids in infant formulas compared to human milk – a preliminary study. *Molecular Nutrition Research*. Vol. 52, p. 1478-1485.
- (49) **Thibeault DW.** 2000. The precarious antioxidant defences of the preterm infant. *American Journal of Perinatology*. Vol. 17, p. 167-168.
- (50) **Freed, L.M., Berkow, S.E., Hamosh, P., et al.** 1989. Lipases in human milk: effect of gestational age and length of lactation on enzyme activity. *Journal of American College of Nutrition*. Vol. 8, p. 143-150.
- (51) **Hui, D.Y., Kissel, J.A.** 1990. Sequence identity between human pancreatic cholesterol esterase and bile salt-stimulated milk lipase. *Journal of Lipid Research*. Vol. 31, No. 1-2, p. 131-134.
- (52) **Mehta, N.R., Jones, J.B., Hamosh, M.** 1982. Lipases in preterm human milk: ontogeny and physiologic significance. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. Vol. 1, p. 317-326.