



**Sección de Biología**  
Universidad de La Laguna

**Análisis de la composición nutritiva (lípidos y proteínas) de la leche materna de delfín y orca. Estudio comparativo con la leche de otros mamíferos.**

**Nutritional composition analysis (lipids and proteins) of dolphin and killer whale breast milk. Comparative study with milk of other mammals.**



Trabajo de Fin de Grado

**GARA RAMOS RIVERO**

Tutorizado por Ana Bolaños Martín y Sara García Ravelo

Grado en Biología. Julio 2019

**SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN  
TRABAJO FIN DE GRADO  
Curso Académico: 2018/2019**

**Datos Personales**

Nº DNI o pasaporte:  
54160490k

Nombre y Apellidos: GARA RAMOS RIVERO

**SOLICITA** la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

**TÍTULO**

**Análisis de la composición nutritiva (lípidos y proteína) de la leche materna de delfín y orca. Estudio comparativo con la leche de otros mamíferos.**

**Autorización para su depósito, defensa y evaluación**

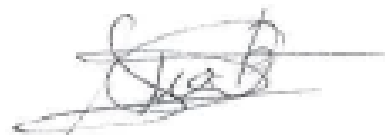
**D./Dña. Ana Bolaños Martín**

**Profesora Titular del Departamento** Biología Animal y Edafología y Geología

**y D./Dña. Sara García Ravelo**

**Licenciada del Departamento** Biología Animal y Edafología y Geología

Autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado



Fdo.: Ana Bolaños Martín



Fdo.: Sara García Ravelo

La Laguna, a 9 de julio de 2019

**Firma del interesado/a**



Fdo. Gara Ramos Rivero

# Índice

Resumen .....	1
Abstract .....	1
1.Introducción.....	2
1.1 Generalidades .....	2
1.2 Leche materna .....	3
1.3 Composición de la leche materna .....	3
1.3.1 Proteínas.....	3
1.3.2 Hidratos de carbono.....	4
1.3.3 Lípidos.....	4
1.3.4 Ácidos grasos.....	6
1.3.5 Vitaminas y minerales.....	8
1.3.6 Componentes inmunológicos .....	9
1.3.7 Circulación enteromamaria .....	9
2. Objetivos.....	10
3. Material y métodos .....	10
3.1 Obtención y preparación de muestras.....	10
3.2 Análisis bioquímicos de la muestras .....	10
3.2.1 Extracción de lípido polar .....	10
3.2.2 Obtención de ácidos grasos.....	11
- Cromatografía en capa fina .....	11
- Cromatografía de gases .....	12
3.2.3 Determinación de clases lipídicas.....	12
3.2.4 Determinación de proteínas .....	13
3.2.5 Determinación de peróxidos.....	13
3.3 Análisis estadístico .....	14
4. Resultados.....	14
5. Discusión .....	20
6. Conclusiones .....	23
7. Bibliografía .....	25

## Resumen

La leche materna es un fluido característico de los mamíferos que responde a las presiones selectivas del medio, y su constitución es específica para cada lactante. Entre sus componentes, los lípidos y las proteínas son de gran relevancia para el desarrollo de la cría hasta que alcance el grado de madurez que le permita alimentarse del medio en que vive. En este estudio, se analizó el contenido de lípido total, proteína, clases lipídicas, perfil de ácidos grasos y presencia de peróxidos, de la leche de *Orcinus orca spp* y *Tursiops truncatus (Delphinidae)*. Así mismo, se evaluó comparativamente la composición de la leche de otros mamíferos marinos y terrestres (cachalote, cabra y humana). Las leches analizadas mostraron valores muy semejantes en proteínas y todas las clases de lípidos, si bien, comparativamente los mamíferos terrestres presentan un menor contenido en proteína y grasa en su leche. La leche de los mamíferos marinos contiene altas cantidades de n-3 PUFA procedente de la dieta materna; presumiblemente imprescindibles para su desarrollo en el medio marino e interviniendo en los procesos de inmersión.

**Palabras clave:** lactancia, leche materna, ácidos grasos, mamíferos

## Abstract

Breast milk is a fluid characteristic of mammals that responds to the selective pressures of the environment, and its constitution is specific to each offspring. Among its components, lipids and proteins are of great importance for the development of the offspring until they reach the degree of maturity that allows them to feed on the environment where they live in. This study analyzed the content of total lipid, protein, lipid classes, profile of fatty acids and the presence of peroxides of the milk of *Orcinus orca spp* and *Tursiops truncatus (Delphinidae)*. Likewise, milk composition from other marine and terrestrial mammals (sperm whale, goat and human) was evaluated comparatively. The milk analyzed showed very similar values in proteins and all kinds of lipids, although comparatively, terrestrial mammals have a lower content of protein and fat in their milk. The milk of marine mammals contains high amounts of n-3 PUFA from their maternal diet; presumably essential for their development in the marine environment and intervening in the immersion processes.

**Key words:** lactation, breast milk, fatty acids, mammals

# 1. Introducción

## 1.1 Generalidades

El nombramiento de la clase Mammalia por Linneo en 1758 (1) hace referencia al carácter dominante que permite distinguir a las especies de mamíferos: la lactancia. La lactancia, es el período en el que las hembras alimentan a sus crías en los primeros periodos de vida con la leche producida en sus mamas, protegiéndolas y contribuyendo a asegurar su desarrollo y supervivencia (2).

En línea general, la lactancia es una etapa que se inicia inmediatamente después del nacimiento de las crías y se extiende hasta que estas puedan conseguir su alimento por sí mismas; momento que coincide con la disminución de la expresión del gen que codifica para la enzima lactasa (que hidroliza la lactosa), permitiendo el directo aprovechamiento de la glucosa en el metabolismo del individuo (3).

La leche materna es indispensable para las estrategias de historia de vida de los mamíferos. Por una parte, muchas especies se especializan en dietas de presas que son muy difíciles de capturar o digerir para las crías pequeñas, mientras que otros tipos de dieta podrían no cubrir las necesidades nutricionales de los jóvenes en rápido crecimiento (1,4). El amamantamiento, permite a las madres reservar en sus tejidos los diferentes nutrientes que provienen de la ingesta en un momento y lugar determinado, y posteriormente proporcionarlos a sus crías a través de la leche en un espacio-tiempo diferente (4). Esta capacidad de suministrar a los descendientes un alimento altamente digestible, nutricionalmente equilibrado y concentrado de forma variable según la presión del entorno y la dieta materna, ha permitido a los mamíferos desarrollar una amplia gama de estrategias de desarrollo y reproducción (5).

La lactancia es un proceso que requiere una inversión energética y nutricional materna extremadamente significativa, ya que el éxito del desarrollo y configuración funcional de los distintos órganos y sistemas de la cría dependerán de las condiciones nutricionales durante el desarrollo temprano (6). La visión tradicional de la leche como un líquido con nutrientes esenciales, ignora la dimensión dinámica, activa y estructurada que realmente tiene. La leche de cada especie es única y sus constituyentes reflejan su historia evolutiva, su ecología actual y las trayectorias del desarrollo de los lactantes (7). Por lo tanto, conocer la composición nutricional de la leche y las presiones selectivas que configuran

las estrategias de lactancia, proporcionará información valiosa sobre factores que, en última instancia, son el motor de la evolución de la especie.

## **1.2 Leche materna**

La leche materna es un fluido extremadamente complejo y muy variable, que ha evolucionado a lo largo de milenios para nutrir y proteger a los lactantes de enfermedades mientras madura su propio sistema inmunológico (8). Se trata de una sustancia altamente variable entre los distintos grupos de mamíferos, dado que la composición nutricional responde según las necesidades inmunológicas, termorreguladoras, osmorreguladoras o nutritivas de los lactantes (4). Además, la leche de cada madre está adaptada para reflejar con precisión los requerimientos de su cría (5), llegando a variar además la composición entre mamas u hora del día (9).

## **1.3 Composición de la leche**

La leche es una combinación de tres estados físicos: 1) una disolución verdadera formada por agua y compuestos solubles como algunas vitaminas y oligoelementos, 2) una suspensión coloidal formada por la dispersión de proteínas y biomoléculas insolubles y 3) una emulsión en la que se encuentra la grasa (10).

### *1.3.1 Proteínas*

Las proteínas de la leche se subdividen en proteínas de suero y caseínas. La proteína de suero (*whey protein*) supone el conjunto de una amplia variedad de enzimas, inmunoglobulinas, glicoproteínas, hormonas de crecimiento, seroalbúminas, moduladores de crecimiento, así como las principales proteínas  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina (11).

Respecto a las caseínas se conocen  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ - caseínas, y varios subtipos. Estas se fosforilan durante la síntesis y se agregan en micelas grandes que contienen fósforo unido a calcio en los proteoglicanos (12). Estas micelas aportan una gran proporción de los aminoácidos, el calcio y el fósforo a los jóvenes lactantes; y a través de la formación de cuajada en el estómago neonatal, desempeñan un papel en la digestión de grasas y proteínas (13).

A lo largo de los grupos de mamíferos, es posible encontrar diferentes proporciones de caseínas:proteínas de suero: desde 30:70 (en el elefante marino del sur y en los seres

humanos (14)) hasta 70:30 en ballenas azules, con valores intermedios en osos polares (61:39) o en nutrias marinas (35:65) (15).

### 1.3.2 Hidratos de carbono

La leche de los diferentes mamíferos contiene una pequeña cantidad de azúcares, siendo los principales la lactosa y los oligosacáridos. Además, también es posible encontrar monosacáridos como galactosa, glucosa, fucosa y, en menor medida, ácido sialílico y N-acetilglucosamina. En la mayoría de los eutherios predomina la lactosa, mientras que los oligosacáridos destacan en los monotremas, marsupiales y algunos carnívoros eutherianos (11). Tanto la lactosa como los oligosacáridos con lactosa en el extremo reductor son exclusivos de la leche y requieren una vía sintética diferente (5).

La concentración de lactosa varía durante el período de lactancia. En general, se observa un aumento en la lactancia temprana, después de lo cual puede estabilizarse, disminuir ligeramente, como en quirópteros, roedores y humanos, o alcanzar niveles muy bajos como en pinnípedos, cetáceos o úrsidos (11). La lactosa no se encuentra en la leche de monotremas ni marsupiales, así como en las familias *Otariidae* y *Odobenidae* (16). En su lugar, existe una gran cantidad de oligosacáridos libres. Esto se cree que es debido a una baja o nula tasa de síntesis, por mutaciones o fallos en  $\alpha$ -lactoalbúmina, unido a una alta actividad de otras glucosiltransferasas (11).

Los oligosacáridos, en general, no suelen aportar energía, sino que producen efectos antimicrobianos y probióticos en el intestino de la cría, ya que las bacterias los confunden con el glicoxilano de las membranas de las células intestinales evitando su adherencia. Parece que es esta función de protección la que determina la cantidad presente en la leche, así como los tipos de cadena de los oligosacáridos (17).

### 1.3.3 Lípidos

El contenido lipídico de la leche varía enormemente entre los distintos mamíferos: desde menos del 1% en rinocerontes y algunos lémures, hasta el 60% en algunas focas (11). Sin embargo, en todas las especies estudiadas, los lípidos de la leche se secretan como estructuras especializadas conocidas como glóbulos de grasa: MFG (*Milk fat globule*).

Los glóbulos de grasa de leche (Figura 1) presentan tamaños notablemente variables. Se forman en las células alveolares mamarias y contienen un núcleo de lípidos no polares compuestos principalmente de triacilgliceroles, con pequeños agregados de

monoglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos no esterificados (18). Estos lípidos no polares se forman en el retículo endoplásmico a partir de ácidos grasos obtenidos de la circulación sanguínea materna y de ácidos grasos de cadena media sintetizados a partir de acetil-CoA (11).

Tras la secreción del retículo endoplásmico de las células epiteliales mamarias al citosol, este núcleo rico en triglicéridos queda recubierto por la membrana interna del retículo endoplásmico, compuesta por una monocapa principalmente de fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y colesterol. Además, cuando se excretan de las células epiteliales mamarias en el espacio alveolar, son recubiertas por la membrana plasmática apical, lo que da lugar a la adición de otra bicapa de fosfolípidos (tricapa). Esta capa externa de la membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM) consiste en una bicapa de lípidos anfipáticos, principalmente fosfatidilcolina, esfingomiélin y colesterol, así como también cerebrósidos, gangliósidos, proteínas glicosiladas y polipéptidos, filamentos, mucinas, lactadina, butirofilina y otros; por lo tanto, MFGM contiene una alta densidad de componentes bioactivos (5,11).

El MFG es una estructura que solo se encuentra en la leche y su método de secreción parece ser único dentro del reino animal (19). Esta característica podría indicar que los glóbulos grasos son una novedad evolutiva clave en el proceso de la lactancia (5).

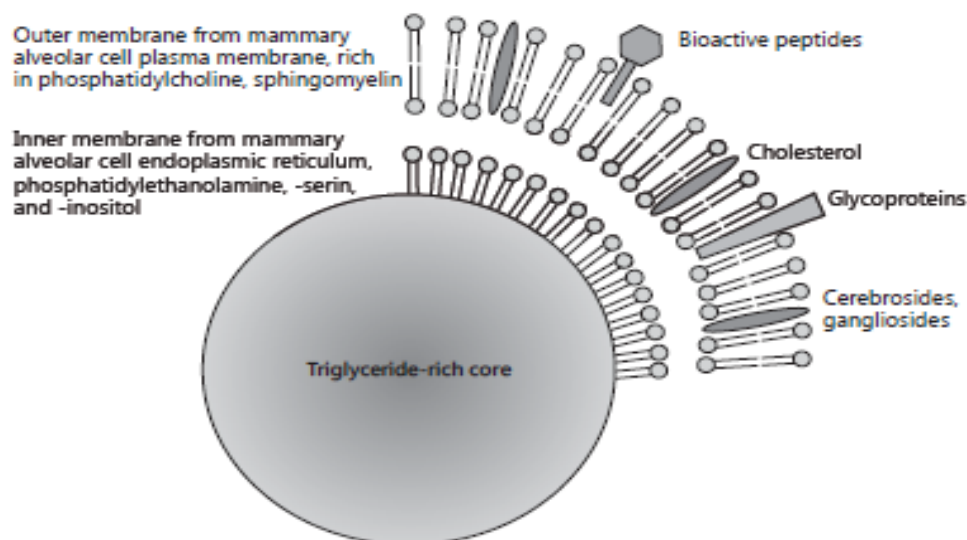


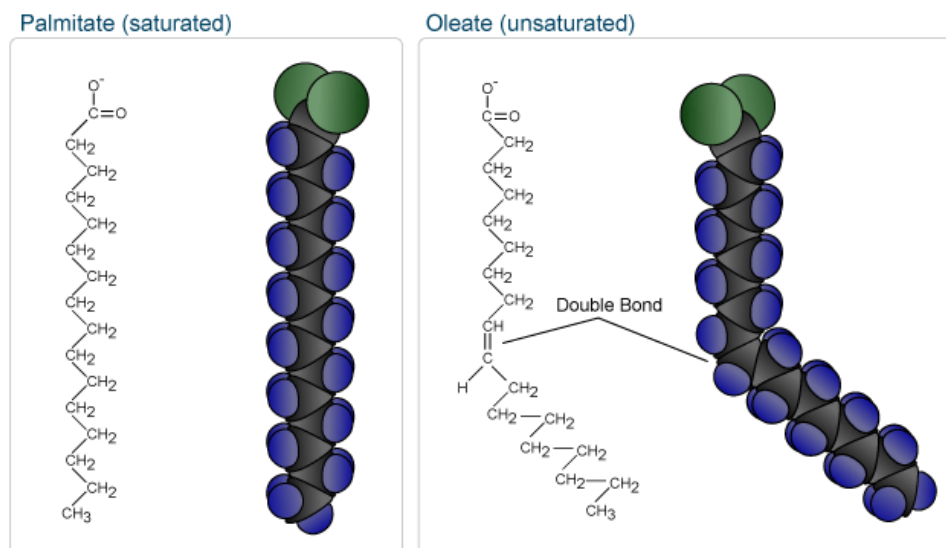
Figura 1. Estructura de un glóbulo de grasa de leche (MFG)



Los lípidos son un grupo muy heterogéneo de biomoléculas que cumplen una infinidad de funciones en el desarrollo del lactante. En los últimos años, dentro de este grupo de biomoléculas, se ha destacado el papel imprescindible de los ácidos grasos (20). Sobre todo, aquellos de mayor longitud y elevado número de insaturaciones (poliinsaturados), dado que son claves en el desarrollo estructural y funcional de los sistemas visual-sensorial, perceptual y cognitivo del lactante, como el DHA. Además, 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) con importantes funciones regulatorias de procesos inflamatorios, circulatorios, respiratorios, etc (21, 22).

#### 1.3.4 Ácidos grasos

Dentro de los lípidos, los ácidos grasos son los más sencillos: un grupo hidroxílico (hidrófilo) unido al extremo de una cadena hidrocarbonada, y se clasifican en función de su longitud de cadena, de su grado de saturación (nº de enlaces) y de su posición en dobles enlaces. Normalmente, presentan un número par de átomos de carbono y pueden ser saturados si los átomos de carbono están unidos por enlaces covalentes, o insaturados si contienen uno (monoinsaturados) o varios dobles enlaces (poliinsaturados) (Figura 2).



Dept. Biol. Penn State ©2002

Figura 2. Izquierda: ácido graso saturado (palmitato). Derecha: ácido graso insaturado (oleato)

Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados (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 ( $\omega$ ) 3, 6, 7 o 9, teniendo mayor relevancia los de la serie n-3 como el ácido eicosapentaenoico (EPA), el ácido docosahexaenoico (DHA) y n-6, como el ácido araquidónico (AA).

Los ácidos grasos se obtienen de los triacilgliceroles y son transportados a las células mamarias por las lipoproteínas circulantes, donde son liberados. Los ácidos grasos de cadenas más larga se sintetizan mediante un proceso de elongación, en el hígado y el tejido adiposo, alcanzando una longitud de 16-18 átomos de carbono, aunque también pueden ser incorporados directamente en los triacilglicéridos (23).

Algunos de estos ácidos grasos de cadena larga son precursores de LC-PUFA, como el ácido linoleico (LA) (18:2n-6) y el ácido linolénico (18:3n-3) (ALA). La síntesis de los LC-PUFA tiene lugar a nivel microsomal y/o mitocondrial, en el hígado y la glándula mamaria, 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, alargando hasta 24 carbonos las cadenas (20).

Los animales terrestres herbívoros, incorporan a su dieta ALA y LA a partir de los vegetales, y mediante las enzimas elongan y desaturan hasta ácidos grasos de 22-24 átomos de carbono. Los animales marinos y carnívoros, poseen un sistema enzimático menos eficiente, de tal forma que sus presas son las que aportan tanto AGPI y LC-PUFA (24).

La proporción de ácidos grasos varía enormemente entre los distintos grupos de mamíferos. Por ejemplo, dentro de Artiodactyla, en muchas familias de rumiantes son característicos los ácidos grasos de cadena corta (C4:0 y C6:0), si bien en algunas familias como *Camelidae* presentan solo el 1%, al igual ocurre con los de cadena media que están presentes de formas variables (25).

Lo mismo ocurre en general para el resto de especies, no estando claras las tendencias filogenéticas en la secreción de los ácidos en la leche. Algunos herbívoros no rumiantes tienen contenidos extraordinariamente altos de ácidos grasos de cadena media (C8:0–C12:0). En conejos, se encontró que la leche contenía más del 62% de estos ácidos grasos y la leche de liebre el 25% (25). En Perissodactyla, el contenido de estos ácidos varía significativamente a lo largo del tiempo de lactancia (18%-32%) y en elefantes (*Proboscidae*) producen ácidos grasos de cadena media por síntesis *de novo* que pueden

alcanzar hasta el 90% de la fracción lipídica. La síntesis de ácidos grasos de cadena media también es una propiedad de los primates y existen relaciones filogenéticas específicas, si bien en Hominidae, se observan bajas cantidades de C8:0 y C10:0 (11).

En general, aunque en la mayoría de especies el contenido de ácido graso es dependiente directo de la dieta materna, la composición de estos ácidos grasos varía durante la lactancia para adaptarse a los requerimientos del desarrollo temprano de la cría (11).

### 1.3.6. Vitaminas y minerales

En relación a las vitaminas, no existen estudios referentes a ellas en los diversos grupos de mamíferos. Si bien, sí se ha podido determinar cómo la concentración de estas varían a lo largo de la lactancia mostrando nuevamente la adaptabilidad de la leche a la necesidad de la cría. Por ejemplo, las vitaminas liposolubles disminuyen a media que crece la cría en el caso de osos polares (*Ursusmaritimus*) (26); asimismo, también se ha visto variaciones dentro de una misma familia: el contenido de vitamina A es relativamente estable durante el período de lactancia en las especies de focas arpas y capuchinas, no obstante, la concentración de vitamina E se reduce dramáticamente entre el día del nacimiento y el primer tercio de la lactancia en la primera especie, y entre el día del nacimiento y la lactancia media en la otra (27).

Los elementos minerales se encuentran en la leche como iones y sales inorgánicos, así como formando parte de moléculas orgánicas, tales como proteínas, ácidos nucleicos, etc. (28). La forma química en la que se presentan los minerales es importante porque determina su absorción en el intestino y su utilización biológica. Su contenido en la leche es constante porque depende de la fase de la lactancia, el estado nutricional del animal, y de factores ambientales y genéticos (29).

Respecto a los grupos de mamíferos, la literatura a este respecto es escasa, si bien, por ejemplo, se sabe que en mamíferos terrestres la proporción de calcio y fósforo (Ca:P) en la leche suele ser superior a 1:1, lo que refleja un mayor requerimiento postnatal de calcio debido a su deposición en el desarrollo óseo. Proporciones de Ca:P por encima de 1 también se encuentran en las leches de mamíferos marinos salvo en los otáridos y fócidos, que producen leches con una inversa relación Ca:P, aunque se desconoce el significado funcional (14).

### 1.3.7. Componentes inmunológicos

En las leches más estudiadas, se han encontrado una gran cantidad de componentes inmunológicos tanto humorales (inmunoglobulinas) como celulares (macrófagos y linfocitos), que constituyen su función protectora contra virus, bacterias y parásitos. También, se han descrito proteínas como lisozimas y lactoferrinas, que actúan como bactericidas y bacteriostáticos, además de enzimas como glutatión peroxidasa (antioxidante), lipasas y catalasas con actividad antibacteriana y antiinflamatoria (30). Además, al igual que en leche de bovinos (31), la leche humana contiene hormonas como la prolactina que promueve el desarrollo de linfocitos T y B, y la diferenciación del tejido linfoide intestinal. Adicionalmente, es posible encontrar cortisol, que madura en el intestino, desarrollando mecanismos de defensa, citosinas que actúan como moduladores genéticos y diversos receptores de reconocimiento de microorganismos.

### 1.3.6. Circulación enteromamaria

En leche materna de algunos mamíferos como rumiantes y humanos, se ha demostrado la presencia de una microbiota que presumiblemente exista de forma paralela en el resto de mamíferos (32). Estudios recientes sugieren que al menos una parte importante de las bacterias existentes en leche materna (especialmente lactobacilos y anaerobios estrictos típicamente asociados a la microbiota intestinal) podrían proceder de la biota materna y accederían al epitelio de la glándula mamaria a través de una ruta interna denominada ruta enteromamaria (33). La propagación de las bacterias de las mucosas ocurre a través de la misma circulación de las células del sistema linfático entre los distintos compartimentos asociados a mucosas (34). Según Jeurink et al. la migración activa es favorecida por los exopolisacáridos de las bacterias, gracias a su habilidad de permanecer inmunológicamente silenciosos evaden la respuesta inmunitaria del huésped (35). También, se cree que el influjo hormonal durante la gestación y la lactancia contribuye a este proceso, ya que durante el embarazo hay un aumento de la linfa y de su circulación hacia la glándula mamaria (34).

## 2. Objetivos

El presente trabajo tiene dos objetivos específicos:

**2.1** Estudiar la composición nutricional de la leche materna de dos especies de mamíferos marinos: la orca y el delfín. Para ello se analizará el contenido en lípido total, el contenido de clases lipídicas, el perfil de ácidos grasos, la presencia de peróxidos lipídicos, así como su contenido en proteína.

**2.2** Se realizará un estudio comparativo de la composición de la leche con otras especies de mamíferos ya estudiadas: la leche de cabra, humana y cachalote, con la finalidad de discutir y evaluar los requerimientos nutricionales de las crías recién nacidas, la dependencia del medio donde se desarrollan (marino o terrestres) y la influencia de la dieta materna sobre la composición láctea.

## 3. Material y métodos:

### 3.1 Obtención y preparación de muestras

El presente estudio y análisis fue realizado con muestras de leche materna de la delfina Luna (*Tursiops truncatus*) y la orca Morgan (*Orcinus orca spp.*), ambas cedidas por el zoológico **Loro Parque** en Puerto de la Cruz, Tenerife (España). Las muestras de leche congeladas fueron trasladadas en hielo y oscuridad al laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias (ULL), donde se alicuotaron en tubos eppendorf de distintos volúmenes para guardarlas en el ultracongelador a -70°C para su posterior estudio. El tamaño muestral del estudio fue n=4 para cada leche.

### 3.2 Análisis bioquímicos de las muestras

#### 3.2.1. Extracción de lípido total

Los lípidos totales fueron extraídos según Christie (1982) (36) como modificación del método de Folch (37). Se pipetearon 0,200 ml de leche en un tubo al que se le añadieron 8 ml de cloroformo/metanol (CL:MET) (2:1, v/v), que contenía 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante, y 2 ml de KCl al 0,88% w/v. Tras centrifugar 5 minutos a 1500 rpm, se filtró la fase inferior en otro tubo y se evaporó con flujo continuo de N<sub>2</sub>. A continuación, el lípido obtenido se resuspendió en 0,900 ml de CL:MET en unos viales previamente pesados. Se volvió a evaporar el disolvente de los

viales, quedando solamente el lípido, y se sometieron a vacío y oscuridad durante una noche para determinar el contenido de lípido total gravimétricamente al día siguiente.

Los lípidos aislados fueron resuspendidos en CL:MET (2:1,v/v) con BHT (0,01%) y conservados en el congelador para su posterior análisis.

### 3.2.2 Obtención de ácidos grasos

Para poder obtener ácidos grasos de la fracción lipídica es necesario realizar dos procedimientos. El primero es la transesterificación: ocurre por catálisis ácida, dando lugar a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME: Fatty acid methyl ester). En esta reacción, se rompen los enlaces éster entre los ácidos grasos y los esqueletos hidrocarbonatados, obteniéndose ácidos grasos libres a los que se une un grupo metilo que permite que sean volátiles y se puedan separar por cromatografía de gases.

Se disolvió 1 mg de extracto lipídico en 1 ml de tolueno, agitando en vórtex y se hizo reaccionar con 2 ml de ácido sulfúrico al 1% en metanol (v/v) durante 18 horas a 50°C en un bloque calefactor en oscuridad con atmósfera de N<sub>2</sub>.

Tras su atemperamiento, se pipetearon 5 ml de hexano:dietil éter 1:1 (v/v) (con BHT al 0,01%) y 2 ml de KHCO<sub>3</sub> al 2% (w/v) agitando en vórtex. Se centrifugaron a 1.500 rpm durante 3-5 minutos transfiriendo la fase orgánica superior (en la que se encuentran los FAME) a un segundo tubo, y se evaporó su contenido para proceder a la purificación de los FAME por cromatografía en capa fina (TLC).

### Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina permite eliminar el colesterol y restos de esqueletos de moléculas lipídicas que actúan como contaminantes en el estudio del perfil lipídico. En primer lugar, se redisolviéron los FAME por muestra en 100 µl de hexano. A continuación, se preparó la disolución para desarrollar la cromatografía (90 ml de hexano, 10 ml de éter y 1 ml de ácido acético, para una placa de 20x20). Se cargaron en la placa las muestras y el estándar, a los laterales de estas, y se introdujo en la cubeta hasta que el disolvente llegase a la marca situada en el extremo superior. Una vez sacada y seca, el estándar fue pulverizado con yodina para diferenciar las bandas que corresponden a los FAME. A continuación, la sílice de estas bandas fue raspada y trasvasada a otro tubo. Los tubos se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos con 10ml de hexano:éter y la fase superior con los FAME (libre de sílice) se evaporó en atmósfera de N<sub>2</sub> y redisoluelta en 1-

1,5 ml de hexano. Los FAME obtenidos fueron guardados en el congelador en atmósfera de nitrógeno, hasta el momento de la inyección en el cromatógrafo de gases.

#### Cromatografía de gases:

Los FAMES resuspendidos se inyectaron on-column a 50°C en el cromatógrafo Trace GC Ultra. Los cromatogramas resultantes fueron procesados y, mediante la comparación con un patrón conocido (multiestándar) se identificaron los distintos picos correspondientes a cada ácido graso, siendo cuantificados en valor absoluto en relación a una cantidad exacta y conocida del estándar interno (C 19:0), que había sido añadido justo antes de la transmetilación. Además, la identidad de los picos obtenidos fue confirmada mediante espectrometría de masas acoplada a un cromatógrafo de gases de las mismas características.

#### *3.2.3 Determinación de clases lipídicas*

Las clases lipídicas fueron determinadas por cromatografía en capa fina de alta resolución (High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)) de doble desarrollo (38). Para lo que se utilizaron placas de HPTLC de gel de sílice 60 de 10 x 10 cm (Meck, Darmstadt, Alemania). En primer lugar, se prepararon las soluciones para el desarrollo de los lípidos polares (LP) (metilacetato/isopropanol/cloroformo/metanol/KCl 0,25% (25:25:25:10:9, v/v) y para el desarrollo de los lípidos neutros (LN): hexano/dietil-éter/ácido acético (80:20:2, v/v). A continuación, se cargó en cuatro puntos de cada placa (una por leche de mamífero) 30 µl de lípido total, y se introdujo la placa en la cubeta con la disolución para LP hasta que el solvente alcanzara la mitad. Tras esto, se introdujo en otra cubeta con la disolución para los LN. Una vez desarrollada la placa y seca, se tiñó con una solución de acetato cúprico al 3% en ácido ortofosfórico al 8%. Posteriormente, se llevó a la estufa a 160°C de 10 a 15 minutos.

La cuantificación de las clases lipídicas se llevó a cabo 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.).

### 3.2.4 Determinación de proteína

La determinación del contenido de proteína se realizó según el método de Lowry (39). Es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas.

Inicialmente se preparó una curva de calibrado con disolución estándar de albúmina bovina (Bovine Standard Albumin (BSA) a concentraciones crecientes de BSA a partir de un stock de 1,46 mg/ml de BSA de Bio-Rad. A continuación, en tubos eppendorf, se diluyeron en agua desionizada 20µl de cada muestra a 1/300 en el caso de delfina y 1/400 en el caso de la orla; se les añadió tanto a la curva como a las muestras 20 µl de la disolución digestora (1M de NaOH, 0,25% dodecilsulfato sódico (SDS)) y se colocaron en la manta calefactora a 60° durante 1 hora.

Tras atemperarse, en una multiplaca se pipetearon 20µl de cada tubo repetido en tres pocillos y se les añadió 10 µl de la solución A (1-5% NaOH, 1% Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para formar un complejo proteico coloreado debido a la unión del Cu<sup>++</sup> al nitrógeno de los enlaces peptídicos. Posteriormente, se hizo reaccionar con 80 µl de la solución B (reactivo de Folin) para resaltar el color formado y aumentar la sensibilidad, obteniendo un color azulado debido a la reducción que generan los residuos de los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano de la proteína. Finalmente, se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm.

### 3.2.5 Determinación de peróxidos

La determinación de peróxidos se basó en un método espectrofotométrico. Este método rápido y sensible, utiliza el hierro para la medida de los valores de peróxidos en los lípidos de los alimentos (40). Su fundamento radica en la capacidad que tienen los primeros productos formados en la oxidación de los lípidos (lipidoperóxidos) de oxidar a los iones de hierro (II) que se añaden, transformándolos en iones de hierro (III). Este reacciona con el tiocianato de amonio produciendo una sustancia de color rosado que absorbe a 500 nm.

La cuantificación fue realizada con una curva patrón de hierro (III) a partir de una disolución madre de cloruro de Fe (II) de 10µg/ml. La curva permite calcular la cantidad de Fe (III) que genera nuestra muestra lipídica al oxidar al Fe (II) añadido, como consecuencia del O<sub>2</sub> activo de sus lipoperóxidos. Para llevar a cabo su preparación se tomaron 10mg de lípido total y se añadieron 10 ml de CL:MET (7:3). Esta mezcla se hizo reaccionar con 50 µl de una disolución de tiocianato de amonio (3g/ml) y 50 µl de



disolución de cloruro de Fe (II), agitando entre cada adición. Se dejó reaccionar durante 5 minutos y se leyó la absorbancia a 500 nm. Finalmente se calculó el índice de peróxidos (IP) que se define como los miliequivalentes de oxígeno activo que hay en cada Kg de lípido a partir de la relación de la curva patrón frente a su absorbancia.

### 3.3 Análisis estadístico

Con la finalidad de comparar las diferencias entre los constituyentes de las leches de ambas especies, se realizó una prueba de t-Student para medias independientes. Las variables de estudio fueron: a) el contenido lipídico, b) el contenido proteico, c) nivel de peróxidos, d) composición de clases lipídicas y e) perfil de ácidos grasos. Previamente al desarrollo de dicho análisis, se contrastaron las hipótesis de normalidad a través del test de Shapiro-Wilk y homocedasticidad a través del test de Levene.. Aquellas medias que no respondieron a una distribución normal, fueron analizadas mediante test no paramétrico U de Mann-Whitney. 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 fue  $p \leq 0,05$ .

## 4. Resultados

Las muestras de leche materna procedentes de las dos especies de *Delphinidae* se analizaron con la finalidad de ver el contenido de lípido total, proteína total, nivel de peróxidos, perfil de clases lipídicas y composición de ácidos grasos. Los resultados de los análisis de lípido total, proteína y peróxidos presentes en las muestras de leche se recogen en la **tabla 1**. En ella se observa que no existen diferencias significativas en la composición de estos constituyentes entre ambas especies.

En la **tabla 2** se muestran los resultados del perfil de clases lipídicas de las leches de delfín y orca. El fosfatidilglicerol se encuentra ausente en la leche de delfina, mientras que se observan unos niveles significativamente superiores de fosfatidilcolina (FC), en comparación con la leche de orca. Por su parte, los niveles de colesterol (COL) muestran una tendencia opuesta a la anterior, con una menor proporción en la leche de delfín que en la de orca.

La composición de ácidos grasos obtenidos para ambas especies, expresado en % respecto al total, no muestra ninguna diferencia significativa de ningún ácido graso entre los dos tipos de leche analizadas (**tabla 3**). Los ácidos grasos que predominan son los

monoinsaturados respecto a los poliinsaturados. Respecto a estos últimos, hay un porcentaje de n-3 HUFA en relación a los n-6 HUFA. Habría que resaltar que dentro del grupo de los ácidos grasos insaturados de un solo enlace destacan el ácido oleico 18:1 n-9 y el ácido eicosenoico (20:1 n-9) en ambas especies.

*Tabla 1. Contenido en lípido total, proteína y nivel de peróxidos en la leche de delfín y orca.*

	Leche de delfín ( <i>Tursiops truncatus</i> )	Leche de orca ( <i>Orcinus orca spp</i> )
LT (mg/ml)	208,75± 8,61	267,75 ± 15,15
Proteína (mg/ml)	171,24 ± 34,37	193,36 ± 28,41
IP (meq O <sub>2</sub> / kg óleo)	2,83 ± 1,25	2,29 ± 0,35

Datos expresados como media ± SD. N=4. LT, lípido total. IP, índice de peróxidos. P valor < 0,05\* (test t-Student).

*Tabla 2. Perfil de clases lipídicas (%) de la leche de delfín y orca.*

	Leche de delfín ( <i>Tursiops truncatus</i> )	Leche de orca ( <i>Orcinus orca spp</i> )
ESF	1,40± 0,94	0,54 ± 0,18
FC	2,30 ± 1,31	0,76 ± 0,41*
FS+FI	1,23 ± 0,37	0,43 ± 0,06*
FE	2,91 ± 0,44	2,22 ± 0,51
FG	-	0,43 ± 0,06
COL	5,67 ± 0,50	7,89 ± 0,59*
TG	82,72 ± 2,43	83,90 ± 0,7
EC	3,16 ± 0,71	3,73 ± 0,38
LP	7,84 ± 2,62	4,27 ± 0,90*
LN	90,67 ± 2,50	95,63 ± 0,90

Datos expresados como media ± SD. N=4. ESF, esfingomielina; FC, fosfatidilcolina; FI, fosfatidil inositol; FS, fosfatidil serina; FE, fosfatidiletalona; COL, colesterol; TG, triglicéridos; EC, ésteres de colesterol; LP, lípidos polares, LN, lípidos neutros. P valor < 0,05\* (test t-Student).

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos (%) de la leche de delfín y orca.

	Leche de delfín ( <i>Tursiops truncatus</i> )	Leche de orca ( <i>Orcinus orca spp.</i> )
$\Sigma$ Saturados	31,78 $\pm$ 0,35	31,97 $\pm$ 0,72
14:0	5,85 $\pm$ 0,14	6,10 $\pm$ 0,07
16:0	13,32 $\pm$ 0,68	13,99 $\pm$ 0,83
18:0	3,01 $\pm$ 0,14	2,86 $\pm$ 0,05
$\Sigma$ Monoinsaturados	44,09 $\pm$ 0,61	44,53 $\pm$ 0,63
16:1n-9	0,45 $\pm$ 0,05	0,48 $\pm$ 0,03
16:1n-7	8,29 $\pm$ 0,16	8,14 $\pm$ 0,25
16:1n-5	0,45 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,05
18:1n-9	16,01 $\pm$ 0,07	15,84 $\pm$ 0,34
18:1n-7	3,26 $\pm$ 0,30	3,58 $\pm$ 0,09
18:1n-5	0,64 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,04
20:1n-11	2,58 $\pm$ 0,25	2,88 $\pm$ 0,35
20:1n-9	11,10 $\pm$ 0,12	11,10 $\pm$ 0,44
20:1n-7	0,45 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,07
22:1n-9	0,85 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,12
$\Sigma$ Poliinsaturados n-6	2,36 $\pm$ 0,17	2,66 $\pm$ 0,2
18:2n-6	1,86 $\pm$ 0,09	1,85 $\pm$ 0,14
20:4n-6	0,43 $\pm$ 0,07	0,51 $\pm$ 0,08
$\Sigma$ Poliinsaturados n-3	18,3 $\pm$ 1,06	17,40 $\pm$ 1,27
18:3n-3	1,03 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,08
18:4n-3	2,04 $\pm$ 0,32	1,75 $\pm$ 0,36
20:4n-3	0,92 $\pm$ 0,13	0,81 $\pm$ 0,12
20:5n-3	5,39 $\pm$ 0,16	5,58 $\pm$ 0,38
22:6n-3	7,45 $\pm$ 0,74	6,78 $\pm$ 0,74
HUFA	15,67 $\pm$ 0,64	15,18 $\pm$ 0,78
%n-6 HUFA	2,78 $\pm$ 0,56	3,38 $\pm$ 0,64
% n-3 HUFA	97,22 $\pm$ 0,56	96,62 $\pm$ 0,64
<i>Ratios</i>		
DHA/AA	17,65 $\pm$ 3,84	13,77 $\pm$ 4,15
EPA/AA	12,62 $\pm$ 1,45	11,19 $\pm$ 1,97

Datos expresados como media  $\pm$  SD del % de ácidos grasos. N=4. P valor < 0,05\* (test t-Student).

Asimismo, se llevó a cabo un estudio comparativo con leches de otros mamíferos; tales como la leche de cachalote, cabra y humana. Los datos que a continuación se muestran, han sido obtenidos de análisis realizados con anterioridad en el Departamento de Fisiología Animal de la Universidad de La Laguna, así como resultados de otras investigaciones publicadas.

La información referente al contenido de lípido total, proteína y peróxidos de leche de delfina, orca, cachalote, cabra y humana, se muestra en la **tabla 4**. Tanto el contenido lipídico como proteico de los mamíferos marinos llega a cuadruplicar los valores de los terrestres. Sin embargo, los valores de peróxidos no muestran diferencias significativas en los datos que han sido obtenidos.

En relación al perfil de clases lipídicas (**tabla 5**), los lípidos neutros son predominantes respecto a los lípidos polares en todas las leches estudiadas, debido al elevado contenido en triglicéridos. El nivel de triglicéridos fue inferior en la leche de cachalote debido al aumento de sus constituyentes (MAG, DAG, AGL).

Finalmente, en la **tabla 6** se muestran los perfiles de ácidos grasos de las distintas leches que fueron comparadas. Respecto a los ácidos grasos saturados, la leche de cabra es la que presenta el mayor contenido de estos ácidos grasos. La leche humana presenta el mayor porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados debido principalmente al elevado contenido del 18:1 n-9. En relación a los poliinsaturados, los de la serie n-6 aparecen en mayor proporción en la leche humana mientras que la serie n-3 predomina en los animales del medio marino

*Tabla 4. Comparativa del contenido de lípido total, proteína y nivel de peróxidos de leche de delfín y orca con leche de cachalote, leche de cabra y leche humana.*

	Leche de delfín ( <i>Tursiops truncatus</i> )	Leche de orca ( <i>Orcinus orca spp</i> )	Leche de cachalote (41)	Leche de cabra (42)	Leche humana (43)
LT (mg/ml)	208,75± 8.61	267,75±15,15	200,57	50 ± 0,25	38,14±15,61
Proteína(mg/ml)	171,24 ± 34,37	193,36±28,41	a	42,5 ± 0,23	19,01 ± 4,78
IP (meq O <sub>2</sub> / kg óleo)	2,83 ± 1,25	2,29 ± 0,35	a	a	2,07 ± 0,54

Datos expresados como media ± SD. Todos n=4, salvo cachalote (n=1). a= datos no disponibles.

Tabla 5. Comparativa de las clases lipídicas de leche de delfín y orca con leche de cachalote y leche humana.

	Leche de delfín ( <i>Tursinops truncatus</i> )	Leche de orca ( <i>Orcinus orca spp</i> )	Leche de cachalote (41)	Leche humana (43)
ESF	1,40 ± 0,94	0,54 ± 0,18	-	0,73 ± 0,35
FC	2,30 ± 1,31	0,76 ± 0,41	-	0,66 ± 0,32
FS+FI	1,23 ± 0,37	0,43 ± 0,06	-	0,71 ± 0,38
FE	2,91 ± 0,44	2,22 ± 0,51	-	0,93 ± 0,74
MAG	-	-	9,35	0,7 ± 0,58
DAG	-	-	8,7	3,29 ± 1,08
FG	-	0,43 ± 0,06	-	-
COL	5,67 ± 0,50	7,89 ± 0,59	5,86	4,82 ± 1,18
AGL	-	-	25,12	8,06 ± 3,06
TG	82,72 ± 2,43	83,90 ± 0,7	47,55	74,70 ± 4,37
EC	3,16 ± 0,71	3,73 ± 0,38	3,43	6,71 ± 2,65
LP	7,84 ± 2,62	4,27 ± 0,90	-	3,74 ± 1,98
LN	90,67 ± 2,50	95,63 ± 0,90	99,99	96,26 ± 1,98

Expresado como media ± SD. Todos n=4, salvo cachalote (n=1). ESF, esfingomielina; FC, fosfatidilcolina; FS, fosfatidil serina; FI, fosfatidil inositol; FE, fosfatidiletalonamina; MAG, monoacilglicérido; DAG, diacilglicérido; COL, colesterol; AGL, ácidos grasos libres; TG, triglicéridos; EC, ésteres de colesterol; LP, lípidos polares, LN, lípidos neutros.

Tabla 6. Comparativa del perfil de ácidos grasos (%) de leche de delfín y orca con leche de cachalote, leche de cabra y leche humana.

	Leche de delfín (Tursiops truncatus)	Leche de orca (Orcinus orca spp.)	Leche de cachalote (41)	Leche de cabra(42)	Leche humana(43)
$\Sigma$ Saturados	31,78 $\pm$ 0,35	31,97 $\pm$ 0,72	30,47	68,09 $\pm$ 1,83	19,18 $\pm$ 3,05
14:0	5,85 $\pm$ 0,14	6,10 $\pm$ 0,07	3,14	12,81 $\pm$ 0,48	7,13 $\pm$ 1,5
16:0	13,32 $\pm$ 0,68	13,99 $\pm$ 0,83	20,34	37,48 $\pm$ 1,94	0,22 $\pm$ 0,01
18:0	3,01 $\pm$ 0,14	2,86 $\pm$ 0,05	6,26	6,72 $\pm$ 0,53	5,47 $\pm$ 0,51
$\Sigma$ Monoinsaturados	44,09 $\pm$ 0,61	44,53 $\pm$ 0,63	38,68	23,59 $\pm$ 1,46	59,59 $\pm$ 4,55
16:1n-9	0,45 $\pm$ 0,05	0,48 $\pm$ 0,03	-	0,47 $\pm$ 0,03	20,37 $\pm$ 0,86
16:1n-7	8,29 $\pm$ 0,16	8,14 $\pm$ 0,25	4,24	1,13 $\pm$ 0,09	0,42 $\pm$ 0,08
16:1n-5	0,45 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,05	0,14	-	1,71 $\pm$ 0,28
18:1n-9	16,01 $\pm$ 0,07	15,84 $\pm$ 0,34	21,43	17,58 $\pm$ 1,49	33,51 $\pm$ 3,79
18:1n-7	3,26 $\pm$ 0,30	3,58 $\pm$ 0,09	2,81	1,66 $\pm$ 0,21	2,76 $\pm$ 0,52
18:1n-5	0,64 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,07	0,24	-	-
20:1n-11	2,58 $\pm$ 0,25	2,88 $\pm$ 0,35	8,15	-	-
20:1n-9	11,10 $\pm$ 0,12	11,10 $\pm$ 0,44	-	-	-
20:1n-7	0,45 $\pm$ 0,09	0,54 $\pm$ 0,07	2,08	-	-
22:1n-9	0,85 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,12	-	-	0,05 $\pm$ 0,07
<i>Poliinsaturados n-6</i>	2,36 $\pm$ 0,17	2,66 $\pm$ 0,20	2,79	3,60 $\pm$ 0,48	19,00 $\pm$ 4,73
18:2n-6	1,86 $\pm$ 0,09	1,85 $\pm$ 0,14	0,50	3,34 $\pm$ 0,47	17,74 $\pm$ 4,61
18:3n-6	-	-	0,21	-	0,10 $\pm$ 0,06
20:2n-6	-	-	0,51	-	0,32 $\pm$ 0,03
20:3n-6	-	-	0,08	-	0,36 $\pm$ 0,07
20:4n-6	0,43 $\pm$ 0,07	0,51 $\pm$ 0,08	1,49	0,26 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,07
<i>Poliinsaturados n-3</i>	18,30 $\pm$ 1,06	17,40 $\pm$ 1,27	15,96	0,68 $\pm$ 0,1	0,76 $\pm$ 0,18
18:3n-3	1,03 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,08	0,42	0,54 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,16
18:4n-3	2,04 $\pm$ 0,32	1,75 $\pm$ 0,36	0,08	-	-
20:4n-3	0,92 $\pm$ 0,13	0,81 $\pm$ 0,12	0,30	-	-
20:5n-3	5,39 $\pm$ 0,16	5,58 $\pm$ 0,08	4,04	0,10 $\pm$ 0,07	-
22:6n-3	7,45 $\pm$ 0,74	6,78 $\pm$ 0,74	11,12	0,04 $\pm$ 0,09	0,25 $\pm$ 0,05
<i>HUFA</i>	15,67 $\pm$ 0,64	15,18 $\pm$ 0,78	25,09	0,40 $\pm$ 0,06	1,11 $\pm$ 0,14
%n-6 HUFA	2,78 $\pm$ 0,56	3,38 $\pm$ 0,64	7,85	-	74,65 $\pm$ 5,91
% n-3 HUFA	97,22 $\pm$ 0,56	96,62 $\pm$ 0,64	92,15	-	25,35 $\pm$ 5,91
<i>Ratios</i>					
DHA/AA	17,65 $\pm$ 3,84	13,77 $\pm$ 4,15	37,06	-	0,69 $\pm$ 0,16
EPA/AA	12,62 $\pm$ 1,45	11,19 $\pm$ 1,97	13,40	-	-

## 5. Discusión

Casi todas las especies de mamíferos marinos producen leches excepcionalmente ricas en grasa, hasta tal punto de que en algunas especies llegan a superar el contenido de agua (60:30) (14). Esta característica permite una rápida aportación de grasa tras el nacimiento, generando aislamiento y suministrando energía para mantener el alto metabolismo necesario ante un ambiente térmicamente exigente (14); lo cual es observado en el presente estudio. En el caso de la orca:  $267,75 \pm 15,15$  mg/ml, en la leche de delfín  $208,75 \pm 8,61$  mg/ml y en la de cachalote  $200,07 \pm 11,13$ mg/ml de lípido total.

En relación a lo anteriormente descrito, estudios publicados han observado también elevados niveles de grasa en la leche de delfines en cautiverio: 167 mg/ml (44) y 190 mg/ml de lípido total (45). Sin embargo, la leche de mamíferos terrestres de menor tamaño y que no habitan en medios tan energéticamente exigentes, presentan unos niveles de lípidos totales inferiores. Por ejemplo, la leche de cabra contiene  $42,5 \pm 0,93$  mg/ml (42), y la humana una concentración de grasa que aumenta desde 2mg/ml en el calostro hasta alrededor de 4 a 4,5 mg/ml en la leche madura (15).

Las clases lipídicas también reflejan estas características energéticas específicas de la leche. Respecto a los lípidos neutros, los ácidos grasos de la leche analizada aparecen formando parte mayoritariamente de los triglicéridos (TAG), 82,72% en orca y 83,90% en delfín, careciendo de ácidos grasos libres (AGL), monoacilglicéridos (MAG) y diacilgliceroles (DAG). Asimismo, en la leche humana se observan unos niveles altos de esta clase lipídica aunque también presentan ácidos grasos formando parte de AGL, MAG, y DAG (43). Esto pone de manifiesto el papel tan crítico de reserva y almacenamiento de energía que suponen los triacilglicéridos para el desarrollo del lactante en los mamíferos. Además, es destacable el contenido en colesterol por su papel en el mantenimiento de las estructuras de membranas celulares. Y aunque se observan diferencias significativas entre las especies analizadas, éstas no son relevantes funcionalmente.

En relación a los lípidos polares, cabe destacar que aunque la leche de orca presente unos valores estadísticamente inferiores a la leche de delfín, el significado fisiológico de los mismos es menor en comparación con los lípidos neutros.

Respecto a los ácidos grasos, es sabido que la mayoría de las leches de mamíferos marinos son ricas en cadenas de lípidos poliinsaturados, aunque aún son debatidas las vías de movilización preferencial, la elongación o desaturación de las cadenas, sobre todo en aquellas especies que ingieren dietas bajas en grasa (como los manatíes cuya dieta es exclusivamente vegetal) (14). En el caso de especies carnívoras, como el delfín y la orca, los ácidos grasos poliinsaturados son incorporados directamente de las presas que consumen como diversos perciformes, aulopiformes, mamíferos, tiburones, calamares, tortugas, etc. (46, 47).

En los resultados obtenidos, como se esperaba, no hay presencia ácidos grasos saturados de cadena corta tales como el 6:0 o el 8:0. A este respecto la leche de cabra sí contiene ácidos grasos de cadena corta debido a la fermentación de las bacterias en el rumen que los genera, tales como el 4:0 y el 6:0, aunque no estén presentados en la tabla 6 (48). En relación a ácidos grasos de cadena media saturados, el 16:0 (ácido palmítico) se encuentra en mayor proporción en las especies analizadas y las comparadas con el estudio (tabla 6). Esta notable presencia de ácido palmítico en las leches maternas, se debe a que es un importante regulador de las interacciones de proteínas de transmembrana, e interviene en diversos elementos de transcripción genética involucradas en vías de deposición de grasas (49).

En relación a los monoenoos, estos presentan el mayor porcentaje respecto al total de los ácidos grasos debido a la elevada proporción del ácido oleico (18:1n-9) y del ácido eicosaenoico (20:1n-9) en todas las leches de estudiadas tal y como lo confirman otros estudios (27), lo cual se debe en su mayor parte al elevado contenido de estos ácidos grasos en la dieta procedentes de los vegetales de la cadena trófica.

Respecto a los ácidos grasos poliinsaturados, representan un porcentaje importante dentro de los ácidos grasos que componen las leches de los animales marinos respecto a los terrestres. Los ácidos grasos pertenecientes a la serie n-3 presentan unos valores muy elevados respecto a la serie n-6, debido a la elevada presencia de EPA y DHA con respecto al AA, perteneciente a la serie n-6. Estos aparecen en una proporción invertida en la leche humana, lo cual puede ser debido a la influencia de la dieta materna (20). Como se ha comentado, este tipo de ácidos grasos solo se obtienen de forma directa a través de presas marinas o fitoplacton en el caso de los mamíferos marinos, o a través de



rutas metabólicas de elongación y desaturación de ácidos grasos precursores (en los peces de agua dulce), y a través de la dieta como en el caso de los mamíferos terrestres (20).

Los PUFA, a medida que avanzan las investigaciones, son cada vez más importantes para la nutrición animal. Están localizados en órganos de gran importancia como el cerebro, el cerebelo y la retina, y también en los fosfolípidos de las bicapas lipídicas celulares, participando en señalización hormonal, actividad de receptores y regulación de la expresión génica (21,22).

Es sabido que el ácido docosahexaenoico (DHA:22:6n-3), por su estructura y funcionalidad en las membranas celulares, condiciona el desarrollo estructural y funcional de los sistemas visual-sensorial, perceptual y cognitivo del lactante, hasta tal punto de que en humanos se debate si el consumo de animales marinos ha sido decisivo en la evolución de nuestra inteligencia (50). Esto hace pensar que, dada la enorme cantidad presente en la leche de estos mamíferos marinos, presumiblemente también hayan tenido influencia en la capacidad cognitivo-emocional de estos animales, ya que el propio DHA, por ejemplo, en la leche de cachalote llega a alcanzar una concentración de 14,62%, en la de delfín 7,45% y en la de orca 6,78% (siendo el HUFA en mayor proporción), frente al 0,17- 0,99% del total de ácidos grasos de la leche humana (51).

Por otra parte, los PUFA Omega-3 tienen una acción protectora en la salud cardiovascular humana debido a las características estructurales de estos ácidos grasos y su acción sobre la fluidez de las membranas plasmáticas. En relación a ello, hay evidencia científica que muestra que la frecuencia cardíaca de los animales, desde ratones hasta ballenas, está relacionada directamente con los niveles de DHA (22:6n-3) y EPA (22:5n-3) en sus fosfolípidos cardíacos (52). En base a esto, varios autores han sugerido, que en animales que bucean, como los cetáceos o fócidos, hay una preferencia y movilización mayor de estos ácidos grasos ya que su efecto en las membranas plasmáticas del miocardio, tiende a reducir el gasto cardíaco en la inmersión (53).

Respecto a la proteína en la leche de mamíferos marinos representa alrededor del 8-12% de los constituyentes de la leche (15). En el presente estudio, la leche de delfina contiene 171,24 mg/ml de proteína, es decir 17,12% del total de la leche, resultado semejante al que aportan otros estudios: 16,7-29% (54) y la leche de orca un 19,3%. Comparativamente con la leche humana que contiene 1,9% (15) y la de cabra 5% (42), los animales marinos presentan unos niveles proteicos superiores llegando a ser 5-10

veces superior. En este sentido, la cantidad de proteína de las leches de los diferentes mamíferos, dependen del tamaño y la tasa del metabolismo del animal, así como el tipo de desarrollo que éste presente (5). Animales con desarrollo rápido necesitarán más cantidad de proteína que otros de desarrollo más lento (8).

Por último, el análisis de peróxidos nos indica que las leches estudiadas presentan un grado de oxidación muy bajo, lo que aporta fiabilidad en el almacenamiento y manipulación de las muestras para las determinaciones lipídicas. Según bibliografía consultada (55) para este tipo de análisis se consideran aceptables valores inferiores a 3 meq O<sub>2</sub> / Kg óleo. Además, dado que los AGL (ácidos grasos libres) se encuentran en muy baja concentración, pone de manifiesto que los lípidos no han sufrido degradación enzimática.

## 6. Conclusiones

- 1) El contenido de lípidos y proteínas en las leches de delfín y orca no presentan diferencias significativas entre ellos, presumiblemente porque habitan en medios semejantes y pertenecen a la misma familia.
- 2) El perfil de clases lipídicas muestra una clara predominancia de los lípidos neutros por el elevado contenido de triglicéridos (TG) que contienen, demostrando la importancia de la energía en forma de reserva que demandan los lactantes.
- 3) Los perfiles de ácidos grasos de la leche de delfín y orca, no presentan diferencias significativas entre ellos. Destacando el elevado porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados debido a la elevada proporción de los ácidos oleico y eicosaenoico. Mientras que en los poliinsaturados presentan una elevada proporción de los n-3 PUFA.
- 4) Los mamíferos marinos: orca, delfín y cachalote, presentan en sus leches una fracción lipídica y proteica notablemente superior a los mamíferos terrestres como la leche de cabra y humana.
- 5) La clase lipídica que presenta un mayor porcentaje son los lípidos neutros en todas las leches estudiadas, superando el 90% frente a los lípidos polares. Justificando la demanda de energía en estos estadios postnatales.

- 6) Los perfiles de ácidos grasos presentan semejanzas en todos los mamíferos que habitan en el medio marino, mientras que los mamíferos terrestres presentan diferencias específicas debidas principalmente a la dieta de la madre. Si bien, todas ellas cumplen un papel imprescindible en el desarrollo de las crías a la par que favorecen el correcto funcionamiento fisiológico del organismo.

## Conclusions

- 1) The content of lipids and proteins in dolphin and orca milk do not show significant differences between them, presumably because they live in a similar environment and belong to the same family.
- 2) The lipid classes profile shows a clear predominance of neutral lipids due to the high content of triglycerides (TG), demonstrating the importance of energy reserves demanded by offspring.
- 3) The fatty acid profiles of dolphin and orca milk do not show significant differences between them. Highlighting the high percentage of monounsaturated fatty acids due to the high proportion of oleic and eicosaenoic acids. While in polyunsaturated fatty acids they present a high proportion of n-3 PUFA.
- 4) Marine mammals: orca, dolphin and sperm whale, present in their milk a lipid and protein fraction markedly superior to terrestrial mammals such as goat and human milk.
- 5) The lipid class that presents a higher percentage are the neutral lipids in all the milks studied, exceeding 90% compared to polar lipids. Justifying the demand for energy in these postnatal stages.
- 6) Fatty acid profiles have similarities in all mammals that inhabit the marine environment, while terrestrial mammals have specific differences due mainly to the maternal diet. All of them play an essential role in the offspring development at the same time that they favor the correct physiological functioning of the organism.

## 7. Bibliografía

1. **Linnaeus C.** (1758). Tomus I. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Editio decima, reformata. *HolmiaeLaurentii Salvii*. (1–4):1–824.
2. **Delgadillo, D. M.** (2016). Lactancia: la firma de los mamíferos. *Apuntes de Ciencia & Sociedad*,6(1), 62-69.
3. **Muñoz Cáceres H.** (2003) Lactancia natural. En: Nazer JH, Ramírez RF (Eds.). *Neonatología* (pp. 191-201). Santiago de Chile: Universitaria
4. **Skibieli, A. L., Downing, L. M., Orr, T. J., & Hood, W. R.** (2013). The evolution of the nutrient composition of mammalian milks. *Journal of Animal Ecology*, 82(6), 1254–1264.
5. **Oftedal, O. T.** (2012). The evolution of milk secretion and its ancient origins. *Animal*, 6(3), 355–368.
6. **Hochberg, Z.E., Feil, R., Constancia, M., Fraga, M., Junien, C., Carel, J.C., et al.** (2010) Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. *Endocrine Reviews* 32 (2):159–224.
7. **Hinde, K., & German, J. B.** (2012). Food in an evolutionary context: insights from mother's milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(11), 2219–2223.
8. **Andreas, N. J., Kampmann, B., & Mehring Le-Doare, K.** (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, 91(11), 629–635.
9. **Park, Y.W. & Haenlein, G.F.W.** (2006). Overview of Milks of Minor Species. En: Park, Y.W. & Haenlein, G.F.W. (Eds). *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. (pp. 3-10) Blackwell Publishers. Ames, Iowa y Oxford: Inglaterra.
10. **Iyengar, G.V.** (1982). *Elemental composition of human and animal milk* (No. IAEA-TECDOC--269). International Atomic Energy Agency (IAEA)
11. **Osthoff, G.** (2011). Milk: Milks of Non-Dairy Mammals. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 3, 538-552.
12. **McMahon, D.J. & Oommen, B.S.** (2008). Supramolecular structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science*. 91(5), 1709-1721.
13. **Ginger, M.R. & Grigor, M.R.** (1999). Comparative aspects of milk caseins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 124(2), 133–145.
14. **Shellhorn, C., & Valdés, V.** (1995). La leche humana, composición, beneficios y comparación con la leche de vaca. *Manual de Lactancia para Profesionales de la Salud. Comisión de Lactancia*. Chile: Ministerio de Salud, UNICEF.
15. **Oftedal, O. T.** (2011). Milk of Marine Mammals. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 563–580.
16. **Reich, C. M., & Arnould, J. P.** (2007). Evolution of Pinnipedia lactation strategies: a potential role for  $\alpha$ -lactalbumin? *Biology Letters*, 3(5), 546–549.
17. **Newburg, D. S.** (1996). Oligosaccharides and glycoconjugates in human milk: Their role in host defense. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 1(3), 271–283.
18. **Koletzko, B.** (2016). Human Milk Lipids. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 69(2), 28–40.
19. **Evers, J. M., Haverkamp, R. G., Holroyd, S. E., Jameson, G. B., Mackenzie, D. D. S., & McCarthy, O. J.** (2008). Heterogeneity of milk fat globule membrane structure and composition as observed using fluorescence microscopy techniques. *International Dairy Journal*, 18(12), 1081–1089.
20. **Hegde, M. V., Zanwar, A. A., & Adekar, S. P.** (2016). Omega-3 Fatty Acids: Keys to Nutritional Health. Switzerland: Springer International Publishing.
21. **García-López, R.** (2011). Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediátrica de México*. 32(4), 223-230.
22. **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*.135(2), 75-82.
23. **Dils, R.R., Clark, S., & Knudsen, J.** (1977). Comparative aspects of milk fat synthesis. *Symposia of the Zoological Society of London*. 41, 43–55.
24. **Williams, C. M., & Burdge, G.** (2006). Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65(1), 42-50.

25. **Iverson, S.J., & Oftedal, O.T.** (1995). Phylogenetic and ecological variation in the fatty acid composition of milks. En: Jensen, R.G. (Ed.), *Handbook of Milk Composition* (pp. 790-827). Nueva York, Estados Unidos: Academic Press..
26. **Hedberg, G. E., Derocher, A. E., Andersen, M., Rogers, Q. R., DePeters, E. J., Lönnnerdal, B. & Hollis, B.** (2011). Milk composition in free-ranging polar bears (*Ursus maritimus*) as a model for captive rearing milk formula. *Zoo Biology*, 30(5), 550–565.
27. **Debier, C., Kovacs, K. M., Lydersen, C., Mignolet, E., & Larondelle, Y.** (1999). Vitamin E and vitamin A contents, fatty acid profiles, and gross composition of harp and hooded seal milk through lactation. *Canadian Journal of Zoology*, 77(6), 952–958.
28. **Zamberlin, Š., Antunac, N., Havranek, J. & Samaržija, D.** (2012). Mineral elements in milk and dairy products. *Mljekarstvo*, 62 (2), 111-125.
29. **Neville, M.G., Zhang, P., & Allen, J.C.** (1995) Minerals, Ions, and Trace Elements in Milk: A. Ionic Interactions in Milk. En: Jensen, R.G. (Ed.) *Food Science and Technology, Handbook of Milk Composition* (pp.577-592). Nueva York, Estados Unidos: Academic Press,
30. **García-López, R.** (2011). Composición e inmunología de la leche humana. *Acta pediátrica de México*, 32(4), 223-230.
31. **Jouan, P.-N., Pouliot, Y., Gauthier, S. F., & Laforest, J.-P.** (2006). Hormones in bovine milk and milk products: A survey. *International Dairy Journal*, 16(11), 1408–1414.
32. **Niemiałtowski, M., Schollenberger, A., & Kluciński, W.** (2005). Chapter 13 Mucosal immunity and the bovine entero-mammary link: evolutionary established dialogue between antigen and arms of immune system. *Microbial Ecology in Growing Animals*, 2,293–313.
33. **Álvarez-Calatayud, G., Suárez, E., Rodríguez, J.M. & Pérez-Moreno, J.** (2015) La microbiota en la mujer; aplicaciones clínicas de los probióticos. *Nutrición Hospitalaria*. 32 (1), 56-61.
34. **Newburg, D.S., & Walker, W.A.** (2007). Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatric Research* 61(1),1-8.
35. **Osorio, L. M., & Umbarila, A. S.** (2015). Microbiota de la glándula mamaria. *Pediatría*, 48(1), 1–8.
36. **Christie, W.W.** (1982). Lipid Analysis. In: Christie, W.W. (Ed.) Lipid Analysis. Pergamon Press. Oxford, pp 17-23, 51-61.
37. **Folch, J., Lees, M., & Sloane, G.H.** (1957). A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
38. **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* 129(2), 189-197.
39. **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis, A., & Randall, R.J.** (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal Biology Chemistry*, 193, 265-275.
40. **Shanta, N.C. & Decker, E.A.** (1994). Rapid, Sensitive, Iron-Based Spectrophotometric Methods for Determination of Peroxide Values of Food Lipids. *Journal of the AOAC International*, 77, 421-424.
41. **Jacobo Marrero Pérez.** Aportación personal.
42. **Salazar-Mederos, A.** 2017. *Influencia del residuo de platanera en la composición nutricional de la leche de cabra.* (Trabajo de Fin de Grado). Universidad de La Laguna, España.
43. **García-Ravelo, S., Díaz-Gómez, N. M., Martín, M. V., Dorta-Guerra, R., Murray, M., Escuder, D., & Rodríguez, C.** (2018). Fatty Acid Composition and Eicosanoid Levels (LTE4 and PGE2) of Human Milk from Normal Weight and Overweight Mothers. *Breastfeeding Medicine*. 13(10), 702-710.
44. **Ackman R. G., Eaton C. A. & Mitchell E. D.** (1971) The bottlenosed dolphin *Tursiops truncatus*: fatty acid composition of milk triglycerides. *Canadian Journal of Biochemistry*. 49(10), 1172-1174.
45. **Eichelberger, L., Fetcher, E. S., Geiling, E. M. K. & Vos, B. J.** (1940) The composition of dolphin milk. *The Journal of Biological Chemistry*. 134, 171-176.
46. **Ford, J.K.B., Ellis, G.M., Barrett-Lennard, L.G., Morton, A.B., Palm, R.S., & Balcomb, K.C.** (1998). Dietary specialization in two sympatric populations of killer whales (*Orcinus orca*) in coastal British Columbia and adjacent waters. *Canadian Journal of Zoology*. 76 (8): 1456–1471
47. **Hanson, M. T., & Defran, R. H.** (1993). The behavior and feeding ecology of the Pacific coast bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *Aquatic Mammals*, 19, 127-127.

48. **Markiewicz-Keszycka, M. & Czyżak-Runowska, G., Lipińska, P. & Wójtowski, J.** (2013). Fatty acid profile of milk - A review. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 57(2), 135-139.
49. **Legrand, P., & Rioux, V.** (2010). The Complex and Important Cellular and Metabolic Functions of Saturated Fatty Acids. *Lipids*, 45(10), 941–946.
50. **Cunnane, S., & Stewart, K.** (2010). *Human brain evolution: the influence of freshwater and marine food resources*. Estados Unidos:Wiley.
51. **Gil-Campos, M., & Dalmau Serra, J.** (2010). Importancia del ácido docosahexaenoico (DHA): funciones y recomendaciones para su ingesta en la infancia. *Anales de Pediatría*, 73(3), 143.
52. **Gudbjarnason, S., Oskarsdottir, G., Doell, B., & Hallgrímsson, J.** (1978). Myocardial membrane lipids in relation to cardiovascular disease. *Sudden Coronary Death*. 25, 130-144
53. **Trumble, S. J., & Kanatous, S. B.** (2012). Fatty Acid use in Diving Mammals: More than Merely Fuel. *Frontiers in Physiology*, 3, 184
54. **West, K. L., Oftedal, O. T., Carpenter, J. R., Krames, B. J., Campbell, M., & Sweeney, J. C.** (2007). Effect of lactation stage and concurrent pregnancy on milk composition in the bottlenose dolphin. *Journal of Zoology*, 273(2), 148-160.
55. **Matthäus B., (2010).** Oxidation in foods and beverages and Antioxidant Applications: Management in Different Industry Sectors. Chapter 6: Oxidation of edible oils.

## Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin la aportación de la **Fundación Loro Parque** de las muestras de leche de la delfina Luna y la orca Morgan que acababan de tener crías, pudiendo analizar por primera vez (según la literatura revisada) la composición de la leche de orca.

Asimismo, gracias a Jacobo Marrero de la Asociación Tonina por cedernos los datos de la leche de cachalote, así como bibliografía acerca de los mamíferos marinos.

Gracias a mi directora, Ana Bolaños, por su ejemplo, paciencia, confianza, empuje y por haber hecho que me superase. A mi tutora Sara, por su esfuerzo, por lo aprendido y compartido. A Lupe, porque sin ella el laboratorio del departamento no es el laboratorio del departamento, a Aarón por su ayuda con el análisis estadístico y a Ana Galindo y Miguel por estar dispuestos a colaborar siempre en lo posible.

Por último, gracias a Julia y Roberto, por acompañarme, desde el primer segundo de vida, a donde quiera que marchen mis pasos.

Gracias.