

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Física I



**EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA
DIETA OVINA CON DISTINTAS FUENTES
LIPÍDICAS SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS
GRASOS DE LA LECHE.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Pilar Gómez Cortés

Bajo la dirección de los doctores

Manuel Juárez Iglesias
Miguel Ángel de la Fuente Layos

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-6546-5

© Pilar Gómez Cortés, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Física I



**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA
DIETA OVINA CON DISTINTAS FUENTES
LIPÍDICAS SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS
GRASOS DE LA LECHE**

Tesis Doctoral

Pilar Gómez Cortés

Madrid, 2010



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Física I



Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto del Frío
Departamento de Ciencia y Tecnología de
Productos Lácteos

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA OVINA CON DISTINTAS FUENTES LIPÍDICAS SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE

Memoria presentada por Pilar Gómez Cortés para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Bajo la dirección de la Dra. Manuela Juárez Iglesias y del Dr. Miguel Ángel de la Fuente Layos, actuando como tutora la Dra. Concepción Pando García-Pumarino.



Instituto del Frío

MANUELA JUÁREZ IGLESIAS, DRA. EN CIENCIAS QUÍMICAS Y PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DEL FRÍO DEL C.S.I.C. Y **MIGUEL ÁNGEL DE LA FUENTE LAYOS**, DR. EN CIENCIAS QUÍMICAS Y CIENTÍFICO TITULAR DEL INSTITUTO DEL FRÍO DEL C.S.I.C.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado ***Efecto de la Suplementación de la Dieta Ovina con Distintas Fuentes Lipídicas sobre el Perfil de Ácidos Grasos de la Leche*** y que constituye la Memoria que presenta **Pilar Gómez Cortés** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Instituto del Frío del C.S.I.C. bajo nuestra dirección.

Y para que conste, firman el presente Certificado en Madrid, a 16 de Octubre de 2009.

Dra. Manuela Juárez Iglesias

Dr. Miguel Ángel de la Fuente Layos

A mis padres,

a Paz,

y a Paco.

Agradecimientos

Aún recuerdo aquellos días en los que miraba los tabloneros de la Facultad de Químicas buscando una oportunidad para investigar. El destino quiso que terminase estudiando la grasa láctea y, pese a los momentos duros, no puedo estar más que agradecida por las coordenadas en las que ha transcurrido este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Manuela Juárez y el Dr. Miguel Ángel de la Fuente, el darme la oportunidad de dedicarme a lo que siempre quise hacer y su inestimable ayuda. No creo que haya muchos “jefes” que se impliquen tanto... La curiosidad por los resultados de cada experimento, la pasión que demuestran en su trabajo, serán siempre mis modelos científicos. Muchas gracias, Manoli, por trabajar intensamente en esta tesis a pesar de todos tus compromisos, por leerme mi Introducción en el AVE en vez de dar una cabezada, y especialmente, por tu apoyo personal en momentos clave. ¡Y qué decirle a Miguel Ángel! Gracias por meter prisa, por tus correcciones cervantinas, por los planning difíciles de cumplir, por tu compromiso, por las cañas en Delias... Con el tiempo, creo que hemos formado un buen tándem. Espero que no se te hayan quitado las ganas de dirigir otra tesis y que otros becarios aprendan como yo a tu lado.

Al Departamento de Química Física I (Facultad de Químicas, UCM), en especial a la Dra. Concepción Pando y al Dr. Juan Antonio Rodríguez Renuncio que siempre están dispuestos a echar una mano y se alegran de todos mis avances. Ahora soy yo la que os felicita, por este año 2009 tan dulce, tanto en el plano personal como en el profesional.

Deseo manifestar también mi gratitud al Instituto del Frío, por las facilidades técnicas que han permitido que este proyecto salga adelante, así como a todos aquellos que de una forma u otra han colaborado.

Mención especial merece Valle, por enseñarme ese maravilloso método de extracción desarrollado en el grupo y el manejo del “Agilent”, sin olvidar todo lo que me ha ayudado con las muestras. Me quedo con las sonrisas de esta última temporada y espero que termines fija en el Consejo, ¡lo mereces!. A Pilar, por el análisis de los quesos y cuyo trabajo es la base del mío. A María José por el análisis sensorial, a Esteban por solucionar tantos problemas informáticos y a Miguel Ángel Martínez por quitarme el miedo con el masas.

A los Dres. Ángel Ruiz Mantecón, Gonzalo Hervás, Pilar de Frutos y futuro Dr. Pablo Gutiérrez Toral del Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC). Sin vosotros estos experimentos, y los que quedan por ver la luz, no hubiesen sido posibles.

Al Dr. Alex Bach (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, IRTA), Juan Carlos Rodríguez y Alfonso García (Lodyn S.L), por todas las facilidades. ¡El broche final de esta tesis os lo debo a vosotros!. Esperemos que la patente de buenos frutos...

Al grupo de investigación de los Dres. Arturo Anadón y María Rosa Martínez-Larrañaga del Departamento de Toxicología y Farmacología (Facultad de Veterinaria, UCM). Gracias por el estudio toxicológico de esas grasas tan "valiosas".

I am also very grateful to Prof. J. Thomas Brenna and Cynthia Tyburczy (Division of Nutritional Sciences, Cornell University) for their help with the CACI analysis. They were always willing to help and made things pleasurablely easy.

I want to acknowledge Prof. John K.G Kramer, my fisherman, for his great help and his expert supervision during my stay in Agriculture and Agri-Food (Guelph, ON). The big hug he gave me when I arrived to Toronto Airport was the beginning of the good time I had in his lab. I will never forget how much I learnt from you because of your passion for teaching and passing on your knowledge!. Special thanks to all the smiling faces in John's corner!. To Marta, what a charming woman!. Thank you so much for all your help and to be always ready to give me a hand. You are a great teacher. To Roselle and Roman, my Chinese, how similar we are despite living on different sides of the globe!. We will see each other again, for sure!. To Eduarda, whose visit I am waiting... I hope you will like my country and have enough time to show you around!. I remember with special affection Jansin's tricks on the plane, the arrival of Noe, who brought the good weather to Canada!, and the happiness of Elena and Nuria, my lovely teachers... You should have come before!.

A todos y cada uno de mis compañeros del Instituto del Frío, de manera especial a las "tres Marias" (y futuras Doctoras) que han compartido conmigo tantas risas y confidencias en este despacho: Paquita, Gema y Ana. Sin vuestro apoyo constante no hubiese sido tan fácil... mil gracias, ¡os quiero mucho!.

A los "Lácteos": Laurita, Lola, Luis, Mari Carmen, Mariví, Silvia, Marta, Raquel, Luz, Tomás, Irene... y a los que hacen posible que les haya conocido, los jefes, Félix, Gloria, Javier y Tere. Tampoco puedo olvidar a gente de otros departamentos que hacen más fácil la rutina del día a día: Lucía, Laura, Esther, Oscar, Sara, Sonia, Pilar M., Begoña, Helena, Isa... ¡ni la sonrisa mañanera de Felipe, Montse, Francisco, Ramón y Maite!. Seguro que falta alguien, pero que entienda que tengo mala memoria...

Gracias a Nuria y Catalina, por escucharme tanto y hacerme fuerte, nunca olvidaré todo lo que me ayudasteis. Y gracias a todos esos amigos que siguen mis pasos y que en esta recta final tengo un poco olvidados (no os acostumbréis, ¡Pila vuelve!). Especialmente a Pacita (¡mi family!) y a Krissy, a mis pequeños de la Uni (Juancar, Henar, Ana, Myriam y Pedro), a las risas en Biológicas de Rick y Álvaro (el futuro de la Física en España, ¡increíble!), a la música de EzeLP y a Olatz, por recordarme que valgo.

Para terminar, los agradecimientos más importantes a mi familia. A Elías y Conchita, mis padres, que han trabajado y luchado durante toda su vida para proporcionarnos la mejor educación. Ahora os toca a vosotros disfrutar de la vida, ¡a fundiros la herencia!. A mi hermana Elisa y a Pablo, que juntos cambiarán el mundo montados en bicicleta, al resto de los Gómez-Cortés, que seguro se sienten orgullosos, y sobre todo, a mi Paquito. ¡Gracias por tu apoyo incondicional y por querer siempre lo mejor para mí!. La vida a tu lado puede ser maravillosa...en Escocia, España, Canadá, Noruega ¡o donde nos lleve el viento!. Te quiero.

Y gracias a ti, que lo estás leyendo...

Este trabajo ha sido financiado a través de los siguientes proyectos de investigación:

- Proyecto de Investigación: AGL2005-04760-C02-01

Título: *Efectos de la suplementación de la dieta de ovejas con distintos aceites vegetales sobre el contenido de ácido linoleico conjugado en leche y queso.*

Entidad Financiadora: Ministerio de Educación y Ciencia

Duración: 2005-2007

- Proyecto de Investigación: S-505/AGR-0153

Título: *Nuevos ingredientes funcionales con base científica.*

Entidad Financiadora: Comunidad Autónoma de Madrid

Duración: 2006-2010

- Proyecto de Investigación: Consolider CSD2007-063

Título: *Nuevos ingredientes de alimentos funcionales para mejorar la salud.*

Entidad Financiadora: Ministerio de Educación y Ciencia

Duración: 2007-2011

- Proyecto de Investigación: AGL2008-04805-C02-01

Título: *Mejora del perfil de ácidos grasos saludables de la leche de oveja mediante la modificación de la dieta base y la suplementación con fuentes lipídicas ricas en ácidos grasos omega-3.*

Entidad Financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación

Duración: 2009-2011

Abreviaturas

Ag⁺-HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficacia con intercambiador de iones plata

Ag⁺-TLC: Cromatografía en capa fina con intercambiador de iones plata

Ag⁺-SPE: Extracción en fase sólida con intercambiador de iones plata

CACI-MS/MS: Espectrometría de masas en tandem tras ionización química del acetonitrilo y formación de aductos covalentes

CLA: Ácido linoleico conjugado

DHA: Ácido docosahexaenoico

DMOX: Dimetiloxazolona

DPA: Ácido docosapentaenoico

EFSA: *European Food Safety Authority*

EPA: Ácido eicosapentaenoico

FAME: Éster metílico de ácido graso

FID: Detector de ionización de llama

FIL: Federación Internacional de Lechería (*IDF*, de sus siglas en inglés)

FTIR: Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

G: Suplementación con 2% de aceite de girasol

GC: Cromatografía de gases

G+P: Suplementación con 2% de aceite de girasol y 1% de aceite de pescado

HEL: Suplementación con 12% de semilla de lino extrusionada

IA: Índice aterogénico

LDL/HDL: Lipoproteínas de baja densidad/Lipoproteínas de alta densidad

LEL: Suplementación con 6% de semilla de lino extrusionada

MIE: ión *1-etenil-1-metileniminio*

MFD: Depresión de la grasa en leche

MS: Espectrometría de masas

MUFA: Ácido graso monoinsaturado

P: Suplementación con 1% de aceite de pescado

P+S: Pasto suplementado con grano de avena

PUFA: Ácido graso poliinsaturado

RA: Ácido ruménico (*cis-9, trans-11 C18:2*)

RLnA: Ácido rumelénico (*cis-9, trans-11, cis-15 C18:3*)

TMR: Dieta control 20:80 (relación forraje:concentrado)

VA: Ácido vacénico (*trans-11 C18:1*)

Índice

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ALIMENTACIÓN Y SALUD	3
1.2. LÍPIDOS LÁCTEOS: DESCRIPCIÓN Y ORIGEN	5
1.2.1. Síntesis <i>de novo</i> de los ácidos grasos saturados de cadena par	9
1.2.2. Síntesis de ácidos grasos saturados de cadena impar y ramificados	11
1.2.3. Origen de los ácidos grasos monoinsaturados en rumiantes	11
1.2.4. Síntesis de CLA en rumiantes	13
1.3. LÍPIDOS LÁCTEOS Y SALUD	18
1.3.1. Ácidos grasos saturados	19
1.3.2. Ácidos grasos <i>trans</i>	21
1.3.3. Ácido linoleico conjugado	22
1.3.4. Ácidos grasos poliinsaturados	24
1.3.5. Fosfolípidos	26
1.4. ALTERNATIVAS PARA AUMENTAR LOS NIVELES DE LOS COMPONENTES BIOACTIVOS DE LA GRASA LÁCTEA	26
1.4.1. Modificación del contenido de CLA en la grasa de leche	26
a) Factores de origen animal	27
b) Factores asociados a procesos tecnológicos	28
c) Factores relacionados con la dieta	29
c.1. Inclusión en la dieta de suplementos de origen vegetal	30
c.2. Incorporación de suplementos de origen marino	31

1.4.2. Aumento de los niveles PUFA omega-3 en grasa láctea	32
a) PUFA omega-3 de cadena corta	33
b) PUFA omega-3 de cadena larga	34
1.5. LA LECHE DE OVEJA	35
1.6. ASPECTOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN GRASA DE LECHE	38
1.6.1. Extracción de la grasa de leche	38
1.6.2. Determinación de la composición en ácidos grasos de la grasa láctea	39
a) Derivatización de los ácidos grasos	39
b) Análisis por Cromatografía de Gases	39
c) Análisis por Espectrometría de Masas en Tandem tras Ionización Química del Acetonitrilo y Formación de Aductos Covalentes	42
d) Cromatografía de ión plata (Ag^+) o de Argentación	44
d.1. Cromatografía en Capa Fina con intercambiador de iones plata	45
d.2. Fraccionamiento por Extracción en Fase Sólida con intercambiador de iones plata	45
d.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia con intercambiador de iones plata	47
2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	49

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

55

Artículo 1: <i>Addition of Olive Oil to Dairy Ewe Diets: Effect on Milk Fatty Acid Profile and Animal Performance</i>	57
Artículo 2: <i>Milk Production, Conjugated Linoleic Acid Content, and In Vitro Ruminal Fermentation in Response to High Levels of Soybean Oil in Dairy Ewe Diet</i>	71
Artículo 3: <i>Changes in Milk Fatty Acid Profile and Animal Performance in Response to Fish Oil Supplementation, Alone or in Combination with Sunflower Oil, in Dairy Ewes</i>	85
Artículo 4: <i>Acute Oral Safety Study of Dairy Fat Rich in trans-10 C18:1 versus Vaccenic plus Conjugated Linoleic Acid in Rats</i>	101
Artículo 5: <i>Effect of the Supplementation of Grazing Dairy Ewes with a Cereal Concentrate on Animal Performance and Milk Fatty Acid Profile</i>	115
Artículo 6: <i>Effects of Extruded Linseed Supplementation on n-3 Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acid in Milk and Cheese from Ewes</i>	129
Artículo 7: <i>Characterization of cis-9 trans-11 trans-15 C18:3 in Milk Fat by GC and Covalent Adduct Chemical Ionization Tandem MS</i>	147
4. DISCUSIÓN GENERAL	161

4.1. Adición de ácidos grasos monoinsaturados a la dieta ovina	163
4.2. Suplementación de la dieta de ovejas con aceite de soja	168
4.3. Incorporación de aceite de pescado a la dieta ovina	173
4.4. Estudio toxicológico de grasas enriquecidas en VA+RA y trans-10 C18:1 en animales de experimentación	179
4.5. Efectos del pastoreo con o sin suplementación de concentrado sobre el perfil de ácidos grasos y la producción lechera	181
4.6. Complementación de la dieta ovina con semilla extrusionada de lino	184

4.7. Estudio de quesos elaborados a partir de leche con un perfil en ácidos grasos saludable	186
4.8. Caracterización de intermediarios de la ruta de biohidrogenación del ácido α -linolénico	189
5. CONCLUSIONES	193
6. BIBLIOGRAFÍA	199
ANEXO I. Patente PCT/ES2009/070421	221
ANEXO II. Premio Internacional Hipócrates 2009	229

LISTA DE PUBLICACIONES ORIGINALES

Esta tesis doctoral se ha presentado según el formato de publicaciones y ha dado lugar al conjunto de publicaciones originales enumeradas a continuación:

- Gómez Cortés P., Frutos P., Mantecón A.R., Juárez M., De la Fuente M.A., Hervás G.
Addition of olive oil to dairy ewe diet: effect on milk fatty acid profile and animal performance.
Journal of Dairy Science. 2008. 91:3119-3127.
[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(08\)71107-X/fulltext](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(08)71107-X/fulltext)
- Gómez Cortés P., Hervás G., Mantecón A.R., Juárez M., De la Fuente M.A., Frutos P.
Milk production, CLA content and *in vitro* ruminal fermentation in response to high levels of soybean oil in dairy ewe diet.
Journal of Dairy Science. 2008. 91:1560-1569.
[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(08\)71284-0/fulltext](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(08)71284-0/fulltext)
- Toral P.G., Frutos P., Hervás G., Gómez-Cortés P., Juárez M., De la Fuente M.A.
Changes in milk fatty acid profile and animal performance in response to fish oil supplementation, alone or in combination with sunflower oil, in dairy ewes.
Journal of Dairy Science. 2010. 93:1604-1615.
[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(10\)00134-7/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(10)00134-7/abstract)
- Anadón A., Martínez-Larrañaga M.R., Martínez M.A., Ares I., Ramos E., Gómez-Cortés P., Juárez M., De la Fuente M.A.
Acute oral safety study of dairy fat rich in *trans*-10 C18:1 versus vaccenic plus conjugated linoleic acid in rats.
Food and Chemical Toxicology. 2010. 48:591-598.
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T6P-4XRYT8F-2&user=4225285&coverDate=02%2F28%2F2010&rdoc=1&fmt=high&o

[rig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000048559&_version=1
&_urlVersion=0&_userid=4225285&md5=a5ef7a92e59325787bc8d390b8f1e76
5](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(09)70720-9/fulltext)

- Gómez Cortés P., Frutos P., Mantecón A.R., Juárez M., De la Fuente M.A., Hervás G.
Effect of the supplementation of grazing dairy ewes with a cereal concentrate on animal performance, milk fatty acid profile and rumen fermentation.
Journal of Dairy Science. 2009. 92:3964-3972.
[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(09\)70720-9/fulltext](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(09)70720-9/fulltext)
- Gómez Cortés P., Bach A., Luna P., Juárez M., De la Fuente M.A.
Extruded linseed on ewes rations improves omega-3 fatty acids and conjugated linoleic acid contents in cheese and milk fat.
Journal of Dairy Science. 2009. 92:4122-4134.
[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(09\)70737-4/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(09)70737-4/abstract)
- Gómez Cortés P., Tyburczy C., Brenna J.T., Juárez M., De la Fuente M.A.
Characterization by GC-MS and CACI-MS/MS of *cis*-9 *trans*-11 *trans*-15 C18:3 in milk fat.
Journal of Lipid Research. 2009. 50:2412-2420.
<http://www.jlr.org/cgi/content/abstract/50/12/2412>

1. Introducción

1.1. ALIMENTACIÓN Y SALUD

Las evidencias científicas que relacionan alimentación y salud se han multiplicado durante los últimos 10 años aumentando el interés del consumidor por los efectos que la dieta pueda ejercer sobre la disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y otras patologías. Numerosos trabajos de investigación han constatado que distintos constituyentes de los alimentos son ingredientes de interés para la salud: componentes derivados de las proteínas, lípidos, oligosacáridos, minerales, vitaminas y antioxidantes entre otros (Wildman, 2007). Así se han identificado péptidos con actividad antihipertensiva, elementos minerales como el calcio que puede contribuir a un retraso en la aparición de la osteoporosis, ácidos poliinsaturados con potencial reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, esteroides de plantas que pueden inhibir la absorción de colesterol, componentes con actividad antioxidante y prebióticos o microorganismos probióticos para mejorar la flora intestinal.

Un alimento funcional es aquel que además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas, puede proporcionar beneficios para la salud y reducir el riesgo de padecer enfermedades. Este nuevo concepto surge en Japón en la década de los años 80 cuando las autoridades intentaron reducir los gastos sanitarios, generados por la mayor longevidad de la población, y garantizar una mejor calidad de vida. El gobierno nipón desarrolló entonces el programa FOSHE (*Foods for Specific Use and Health*) para estudiar alimentos funcionales. Más tarde, en la década de los 90, la Unión Europea financió una Acción Concertada y un proyecto (*Functional Food Science in Europe*, FUFOSSE) para fomentar el desarrollo de estos alimentos y aportar evidencias científicas sobre sus potenciales beneficios.

El reglamento europeo (CE N° 1924/2006), que entró en vigor en enero del 2007 y se comenzó a aplicar en julio de dicho año, constituye un avance importante en la regulación de la publicidad y etiquetado de los alimentos funcionales, ya que establece las normas por las que deberá regirse la industria alimentaria para poder afirmar que un

alimento aporta determinadas propiedades saludables. Las *alegaciones* establecidas por este reglamento son:

- Sobre contenido nutricional
- Relativas a la salud
 - a) De propiedades saludables
 - b) Reducción del riesgo de enfermedad

y se debe garantizar que estas últimas se realicen en función de evidencias científicas reales.

En las sociedades industrializadas, donde una gran parte de la población tiene cubiertas las necesidades nutricionales mínimas, se demandan cada vez más alimentos funcionales y por ello, el número de estudios sobre esta materia ha crecido exponencialmente en la última década (Wildman, 2007; Siró *et al.*, 2008; Rudkowska, 2009). Las múltiples posibilidades de elaboración de este tipo de productos se basan en la incorporación a un alimento convencional de ingredientes con actividad biológica -en general de origen natural- de interés para la salud pero sin función terapéutica, la eliminación de constituyentes no deseados o la modificación de otros, así como el aumento de la concentración de un componente naturalmente presente con efectos beneficiosos para la salud. La gama de productos comercializados actualmente ha aumentado de forma notable y han surgido en el mercado alimentos con alto contenido en determinados ácidos grasos o esteroides, péptidos bioactivos, antioxidantes, proteínas de soja, carbohidratos prebióticos así como alimentos enriquecidos en minerales o vitaminas y productos fermentados mediante la utilización de bacterias probióticas.

Los desarrollos tecnológicos en este campo han sido espectaculares y estos productos, que están irrumpiendo con fuerza en los mercados internacionales, serán probablemente la herramienta más importante que disponga en el futuro la Ciencia de los Alimentos y la Nutrición. Destacan, de forma especial, los numerosos avances en el campo de los productos lácteos, probablemente por la facilidad de incorporación de ingredientes a esta matriz alimentaria (Huth *et al.*, 2006). De esta manera se han desarrollado leches enriquecidas en calcio y en distintas vitaminas, sobre todo A, D y E, leches fermentadas dirigidas a mejorar la flora intestinal y el estado inmunológico, y productos lácteos que incorporan péptidos con actividad antihipertensiva o esteroides vegetales para reducir los niveles de colesterol. También se han comenzado a

comercializar quesos con bacterias probióticas incorporadas o con β -sitosterol y, con una difusión más limitada, leches con la lactosa hidrolizada o con adición de fibra soluble. Aunque las leches enriquecidas en distintos componentes han tenido un gran desarrollo en los últimos años, otra tendencia de interés creciente en cuanto a lácteos funcionales, es la sustitución de componentes con efectos potencialmente negativos por otros que puedan resultar beneficiosos (Mataix y Gil, 2004). Es el caso de los derivados lácteos en los que parte o la totalidad de la grasa de leche se ha sustituido por grasas vegetales o mezcla de éstas con aceite de pescado. De esta forma se incrementan los niveles de ácidos grasos omega-3, con el consiguiente beneficio para la prevención de enfermedades cardiovasculares (Li *et al.*, 2003).

En la línea de lípidos funcionales, actualmente se pueden encontrar también en el mercado preparados lácteos enriquecidos en *Tonalín*, producto obtenido a partir del aceite de cártamo, rico en los isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA) *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12 C18:2 (Laso *et al.*, 2007). Algunos estudios científicos avalan que los productos enriquecidos en *Tonalín* disminuyen el contenido en grasa corporal, bien por la inhibición de la lipogénesis (formación de tejido adiposo) como por el potencial estímulo que puedan ejercer sobre la lipólisis (transformación de grasas en energía) (Gauillier *et al.*, 2004 y 2007; Raff *et al.*, 2009). Este efecto sería atribuible al isómero *trans*-10, *cis*-12 C18:2 (Park *et al.*, 1999).

1.2. LÍPIDOS LÁCTEOS: DESCRIPCIÓN Y ORIGEN

La leche es una mezcla en equilibrio de proteínas, grasa, carbohidratos, sales y otros componentes minoritarios dispersos en el agua como emulsiones, suspensiones coloidales y soluciones verdaderas. Es un alimento básico que tiene la función primordial de satisfacer los requerimientos nutricionales en la primera etapa de la vida. Además, en la dieta de adolescentes y adultos la ingesta de leche resulta muy beneficiosa por la presencia de una amplia gama de nutrientes y un alto aporte nutricional en relación con su contenido en calorías.

Los lípidos figuran entre los constituyentes más importantes de la leche, en razón de aspectos económicos, nutritivos y por las características físicas y organolépticas que imparten a los productos lácteos. El componente mayoritario de la fracción lipídica son los triglicéridos, con una proporción superior al 95%. También figuran en su composición cantidades menores de otros lípidos simples (diglicéridos, monoglicéridos y ésteres de colesterol), lípidos complejos y compuestos liposolubles (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Composición de los lípidos de la leche de vaca (%).

Triglicéridos	97 - 98
Diglicéridos	0,28 - 0,59
Monoglicéridos	0,16 - 0,38
Acidos grasos libres	0,10 - 0,44
Fosfolípidos	0,20 - 1,00 ¹
Colesterol	0,25 - 0,35
Hidrocarburos	Trazas

¹ Incluye la esfingomielina.

Datos tomados de Jensen (2002) y Goudjil (2003).

La grasa láctea ha sido históricamente una de las fuentes lipídicas de mayor consumo a nivel mundial. La leche entera de vaca se comercializa con un contenido de grasa próximo al 3,5%, similar al de leche caprina, mientras que los niveles en leche de oveja superan el 5,5% y por ello, es la materia prima idónea para la fabricación de quesos (Tabla 1.2). Físicamente la grasa de leche se encuentra en forma de glóbulos, con un tamaño medio de 3-4 μm en leche de vaca y un volumen menor en las leches de oveja y cabra. Cada glóbulo graso está constituido por un núcleo hidrofóbico compuesto por ácidos grasos, que se hallan mayoritariamente esterificados formando triglicéridos. Estas moléculas son insolubles en agua, ricas en energía metabólica y se encuentran rodeadas por una membrana de naturaleza lipoproteica, constituida mayoritariamente por fosfolípidos y colesterol, que protege a los triglicéridos de la acción de enzimas lipolíticas.

El contenido de fosfolípidos en la grasa láctea varía de 0,2 a 1,0 % (Tabla 1.1) del cual más del 20% se corresponde con la esfingomielina (German y Dillard, 2006; López *et al.*, 2008), un compuesto relacionado con actividades biológicas de interés (ver apartado 1.3.5). La importancia de los fosfolípidos reside también en sus funciones estructurales, ya que están presentes en todas las membranas celulares.

Tabla 1.2: Contenidos de grasa total y ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en leche de distintos mamíferos (g/100 g).

	Grasa total	SFA ¹	MUFA ²	PUFA ³ ω-6	PUFA ³ ω-3	ω-6/ω-3
Leche de vaca						
<i>Entera</i>	3,6	2,48	0,93	0,10	0,02	5,00
<i>Semidesnatada</i>	1,7	1,07	0,39	0,05	0,01	5,00
<i>Desnatada</i>	0,3	0,13	0,06	-	-	-
Leche de oveja	5,8	3,58	1,22	0,29	0,06	4,83
Leche de cabra	3,7	2,37	0,83	0,13	0,03	4,33
Leche humana	4,1	1,92	1,47	0,41	0,08	5,12

¹ Ácidos grasos saturados. ² Ácidos grasos monoinsaturados. ³ Ácidos grasos poliinsaturados.

Datos tomados de Mataix y Gil (2004).

Aunque en la leche se han detectado hasta 400 ácidos grasos diferentes, sólo un número próximo a 30 se encuentra en una proporción superior al 0,1%; el resto está presente a nivel de trazas. Como se muestra en la Tabla 1.2, los ácidos grasos mayoritarios presentes en la grasa de leche derivada de rumiantes son saturados (C4:0-C18:0) y monoinsaturados (MUFA). Entre estos últimos destaca el ácido oleico (*cis*-9 C18:1). Respecto a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), el más abundante en grasa láctea es el ácido linoleico (*cis*-9, *cis*-12 C18:2 omega-6), característico de los aceites de oleaginosas, seguido del ácido α -linolénico (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3), el único ácido graso omega-3 presente de forma natural, aunque con niveles que no suelen superar el 0,7% del total de ácidos grasos (Tabla 1.3).

Tabla 1.3: Composición media de los ácidos grasos más abundantes en leches de vaca, oveja y cabra (% del total de ácidos grasos).

Ácido graso	ESPECIE		
	Vaca ^a	Oveja ^b	Cabra ^c
C4:0	3,13	3,51	2,18
C6:0	1,94	2,90	2,39
C8:0	1,17	2,64	2,73
C10:0	2,48	7,82	9,97
C12:0	2,99	4,38	4,99
C14:0	10,38	10,43	9,81
<i>cis</i> -9 C14:1	1,08	0,28	0,18
<i>iso</i> C15:0	0,29	0,34	0,13
<i>anteiso</i> C15:0	0,50	0,47	0,21
C15:0	1,05	0,99	0,71
<i>iso</i> C16:0	0,22	0,21	0,24
C16:0	28,51	25,93	28,23
<i>cis</i> -9 C16:1	1,73	1,03	1,59
<i>iso</i> C17:0	0,55	0,53	0,35
<i>anteiso</i> C17:0	0,52	0,30	0,42
C17:0	0,73	0,63	0,72
C18:0	10,51	9,57	8,88
<i>cis</i> -9 C18:1	20,50	18,20	19,29
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 C18:2	3,13	2,33	3,19
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 C18:3	0,59	0,63	0,42
CLA ¹	1,03	0,74	0,70
<i>trans</i> C18:1 (total)	4,25	2,90	2,12
C18:2 (total)	4,16	3,21	3,89

¹ Ácido Linoleico Conjugado

Datos tomados de ^a Jensen (2002) y Moate *et al.* (2007); ^b Goudjil *et al.* (2004) y ^c Alonso *et al.* (1999).

Según su longitud de cadena, los ácidos grasos se pueden clasificar en ácidos grasos de cadena corta (C4:0 y C6:0), media (C8:0-C12:0) y larga (C14:0-C18:0 o más átomos de carbono). La grasa láctea derivada de rumiantes presenta contenidos elevados de ácidos grasos saturados de cadena corta, los cuales no figuran en la leche de otros mamíferos. El ácido butírico (C4:0) y caproico (C6:0) contribuyen a mantener la fluidez de la grasa de leche y facilitan su secreción desde la glándula mamaria.

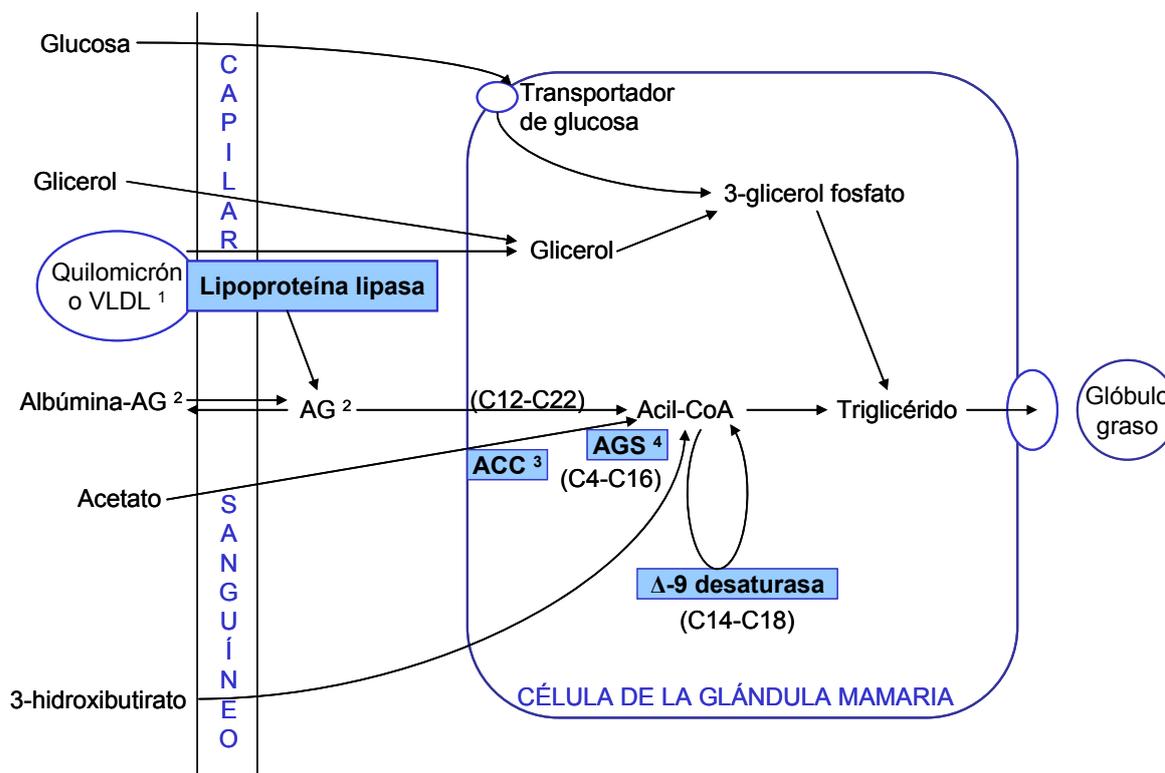
Los ácidos grasos se esterifican selectivamente en la molécula de glicerol para que el punto de fusión de la grasa sea menor o igual a 39°C, la temperatura corporal del rumiante. Aproximadamente un tercio de los triglicéridos que se encuentran en la grasa de leche tienen esterificada una molécula de ácido butírico en la posición estereoespecífica *sn*-3. Los ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) se localizan preferentemente en la posición *sn*-2, y el ácido esteárico (C18:0) en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del triglicérido (Jensen, 2002).

1.2.1. Síntesis de novo de los ácidos grasos saturados de cadena par

La mayor parte de los ácidos grasos saturados de número par de átomos de carbono presentes en la grasa láctea de rumiantes, desde el C6:0 al C14:0 y aproximadamente la mitad del contenido de C16:0, se sintetizan *de novo* en las células epiteliales de la glándula mamaria (Palmquist, 2006). La síntesis de los mismos se produce a partir de las moléculas de acetato y del β -hidroxibutirato circulantes en el torrente sanguíneo (Figura 1.1), generadas en el rumen durante la fermentación de los hidratos de carbono de la dieta. Las dos enzimas principales responsables de la síntesis *de novo* en la glándula mamaria son la *acetil-CoA carboxilasa* y la *ácido graso sintetasa* (Figura 1.1). Esta última regula la elongación de cadena de los ácidos grasos sintetizados *de novo*.

Aproximadamente el 50% del ácido palmítico presente en la leche así como la mayoría de los ácidos grasos de 18 o más átomos de carbono proceden de la absorción de lípidos de la dieta o de la movilización de reservas de grasas corporales (Palmquist, 2006). Estos ácidos grasos, que son transportados en el plasma en forma de lipoproteínas (VLDL o quilomicrones) o como ácidos grasos libres ligados a albúmina, acceden al citoplasma de las células de la glándula mamaria una vez liberados de dichas macromoléculas, por acción de la enzima *lipoproteína lipasa* (Figura 1.1).

Figura 1.1: Síntesis de grasa láctea en rumiantes.



¹ Lipoproteínas de muy baja densidad. ² Ácido graso. ³ Acetil-CoA carboxilasa. ⁴ Ácido graso sintetasa.
 Figura adaptada de Chilliard *et al.* (2000).

El contenido en ácidos grasos saturados de la leche puede variar substancialmente dependiendo de las condiciones fisiológicas. Se ha argumentado que un aumento de la absorción por la glándula mamaria de ácidos grasos de cadena larga procedentes del torrente sanguíneo, podría inhibir la actividad de enzimas implicadas en la síntesis *de novo* de ácidos grasos de cadena corta y media (Chilliard y Ferlay, 2004) y que este efecto inhibitorio sería más marcado cuando los ácidos grasos absorbidos poseen un mayor número de insaturaciones y configuración geométrica *trans* (Chilliard *et al.*, 2000). Además, dado que la incorporación directa de ácidos grasos de cadena larga en la leche es un proceso energéticamente más eficiente que la síntesis de ácidos grasos *de novo*, la inclusión de ácidos grasos PUFA en la dieta de rumiantes podría ser una buena estrategia para disminuir los niveles de ciertos ácidos grasos saturados en la grasa láctea (C12:0, C14:0 y C16:0 principalmente), potencialmente asociados con el riesgo de enfermedades cardiovasculares (ver apartado 1.3.1).

1.2.2. Síntesis de ácidos grasos saturados de cadena impar y ramificados

La grasa de leche de rumiantes se diferencia respecto a la de otros mamíferos, por la presencia de niveles destacados de ácidos grasos saturados impares y ramificados. Estos ácidos grasos son sintetizados mayoritariamente en la cavidad ruminal por la acción de enzimas bacterianas y son particularmente abundantes en leche de cabra (Alonso *et al.*, 1999). Los mayores contenidos se observaron para el C15:0 y C17:0 así como para los isómeros ramificados de ambos y del C16:0 (*iso* C15:0, *anteiso* C15:0, *iso* C16:0, *iso* C17:0 y *anteiso* C17:0) (Tabla 1.3, página 8). Aunque en conjunto sus niveles en grasa láctea están en torno al 4%, tienen interés porque se utilizan como herramienta de diagnóstico para determinar si existe un correcto funcionamiento de la cavidad ruminal y, en humanos, como indicadores de la ingesta de productos lácteos. Además, en comparación a sus homólogos no ramificados, presentan puntos de fusión más bajos, especialmente los *anteisos*, lo cual puede contribuir a mantener la fluidez de la grasa láctea (Vlaeminck *et al.*, 2006).

1.2.3. Origen de los ácidos grasos monoinsaturados en rumiantes

En términos generales, los ácidos grasos insaturados de las grasas de origen vegetal y de la mayoría de origen animal poseen configuración *cis*. En grasa de leche, el *cis*-9 C18:1 es el ácido graso insaturado mayoritario (Tabla 1.3, página 8). Proviene directamente de la dieta de rumiantes así como de la desaturación del ácido esteárico, por medio de la enzima Δ -9 *desaturasa*, en la glándula mamaria (ver apartado 1.4.1.a). Los ácidos grasos *trans* también se encuentran de forma natural en alimentos derivados de rumiantes, como la carne, el queso o la leche, producidos por reacciones de isomerización de los PUFA de la dieta que tienen lugar en el rumen. Los dobles enlaces tipo *cis* producen acodaduras en la cadena alifática, formando un ángulo de 30°, a diferencia de la configuración *trans* que se asemeja a la forma extendida característica de las cadenas saturadas.

La grasa láctea contiene entre 1-8% de ácidos grasos *trans*, siendo el *trans*-11 C18:1 o ácido vacénico (VA) el isómero cuantitativamente más importante (Figura 1.2A y 1.2B). En contraste, las grasas comestibles de origen industrial obtenidas por

hidrogenación pueden presentar niveles mayores de ácidos grasos *trans* y además un perfil isomérico diferente. En los procesos industriales de hidrogenación de grasas vegetales (con abundancia de dobles enlaces con geometría *cis*) se pueden generar ácidos grasos *trans* MUFA y PUFA. La isomerización aumenta el punto de fusión de los aceites vegetales y de pescado y por ello, son utilizados por la industria como ingredientes de productos de repostería y otros alimentos.

Los aceites parcialmente hidrogenados pueden presentar niveles variados de ácidos grasos *trans*, alcanzándose cifras superiores al 10% del total de ácidos grasos. Su perfil isomérico sigue una distribución gaussiana con los contenidos más elevados para los isómeros *trans*-9, *trans*-10, *trans*-11 y *trans*-12 C18:1 (Figura 1.2D). No obstante, en los últimos años, las industrias elaboradoras de grasas hidrogenadas han mejorado los procesos tecnológicos y los niveles de ácidos grasos *trans* pueden ser considerablemente más bajos.

Figura 1.2: Distribución de los isómeros *trans* C18:1 en grasa láctea (A) caprina, (B) bovina, (C) humana y (D) vegetal hidrogenada. El eje de abscisas muestra la posición del doble enlace en la cadena hidrocarbonada.

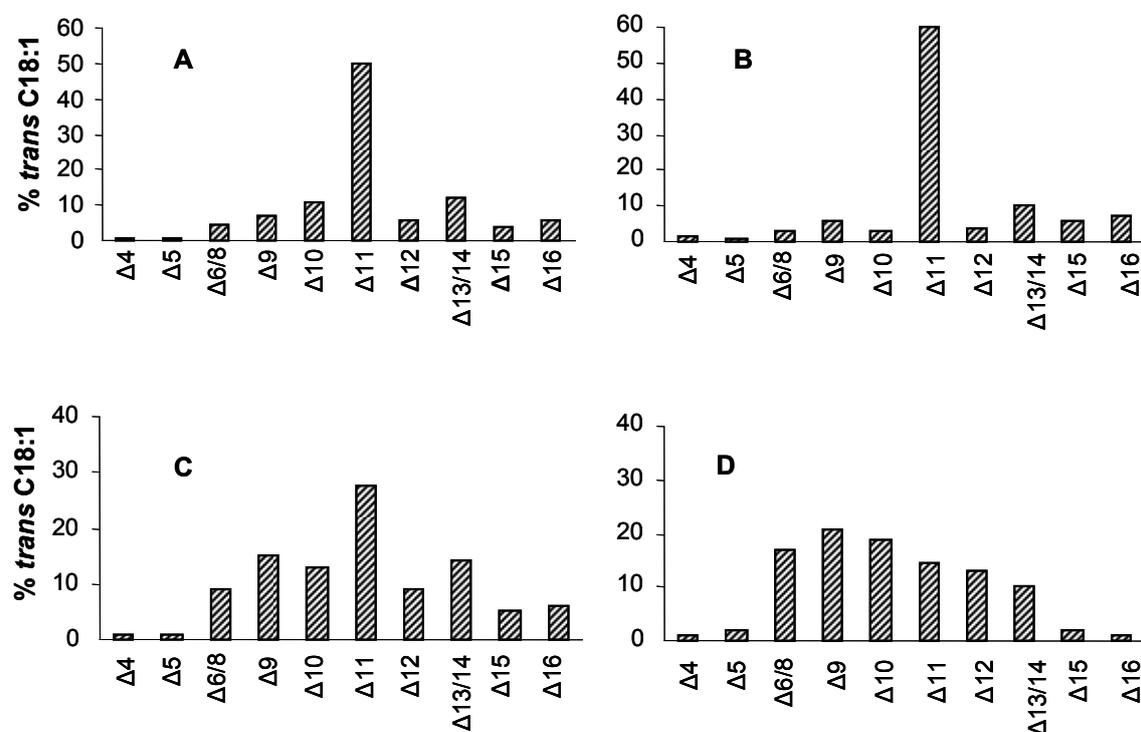


Figura tomada de Shingfield *et al.* (2008a).

La composición de ácidos grasos *trans* C18:1 en la leche humana (Figura 1.2C) simula una mezcla de ambos perfiles, probablemente como consecuencia de la ingesta de grasas derivadas tanto de rumiantes como de alimentos que contienen ingredientes de origen industrial.

1.2.4. Síntesis de CLA en rumiantes

Otro grupo de ácidos grasos que se encuentran de forma natural en la grasa de leche de rumiantes y que ha suscitado un interés creciente en las últimas décadas (ver apartado 1.3.3), es el CLA. El acrónimo CLA es un término que engloba una mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico con los dobles enlaces conjugados en distintas posiciones de la molécula. Numerosos estudios han demostrado la existencia de una gran variedad de moléculas de CLA en grasa láctea, fruto de las distintas combinaciones de isómeros posicionales (6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15) y geométricos (*cis-trans*, *trans-cis*, *cis-cis*, *trans-trans*) (Tabla 1.4).

Tabla 1.4: Intervalos de variación de isómeros del ácido linoleico conjugado en grasa de leche de vaca, oveja y cabra (% del total de CLA). (*c* = *cis* y *t* = *trans*).

Isómero	Vaca ^a	Oveja ^b	Cabra ^c
<i>trans</i> -12, <i>trans</i> -14	1,5-2,6	1,3-3,5	0,2-0,5
<i>trans</i> -11, <i>trans</i> -13	2,6-4,6	1,2-5,1	0,7-1,5
<i>trans</i> -10, <i>trans</i> -12	1,0-1,5	1,2-1,8	0,5-1,4
<i>trans</i> -9, <i>trans</i> -11	2,3-3,5	1,1-2,0	1,7-2,6
<i>trans</i> -8, <i>trans</i> -10	0,4-0,9	1,0-1,4	0,5-0,8
<i>trans</i> -7, <i>trans</i> -9	0,9-1,1	0,5-0,6	0,4-0,6
11-13 (<i>c,t</i> / <i>t,c</i>)	2,0-7,5	0,8-4,2	0,3-0,8
10-12 (<i>c,t</i> / <i>t,c</i>)	0,7-1,8	0,3-0,4	0,6-0,8
9-11 (<i>c,t</i> / <i>t,c</i>)	76,7-80,7	76,5-82,4	81,8-85,9
7-9 (<i>c,t</i> / <i>t,c</i>)	1,9-5,8	3,3-9,7	6,6-8,0

Datos tomados de ^a Kraft *et al.* (2003); ^b Luna *et al.* (2005a) y ^c Luna *et al.* (2008a).

La mayoría de estos isómeros se encuentran, de forma natural y en pequeñas cantidades, en la grasa de alimentos derivados de rumiantes, fundamentalmente productos lácteos (Parodi, 2003; Cruz-Hernández *et al.*, 2006). En leche, más del 70% del contenido en CLA (Tabla 1.4) se corresponde con el ácido graso *cis-9, trans-11* C18:2 al que se le atribuyen la mayoría de sus propiedades biológicas (ver apartado 1.3.3) (Figura 1.3).

Figura 1.3: Estructura química de *trans-10, cis-12* C18:2 (A), ácido ruménico: *cis-9, trans-11* C18:2 (B) y ácido linoleico: *cis-9, cis-12* C18:2 (C).

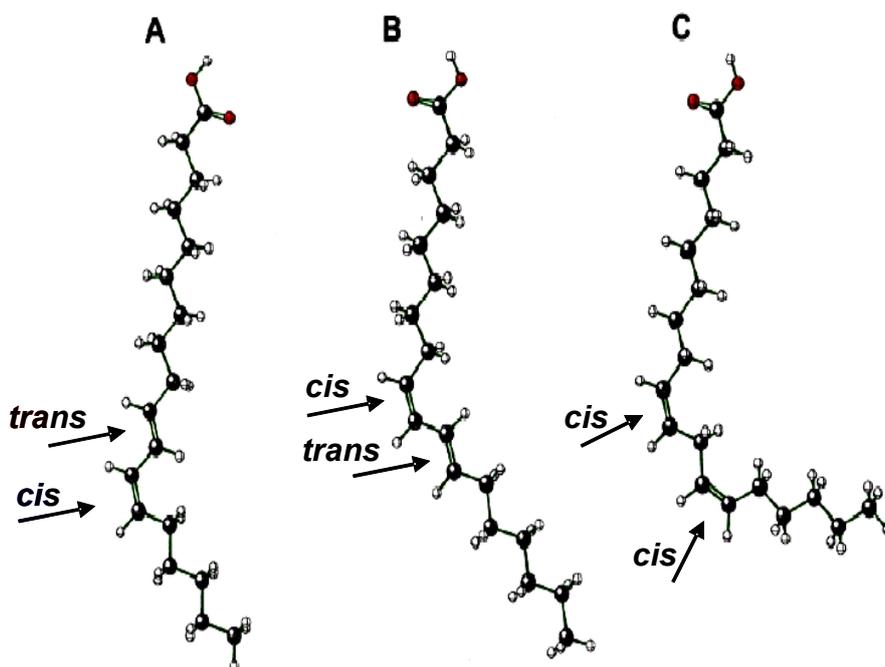


Figura adaptada de Bauman *et al.* (1999).

El isómero *cis-9, trans-11* C18:2 adoptó el nombre de ácido ruménico (RA) ya que inicialmente su origen se atribuyó casi exclusivamente a la biohidrogenación de los PUFA de la dieta (Kramer *et al.* 1998) por acción de enzimas de microorganismos presentes en la cavidad ruminal, entre los que *Butyrivibrio fibrisolvens* jugaría el papel más relevante (Kepler y Tove, 1967; Kim *et al.*, 2000). El RA, junto a otros ácidos grasos *trans* MUFA, fundamentalmente VA, son los intermediarios más destacados del proceso de hidrogenación (Figura 1.4). El primer paso de esta ruta implica la isomerización del doble enlace en posición 12 del ácido linoleico que es transferido con

configuración *trans* al carbono 11 para dar lugar a RA. Esta etapa viene seguida de una rápida hidrogenación del enlace *cis*-9 para formar VA, y una segunda sobre el enlace *trans*-11 para dar lugar, finalmente, a ácido esteárico (C18:0). La última reacción de biohidrogenación tiene lugar gracias al concurso de un grupo de microorganismos diferentes a *B. fibrisolvens* (Jenkins *et al.*, 2008). Este hecho junto a la gran estabilidad que posee la configuración del enlace *trans*-11 (Kraft *et al.*, 2003), hacen de la conversión del VA a esteárico la etapa limitante de todo el proceso, lo cual podría provocar, bajo determinadas condiciones metabólicas, una acumulación de dicho ácido graso en el fluido post ruminal (Figura 1.4).

Figura 1.4: Rutas principales de formación de *cis*-9, *trans*-11 C18:2 en el rumen y en la glándula mamaria de rumiantes.

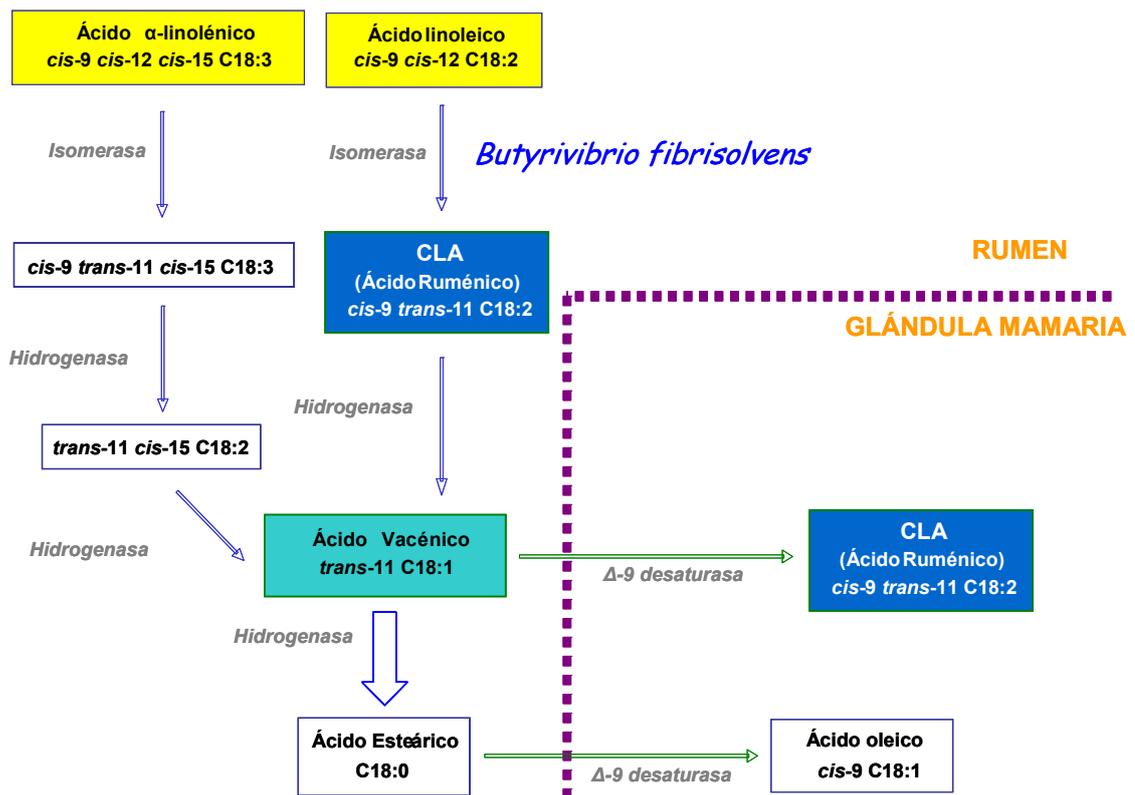


Figura adaptada de Harfoot y Hazlewood (1997).

La enzima responsable de la conjugación de los dos dobles enlaces (*cis*-9 y *cis*-12) se ha identificado como una *ácido linoleico isomerasa*, que se encuentra ligada a la membrana bacteriana y que actúa tanto sobre el sistema dieno del ácido linoleico como del ácido α -linolénico (Kepler y Tove, 1967). La incubación de *B. fibrisolvens* en presencia de ácido α -linolénico como sustrato también produce VA. Sin embargo éste no se genera a partir de RA, sino de intermediarios distintos: *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 C18:3 (Khanal y Dhiman, 2004) y *trans*-11, *cis*-15 C18:2 (Loor *et al.*, 2004). Por último, la conversión de ácido esteárico a partir de VA sería idéntica a la vía enunciada para el ácido linoleico (Figura 1.4).

Aunque la formación de RA a partir de ácido linoleico en el rumen por el mecanismo descrito parecía fuera de toda discusión, los contenidos de dicho isómero de CLA en la grasa de leche no se justificaban únicamente por su producción mediante esta vía. Griinari y Bauman (1999) sugirieron que el RA ruminal, formado durante la biohidrogenación, no era la única fuente de este ácido graso en leche. Estos autores postularon que el RA podría ser sintetizado también endógenamente, a partir de VA, por medio de la Δ -9 *desaturasa*, enzima con una actividad reconocida sobre el ácido esteárico en la glándula mamaria de rumiantes (Figura 1.4). Griinari *et al.* (2000) evaluaron la importancia de esta vía, midiendo en grasa de leche de vaca los cambios en los contenidos de RA que se producían tras realizar una infusión abomasal de VA. Tal infusión, que no se afecta por la biohidrogenación ruminal, generó aumentos significativos de RA en leche. Paralelamente, un segundo experimento de los mismos investigadores (Griinari *et al.*, 2000) examinó los efectos de la adición postruminal de un aceite rico en ácido estercúlico en ganado vacuno. Este ácido, un potente inhibidor de la actividad de la enzima Δ -9 *desaturasa*, provocó una disminución de los contenidos de RA en grasa láctea. Fruto de ambos ensayos se valoró que la síntesis endógena contribuye, en casi dos terceras partes, a las concentraciones de RA encontradas en leche. Posteriormente, otros trabajos (Lock y Garnsworthy, 2002; Piperova *et al.*, 2002) han aportado cifras más altas, documentándose incluso que la totalidad de RA en grasa de leche podría ser de origen endógeno (Kay *et al.*, 2004). Es evidente que existe una relación muy estrecha entre los contenidos en VA y RA, que aunque hasta ahora sólo está plenamente demostrada en ganado vacuno, probablemente es extensiva al resto de rumiantes pese a la falta de datos experimentales referidos a otras especies.

Aunque la investigación desarrollada en torno al origen del RA es muy abundante, hay menos estudios sobre otros isómeros de CLA. Este hecho no es ajeno a que la mayoría de ellos se encuentra en pequeñas proporciones en la grasa de leche y su significado biológico aún no ha sido esclarecido. El *trans*-7, *cis*-9 C18:2 es cuantitativamente el segundo isómero más importante, constituyendo entre el 2 y el 10 % del total de los isómeros de CLA en grasa de origen lácteo (Yurawecz *et al.*, 1998; Palmquist *et al.*, 2005). Corl *et al.* (2002) observaron que su síntesis es casi exclusivamente endógena, por un mecanismo similar al RA, a partir del *trans*-7 C18:1 generado en el rumen.

El hecho de que existan otras moléculas *trans* C18:1 en leche de rumiantes indujo a pensar en la existencia de otras actividades enzimáticas *cis-trans* isomerasas de las bacterias ruminales, que contribuirían a producir un amplio espectro de isómeros de CLA (Tabla 1.4). Sin embargo, las vías de formación de estos ácidos grasos están aún lejos de ser elucidadas.

Se ha observado también que algunas dietas suplementadas con PUFA, raciones bajas en fibra o el empleo de antibióticos producen un aumento de los ácidos grasos *trans*-10 C18:1 y *trans*-10, *cis*-12 C18:2 en leche. Estas mismas dietas suelen estar asociadas a una disminución del contenido de grasa en leche (Bauman *et al.*, 2006; Shingfield y Griinari, 2007). Esto condujo a Griinari y Bauman (1999) a proponer una vía metabólica alternativa (Figura 1.5). En dicha ruta, la primera etapa del proceso de biohidrogenación del ácido linoleico sería su transformación en *trans*-10, *cis*-12 C18:2 a través de la enzima *cis*-9 *trans*-10 isomerasa. Posteriormente, el isómero de CLA se hidrogenaría a *trans*-10 C18:1 y finalmente a ácido esteárico. Esta vía alternativa (Figura 1.5) implicaría el concurso de microorganismos diferentes a *B. fibrisolvens*, como por ejemplo *Megasphaera elsdenii* (Kim *et al.*, 2002; Klieve *et al.*, 2003; Jenkins *et al.*, 2008).

Figura 1.5: Ruta alternativa de biohidrogenación del ácido linoleico y α -linolénico en el rumen.

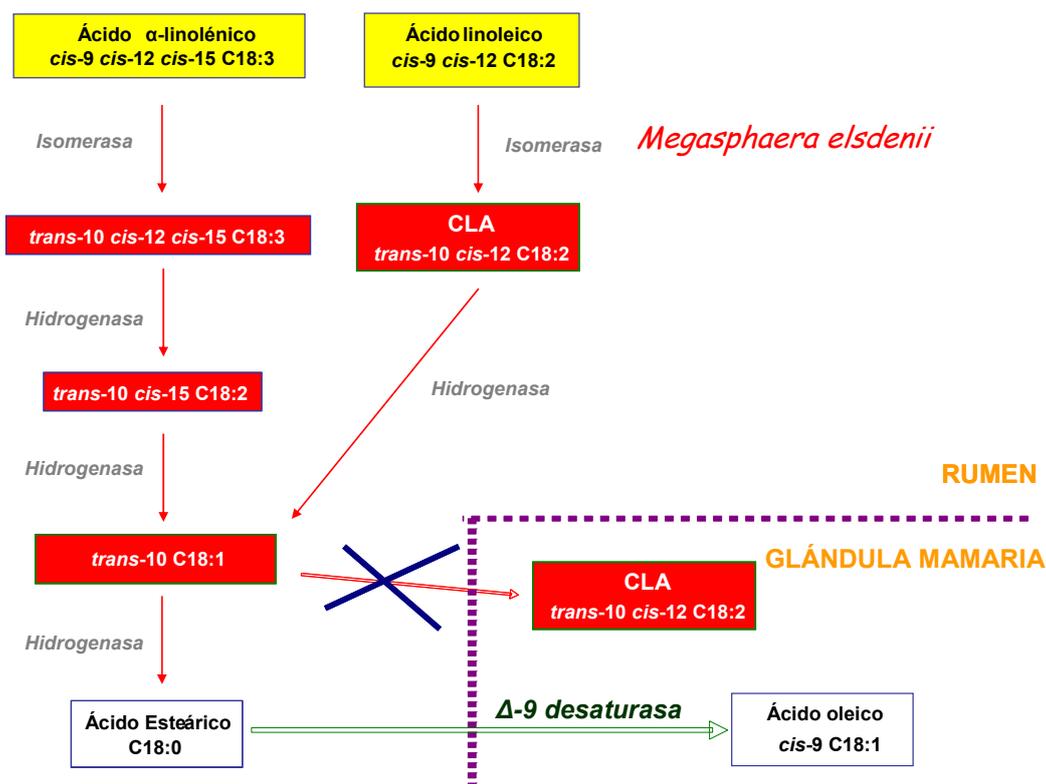


Figura adaptada de Grinari y Bauman (1999).

1.3. LÍPIDOS LÁCTEOS Y SALUD

La grasa influye de forma relevante en las características físicas y organolépticas de los alimentos. Sin embargo, durante estos últimos años se ha creado una corriente de opinión poco proclive al consumo de grasa de origen lácteo por la presencia en la misma de ácidos grasos saturados, MUFA con configuración *trans* y colesterol, compuestos cuyo consumo aparece generalmente asociado al aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares. Este deterioro en la imagen de la grasa de la leche se ha traducido en una tendencia creciente del consumo de productos desnatados durante la última década (FIL-IDF, 2008).

Frente a esta corriente de opinión, distintos estudios científicos no sólo han puesto en duda los efectos perjudiciales para la salud de la ingesta de grasa láctea, sino que han presentado evidencias de signo contrario (Lock y Bauman, 2004; Parodi, 2006 y 2009; German *et al.*, 2009). Por ello, resulta alarmante que estadísticas recientes llevadas a cabo en la población española estimen que el 35% de los niños y jóvenes de nuestro país consumen leche y lácteos por debajo de los niveles recomendados para este grupo de edad (Tabla 1.5); situación que se extiende al 40% de la población adulta entre 25 y 60 años, y hasta el 60% en las personas mayores de 65 años (Aranceta y Serra, 2005).

Tabla 1.5. Raciones diarias recomendadas y equivalencias de diversos productos lácteos.

Grupos de población	Raciones de lácteos	Una ración equivale a:
Escolares	2-3	Leche: 200-250 mL (aproximadamente un vaso de leche), Yogur: 125 g (cantidad contenida en un envase comercial), Leche fermentada: 100-125 g,
Adolescentes	3-4	Cuajada: 125 g,
Adultos	2-3	Queso fresco o tipo petit: 30-55 g,
Embarazo-lactancia, Menopausia	3-4	Queso semicurado o curado: 15-30 g, Queso seco rallado: 20-30 g (2 cucharadas soperas),
Mayores	2-4	Helado: 200 g (taza y media),
Deportistas	3-4	Quesitos: 2 porciones (40 g), Postre lácteo: 200 g (aproximadamente 1 envase),

Datos tomados de la *Federación Nacional de Industrias Lácteas* (FENIL). Campaña productos lácteos: insustituibles (2007-2010).

Por otra parte, a la hora de establecer los potenciales efectos beneficiosos o perjudiciales de la grasa de leche en la salud humana, resulta imprescindible diferenciar entre las distintas clases de lípidos que la componen.

1.3.1. Ácidos grasos saturados

La asociación entre ingesta de ácidos grasos saturados e incremento del riesgo de enfermedades cardiovasculares ha sido apoyada por distintos estudios clínicos y epidemiológicos durante las últimas décadas. De hecho, el efecto hipercolesterolémico de los ácidos grasos saturados de 12, 14 y 16 átomos de carbono es conocido desde hace más de 40 años (Keys *et al.*, 1965; Hegsted *et al.*, 1965). Esta relación, sin

embargo, parece mucho más compleja de lo que pueda deducirse de la simple acción de algunos ácidos grasos. Trabajos de investigación recientes han revelado que resultaría más importante mantener un buen equilibrio entre los distintos grupos de ácidos grasos de la ingesta que los potenciales efectos beneficiosos o perjudiciales que algunos de ellos pudieran ejercer de forma individual (Renaud y Lanzmann-Petithory, 2001; Parodi, 2006; Shingfield *et al.*, 2008a). En esta línea, algunos estudios han apuntado que aquellos ácidos grasos que se consideran hipercolesterolémicos (láurico, mirístico y palmítico) podrían tener incluso efectos positivos en una dieta que presente niveles moderados de los mismos (Poppitt *et al.*, 2002; Dabadie *et al.*, 2005).

Por otro lado, hay que destacar también que ciertos ácidos grasos saturados presentes en grasa láctea podrían ejercer efectos positivos en la salud humana. Los de cadena corta y media (C4:0-C10:0) son empleados como fuente de energía rápida, por lo que tienen baja tendencia a acumularse en tejido adiposo (Molkentin, 2000). El principal exponente de esta fracción es el ácido butírico al que se le han atribuido propiedades antitumorales, concretamente en la prevención de cáncer de colon (Williams *et al.*, 2003). Los ácidos caproico (C6:0), caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0) también podrían resultar beneficiosos para la salud por poseer actividad antiviral y antimicrobiana, no habiéndose documentado efectos negativos de los mismos sobre los niveles de colesterol en sangre (German y Dillard, 2006). Además, en leche, estos ácidos grasos se encuentran mayoritariamente situados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del triglicérido, lo que los hace más susceptibles a la acción de las lipasas humanas y facilita su liberación al tracto digestivo y posterior absorción por el torrente sanguíneo.

El ácido esteárico, que es desaturado más rápidamente que otros ácidos grasos, es considerado neutro desde la perspectiva de la salud humana, aunque por su metabolismo puede resultar tan efectivo para reducir el colesterol plasmático como el ácido oleico (Grundy, 1994; Mensink, 2005). También han despertado gran interés los ácidos grasos saturados impares y ramificados, especialmente el *iso* C15:0 y el *iso* C16:0, por sus potenciales propiedades anticarcinogénicas observadas en experimentos *in vitro* (Yang *et al.*, 2000; Wongtangtharn *et al.*, 2004).

1.3.2. Ácidos grasos trans

Los ácidos grasos *trans*-monoenoicos octadecanoicos (*trans* C18:1) podrían influir desfavorablemente en la relación de colesterol LDL/HDL en el suero sanguíneo (Mensink y Katan, 1990; Chen *et al.*, 2007) y por tanto, el riesgo de padecer enfermedades coronarias por su ingesta podría ser incluso mayor que el producido por los ácidos grasos saturados (Mensink *et al.*, 2003; Mozaffarian *et al.*, 2006). Sin embargo, hay cada vez más evidencias científicas de que los incrementos de colesterol LDL en la sangre son dependientes del isómero *trans* C18:1 que sea considerado (Lock *et al.*, 2005b; Malpuech-Brugère *et al.*, 2009). Por este motivo resulta fundamental incidir en la procedencia de los ácidos grasos *trans* ya que los perfiles, según sean de origen industrial o natural, pueden ser muy diferentes.

Como se mencionó en secciones precedentes, el perfil de ácidos grasos *trans* de la grasa láctea se caracteriza por presentar un contenido superior al 40% de VA mientras que los niveles individuales del resto de los isómeros *trans* C18:1 no superan el 10% (Figura 1.2, página 12). Existen estudios que apuntan que los ácidos grasos *trans* procedentes de la grasa de leche podrían no contribuir a aumentar los riesgos cardiovasculares (Chardigny *et al.*, 2008). De hecho, dado que el VA puede transformarse en RA, como se expuso en el apartado 1.2.4, la inclusión de grasa láctea en una dieta equilibrada podría resultar más beneficiosa que perjudicial. En esta línea, se han asociado a leches enriquecidas en VA y RA efectos anticarcinogénicos y antiaterogénicos (Lock *et al.*, 2005a; Bauman y Lock, 2006; Shingfield *et al.*, 2008a). Por otra parte, Tyburczy *et al.* (2009) demostraron en modelos animales que la incorporación de VA y *trans*-9 C18:1 a la dieta no influye de forma desfavorable en los parámetros hipercolesterolémicos. En definitiva, resulta necesario llevar a cabo una mayor investigación en este ámbito que permita esclarecer los posibles efectos negativos de los distintos isómeros *trans* MUFA en la salud de los consumidores.

1.3.3. Ácido linoleico conjugado

La investigación desarrollada en torno al CLA ha experimentado un crecimiento exponencial (<http://fri.wisc.edu/clarefs.htm>) desde que Pariza *et al.* (1979) le atribuyeron propiedades anticarcinogénicas. Otros potenciales efectos beneficiosos del CLA para la salud humana provienen de sus propiedades antiarterioescleróticas y antidiabéticas, su capacidad para disminuir la grasa corporal, favorecer la absorción de calcio y mejorar la respuesta inmunitaria (Tabla 1.6). Aunque la mayor parte de los estudios se han llevado a cabo con mezclas sintéticas equimoleculares de *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12 C18:2, estos efectos han sido atribuidos casi exclusivamente al RA, pese a que otros isómeros de CLA presentes en pequeñas cantidades en grasa láctea podrían estar asociados con diversos efectos biológicos (Pariza, 1999).

El isómero *trans*-10, *cis*-12 C18:2, que presenta niveles muy bajos en grasa de leche (menos del 1% sobre el total de CLA), ha alcanzado una gran relevancia por favorecer la pérdida de peso corporal (Park *et al.*, 1999; Pariza, 2004; Simón *et al.*, 2006), pero podría estar asociado al incremento de resistencia a la insulina plasmática en ciertas patologías (Wahle *et al.*, 2004; Khanal y Dhiman, 2004) (Tabla 1.6). Desde el punto de vista fisiológico también han suscitado interés los isómeros *cis*-9, *cis*-11 C18:2 (Tanmahasamut *et al.*, 2004) y *trans*-9, *trans*-11 C18:2 (Lai *et al.*, 2005) por su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de líneas celulares tumorales.

Tabla 1.6. Efectos atribuidos al ácido linoleico conjugado (CLA).

Efecto	Tipo de Experimento	Molécula	Referencias
1- Anticarcinogénico	<i>In vitro</i>	CLA	Durgam y Fernandes, 1997; O'Shea <i>et al.</i> , 2000; Miller <i>et al.</i> , 2001; Palombo <i>et al.</i> , 2002; Chujo <i>et al.</i> , 2003; Moon <i>et al.</i> , 2003; Tanmahasamut <i>et al.</i> , 2004; Ochoa <i>et al.</i> , 2004; Lai <i>et al.</i> , 2005; Wang <i>et al.</i> , 2005; Kuniyasu <i>et al.</i> , 2006; Amarú y Field, 2009.
	Modelos animales	CLA	Ip <i>et al.</i> , 1991; Liew <i>et al.</i> , 1995; Visonneau <i>et al.</i> , 1997; Cesano <i>et al.</i> , 1998; Park <i>et al.</i> , 2001 y 2004; Masso-Welch <i>et al.</i> , 2002; Cohen <i>et al.</i> , 2003; Kim y Park, 2003; Soel <i>et al.</i> , 2007.
2- Modulador del sistema inmune	<i>In vitro</i>	CLA	Iwakiri <i>et al.</i> , 2002; Yu <i>et al.</i> , 2002; Eder <i>et al.</i> , 2003; Cheng <i>et al.</i> , 2004; Jaudszus <i>et al.</i> , 2005; Nakamura y Omaye, 2009.
	Modelos animales	CLA	Yang y Cook, 2003; Changhua <i>et al.</i> , 2005; Jaudszus <i>et al.</i> , 2008; Corino <i>et al.</i> , 2009.
	Humanos	CLA	Tricon <i>et al.</i> , 2004a; Song <i>et al.</i> , 2005; Turpeinen <i>et al.</i> , 2008; Aryaeian <i>et al.</i> , 2009.
3- Antiarterioesclerótico	Modelos animales	CLA	Lee <i>et al.</i> , 1994; Nicolosi <i>et al.</i> , 1997; Kritchevsky <i>et al.</i> , 2000 y 2004; Mitchell y McLeod, 2008.
		<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	Valeille <i>et al.</i> , 2004, 2005 y 2006.
	Humanos	CLA	Noone <i>et al.</i> , 2002; Moloney <i>et al.</i> , 2004.
		<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	Tricon <i>et al.</i> , 2004b; Tholstrup <i>et al.</i> , 2008.
4- Favorecer la mineralización ósea	<i>In vitro</i>	CLA	Cusack <i>et al.</i> , 2005; Platt <i>et al.</i> , 2007; Platt y El-Soheymy, 2009.
	Modelos animales		Kelly <i>et al.</i> , 2003; Kelly y Cashman, 2004; Banu <i>et al.</i> , 2008; Park <i>et al.</i> , 2008a; Roy <i>et al.</i> , 2008.
	Humanos		Brownbill <i>et al.</i> , 2005.
5- Antidiabético	Modelos animales	CLA	Houseknecht <i>et al.</i> , 1998; Ryder <i>et al.</i> , 2001.
6- Disminuir la grasa corporal	Modelos animales	CLA	Park <i>et al.</i> , 1997; DeLany y West, 2000; Tsuboyama-Kasaoka <i>et al.</i> , 2000; Park <i>et al.</i> , 2007a.
		<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	Park <i>et al.</i> , 1999; Kang <i>et al.</i> , 2004; Simón <i>et al.</i> , 2006.
	Humanos	CLA	Blankson <i>et al.</i> , 2000; Mougios <i>et al.</i> , 2001; Risérus <i>et al.</i> , 2001; Thom <i>et al.</i> , 2001; Gaullier <i>et al.</i> , 2004 y 2005; Whigham <i>et al.</i> , 2007; Park <i>et al.</i> , 2008b.
7- Aumentar la resistencia a la insulina plasmática	Modelos animales	CLA	Choi <i>et al.</i> , 2004 Ohashi <i>et al.</i> , 2004; Wargent <i>et al.</i> , 2005; Zhou <i>et al.</i> , 2008.
	Humanos	CLA	Moloney <i>et al.</i> , 2004; Ahren <i>et al.</i> , 2009.
8- Antihipertensivo	Modelos animales	CLA	Nagao <i>et al.</i> , 2003; Inoue <i>et al.</i> , 2004.
	Humanos	CLA	Herrera <i>et al.</i> , 2006; Zhao <i>et al.</i> , 2009.

1.3.4. Ácidos grasos poliinsaturados

Linoleico y α -linolénico se consideran ácidos grasos *esenciales* porque el organismo humano no es capaz de sintetizarlos y sólo pueden ser obtenidos de la dieta. Estos ácidos grasos son los precursores de otros PUFA de mayor longitud de cadena (20 y 22 átomos de carbono) y grado de insaturación pertenecientes a las familias omega-6 y omega-3 que se sintetizan en el organismo a través de la acción de distintas *elongasas* y *desaturasas* (Figura 1.6). Estos PUFA omega-3 y omega-6 son constituyentes de los fosfolípidos y resultan imprescindibles para mantener la fluidez de las membranas celulares. Además, desde el punto de vista metabólico, son los principales precursores en la síntesis de eicosanoides, sustancias con acción similar a la de las hormonas.

Figura 1.6: Metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3, omega-6 y omega-9 en humanos.

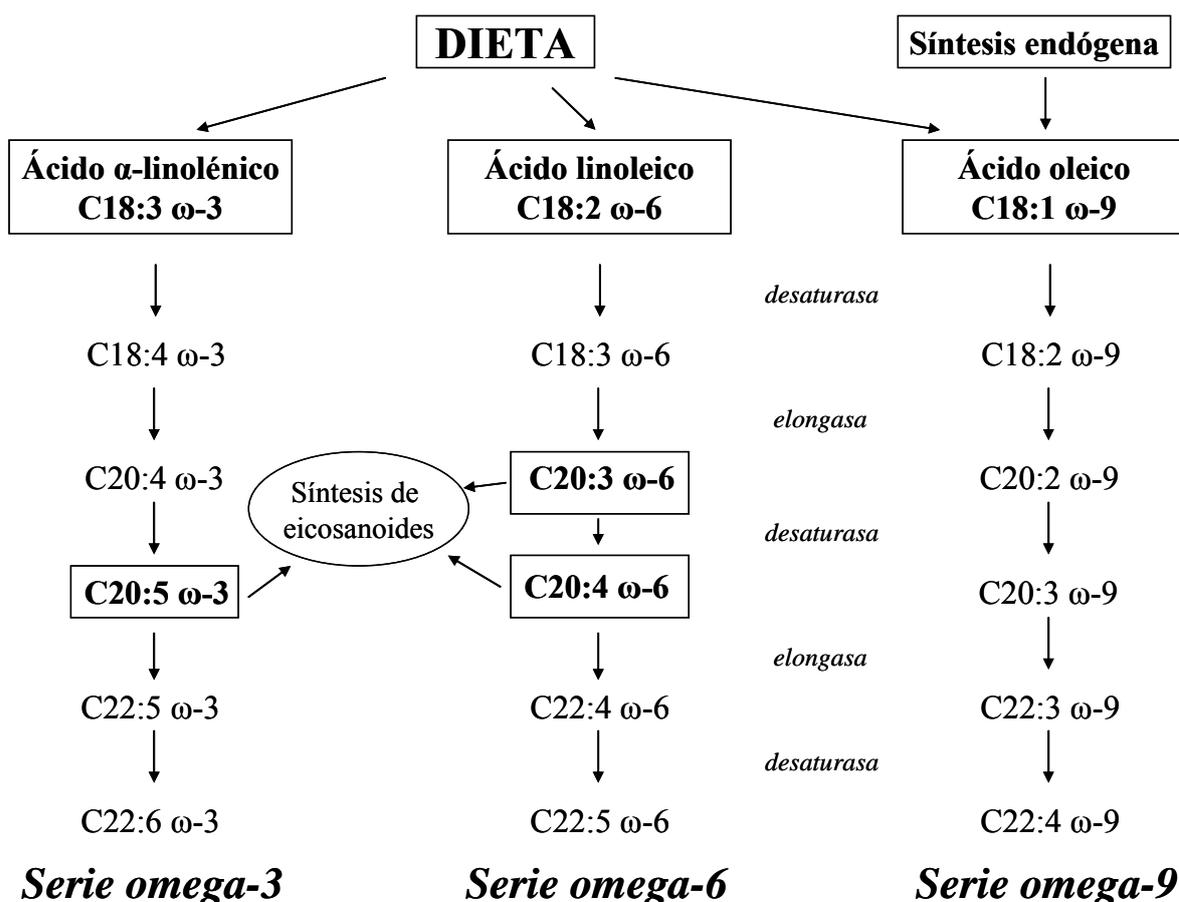


Figura adaptada de Mataix y Gil (2004).

Las familias de ácidos grasos omega-3 y omega-6, durante los procesos de síntesis de PUFA de mayor longitud de cadena y grado de insaturación, compiten por las mismas *elongasas* y *desaturasas* (Figura 1.6). Por dicho motivo resulta sumamente importante mantener en nuestros hábitos alimenticios un equilibrio entre ambas series de ácidos grasos. Se ha documentado que la relación ideal entre los ácidos grasos omega-6 y omega-3 para poder prevenir enfermedades cardiovasculares debe ser igual o menor a 4:1 (Simopoulos, 2008). La grasa láctea posee valores en torno a 5:1 (Tabla 1.2, página 7), muy inferiores a otros alimentos, que hacen de la leche y sus derivados un grupo alimentario recomendable desde el punto de vista nutricional. Por el contrario se ha detectado que en la dieta occidental, con un consumo importante de aceites de semillas, sobre todo girasol, esta relación alcanza niveles cercanos a 25:1, muy lejos de los valores recomendados (Mataix y Gil, 2004).

El interés de los investigadores por los ácidos grasos omega-3 data de los años 70, cuando diversos estudios relacionaron la ingesta habitual de pescado azul, rico en PUFA omega-3 de cadena larga (C20:5, ácido eicosapentaenoico, EPA y C22:6, ácido docosahexaenoico, DHA), con una menor incidencia de enfermedades coronarias en comparación con poblaciones que tenían un bajo consumo de dicho alimento (Sri Kantha, 1987). Estos ácidos grasos omega-3 han mostrado efectividad en la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes, artritis y cáncer (Li *et al.*, 2003; Shahidi, 2008). Además están implicados en el desarrollo del sistema nervioso, del cerebro y de la retina por lo que la necesidad de ingerir las cantidades adecuadas de los mismos se hace indispensable no sólo durante la época adulta sino durante la gestación, lactancia e infancia (Shahidi, 2008). Sin embargo las cantidades de PUFA omega-3 presentes en la grasa láctea son bajas y, como se expuso en el apartado 1.2, sólo el ácido α -linolénico se encuentra de forma natural en la leche. Este hecho hace que la industria láctea haya empezado a comercializar productos enriquecidos en ácidos grasos omega-3 con alegaciones nutricionales que aluden a sus propiedades saludables.

1.3.5. Fosfolípidos

La esfingomielina es el fosfolípido presente en grasa láctea que ha atraído mayor interés de la comunidad científica por sus potenciales efectos beneficiosos para la salud, hasta el punto de que se ha propuesto la utilización de la membrana del glóbulo graso como nutraceutico (German y Dillard, 2006). La esfingomielina está relacionada con dos metabolitos biológicamente activos, la ceramida y la esfingosina, que intervienen en la transmisión de señales que controlan el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular. Estudios basados en cultivos celulares y animales de experimentación han documentado que estos componentes podrían tener propiedades anticancerígenas, especialmente en etapas incipientes del desarrollo de cáncer de colon (Schmelz *et al.*, 1996; Lemonnier *et al.*, 2003), y estarían capacitados para reducir la relación de colesterol LDL/HDL en el suero sanguíneo (Imaizumi *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1997).

1.4. ALTERNATIVAS PARA AUMENTAR LOS NIVELES DE LOS COMPONENTES BIOACTIVOS DE LA GRASA LÁCTEA

1.4.1. Modificación del contenido de CLA en la grasa de leche

Los contenidos de CLA en productos lácteos se ven influidos por una serie de factores que pueden ser agrupados bajo tres categorías: fisiológicos o genéticos atribuibles al propio animal, causas ligadas a los procesos tecnológicos de elaboración de los diferentes productos lácteos y modificaciones producidas por la dieta del ganado, tema sobre el que versa la presente Tesis.

a) Factores de origen animal

El perfil de ácidos grasos puede diferir no sólo según la especie de rumiante (Tablas 1.2 y 1.3, páginas 7 y 8) sino entre razas e individuos dentro de una misma raza. A la hora de diseñar un experimento para aumentar los contenidos de VA y RA en la leche de rumiantes o establecer comparaciones, hay que tener en cuenta factores tan dispares como la población microbiana presente en el tracto digestivo, la actividad enzimática de la Δ -9 *desaturasa* en la glándula mamaria, el rendimiento lechero o la producción de grasa láctea (Bauman y Lock, 2006).

La actividad de la enzima Δ -9 *desaturasa* es el factor genético que se ha investigado más en los últimos años (Palmquist *et al.*, 2005). Un aumento de dicha actividad siempre significaría un mayor contenido de *cis*-MUFA a expensas de una disminución de los ácidos grasos saturados, lo que redundaría en la mejora nutricional de la grasa láctea. La enzima Δ -9 *desaturasa* es particularmente activa en el tejido adiposo y en la glándula mamaria, y su actividad no se limita únicamente a la conversión de ácido esteárico a ácido oleico, sino que también cataliza la formación de RA a partir de VA, como se expuso en el apartado 1.2.4. Además interviene en la desaturación del enlace en posición 9 de los ácidos miristoleico (*cis*-9 C14:1) y palmitoleico (*cis*-9 C16:1) a partir de sus sustratos saturados, los ácidos grasos mirístico y palmítico. Como índice de actividad de la enzima Δ -9 *desaturasa* se vienen utilizando las relaciones RA/VA, *cis*-9 C18:1/C18:0, *cis*-9 C16:1/C16:0 y *cis*-9 C14:1/C14:0 en leche. De todas ellas, la última resulta la más fiable ya que el ácido miristoleico incorporado a la leche se genera casi exclusivamente por síntesis endógena a partir de ácido mirístico (en más de un 95%), en contraste con el resto de ácidos grasos *cis*-9 MUFA que pueden proceder también de la dieta (Griinari *et al.*, 2000). Actualmente existe una gran controversia sobre el mecanismo que regula la actividad de la enzima Δ -9 *desaturasa*. Se ha observado que puede ser muy diferente entre dos animales de la misma raza y que las variaciones entre individuos pueden llegar a duplicar o triplicar el contenido de RA en grasa de leche (Bauman *et al.*, 2003).

b) Factores asociados a procesos tecnológicos

Los efectos de los procesos tecnológicos como calentamiento, conservación, maduración o cualquier procedimiento de transformación de la leche en otro producto lácteo como queso o yogur sobre el contenido de CLA, han sido estudiados en detalle (Dhiman *et al.*, 2005; Collomb *et al.*, 2006; Luna, 2006).

Los primeros trabajos llevados a cabo en leches y productos lácteos fermentados, principalmente quesos, observaron una gran variabilidad en las concentraciones de CLA, y la influencia del procesado de la leche en tales resultados fue objeto de fuerte controversia. Algunos estudios (Werner *et al.*, 1992; García-López *et al.*, 1994) atribuyeron los incrementos de los niveles de CLA durante el proceso de elaboración de quesos al calentamiento previo de la leche. Parodi (2003) sugirió que algunas bacterias empleadas en la elaboración de quesos podrían contener *isomerasas* capaces de catalizar la conversión del ácido linoleico a CLA. Ha *et al.* (1989) propusieron, por otra parte, que la oxidación del ácido linoleico durante las etapas de procesado y maduración del queso, podría ser una vía para el aumento de CLA.

Más recientemente, otros autores han minimizado la influencia del procesado y maduración sobre las concentraciones de CLA (Gnädig *et al.*, 2004; Ryhänen *et al.*, 2005; Luna *et al.*, 2005b y 2007). La mayoría de tales estudios coincide en que la concentración final de RA en productos lácteos elaborados se debe principalmente al contenido inicial en leche cruda antes de ser sometida a cualquier manipulación. Estos trabajos también resaltan que los cambios provocados por los procesos de elaboración o fabricación de productos lácteos sobre los niveles de CLA son pequeños si se comparan con las grandes variaciones inducidas por la modificación de la dieta del ganado o con los factores fisiológicos individuales que regulan la síntesis de RA a partir de VA en animales rumiantes, a los que se aludía en el apartado anterior.

c) Factores relacionados con la dieta

La modificación de la dieta basal del ganado y sobretodo la suplementación lipídica de la misma, son las vías más empleadas para modificar el perfil de ácidos grasos de la leche y han sido objeto de estudios exhaustivos (Stanton *et al.*, 2003; Bauman *et al.*, 2006; Shingfield *et al.*, 2008a).

Los regímenes alimenticios basados en el empleo de concentrados, propios de prácticas ganaderas intensivas, suelen dar lugar a contenidos más bajos de RA en la grasa láctea que aquellos otros donde es habitual la alternancia entre estabulación y pasto libre durante las diferentes estaciones del año. Dietas con una baja relación forraje:concentrado disminuyen la hidrogenación de los ácidos grasos *trans* monoenoicos a ácido esteárico y aumentan los niveles de *trans*-10 C18:1 y otros ácidos grasos *trans* MUFA (Piperova *et al.*, 2002). Este cambio en el metabolismo ruminal estaría asociado a una disminución en el pH (Kalscheur *et al.*, 1997; Fuentes *et al.*, 2009) y a la proliferación de bacterias implicadas en las rutas de biohidrogenación alternativas (Figura 1.5, página 18). Es probable que una de las claves para conseguir niveles óptimos de CLA con rumiantes en lactación resida en mantener estable el funcionamiento del rumen mediante un consumo adecuado de forraje de alta calidad.

La grasa es una materia prima esencial en los modernos programas de alimentación para rumiantes de alta productividad, especialmente para animales en lactación, debido a su gran aporte energético. Sin embargo, la inclusión de grasas en la dieta puede ser utilizada no sólo para aumentar la entrada de energía, sino también para afectar el metabolismo ruminal, modificar el reparto de nutrientes y mejorar el perfil nutricional de los ácidos grasos de la grasa láctea. En esta línea, con objeto de aumentar los contenidos de CLA y otros PUFA, se han ensayado distintos suplementos lipídicos en la dieta de rumiantes, en especial semillas o aceites de oleaginosas y de pescado.

c.1. Inclusión en la dieta de suplementos de origen vegetal

El efecto que producen los suplementos lipídicos basados en aceites o semillas vegetales depende tanto del tipo de sustrato suministrado como de la forma en la que se adiciona. Entre los diferentes suplementos lipídicos de origen vegetal los que provocan un mayor aumento en los contenidos de VA y RA son aquellos que son ricos en ácido linoleico y α -linolénico (Stanton *et al.*, 2003; Khanal y Olson, 2004). Ambos ácidos grasos son el sustrato idóneo para que aumenten los niveles de ácidos *trans* C18:1 en el rumen (Figura 1.4, página 15) y consecuentemente se acumule una mayor cantidad de VA en el líquido post ruminal (Bauman *et al.*, 2001).

Un examen más detallado, en ganado vacuno, ha permitido comprobar que aquellos aceites ricos en ácido linoleico (Tabla 1.7) son los más efectivos (Kelly *et al.*, 1998a; Dhiman *et al.*, 2000; Lock y Garnsworthy, 2002). Esto es debido a que la suplementación con ácido linoleico favorece la formación de RA mediante dos vías: biohidrogenación en el rumen del propio ácido linoleico y desaturación de VA en la glándula mamaria, mientras que el ácido α -linolénico únicamente contribuye a los niveles de RA por síntesis endógena a partir de VA (Figura 1.4, página 15).

Tabla 1.7. Composición en ácidos grasos de distintos aceites de origen vegetal (% del total de ácidos grasos).

Ácido Graso (%)	OLIVA	CÁRTAMO	GIRASOL	SOJA	LINO	
C<14	-	-	0,5	-	-	
Mirístico	C14:0	-	0,1	0,1	-	
Palmitico	C16:0	12,1	6,1	6,4	10,8	6,1
Palmitoleico	C16:1	0,8	0,1	0,1	0,2	0,1
Esteárico	C18:0	2,6	2,3	4,5	3,9	3,4
Oleico	C18:1	72,5	13,4	22,1	23,9	18,4
Linoleico	C18:2	9,4	76,0	65,6	52,1	16,8
Linolénico	C18:3	0,6	0,3	0,5	7,8	55,0
	C≥20	0,9	2,2	1,6	0,9	0,5
Σ Saturados		15,3	9,1	12,8	15,7	10,0
Σ Monoinsaturados		73,8	13,9	22,4	24,2	18,5
Σ Poliinsaturados		10,0	77,3	66,0	59,8	71,8
Relación ω-6/ω-3		15,7	253,3	131,2	6,7	0,3

Datos tomados de Dubois *et al.* (2007).

La forma de incorporación de los sustratos lipídicos, como se ha indicado anteriormente, puede también influir en los niveles de VA y RA que son incorporados a la grasa láctea. Estudios realizados en ganado vacuno han apuntado que las semillas procesadas (en forma extrusionada, micronizada, molida, calentada, etc.) generan mayores aumentos en los contenidos de CLA en leche que aquellas que se ofrecen intactas, probablemente porque los triglicéridos son más accesibles a los microorganismos responsables de la biohidrogenación (Chouinard *et al.*, 1997 y 2001; Chilliard *et al.*, 2009; Doreau *et al.*, 2009). De la misma forma, en bovino, se ha comprobado que el aceite en forma libre es siempre más efectivo que la adición de semillas, por la mayor disponibilidad de los ácidos grasos a la microflora de la cavidad ruminal (Lock y Bauman, 2004).

A la hora de utilizar suplementos de origen vegetal en la alimentación de rumiantes, también es importante conocer la cantidad de PUFA que puede ser adicionada sin que aparezcan efectos adversos en la población microbiana del rumen o sobre la eficacia productiva del ganado. Los suplementos lipídicos están restringidos en bovino a niveles menores del 7% en materia seca, pero el uso de semillas o de aceites protegidos permite superar este nivel al resultar menos agresivos fisiológicamente (Bauman y Lock, 2006).

c.2. Incorporación de suplementos de origen marino

Otra alternativa nutricional para aumentar los niveles de CLA en la grasa de la leche es inhibir el último paso de biohidrogenación en el rumen de los PUFA de origen vegetal (Figura 1.4, página 15). La conversión de VA a ácido esteárico, como se expuso anteriormente, tiene lugar por un grupo de bacterias diferentes a *B. fibrisolvens* entre las que destaca el género *Fusocillus* (Kemp *et al.*, 1984). Cambios en el medio ambiente ruminal podrían afectar la proliferación de dichas bacterias suprimiendo la actividad de sus hidrogenasas. De esa manera se favorecería un flujo post ruminal rico en VA capaz de aumentar la síntesis endógena de CLA (Griinari y Bauman, 1999). Distintos trabajos han documentado que los suplementos lipídicos de origen marino son los más idóneos para inducir estos cambios (Shingfield *et al.*, 2003; Stanton *et al.*, 2003; Palmquist *et al.*, 2005; AbuGhazaleh *et al.*, 2009). Estudios *in vitro* demostraron que el ácido graso

DHA, presente en aceite de pescado y algas, inhibe la reducción de VA a ácido esteárico y también podría impedir la reducción completa de otros ácidos grasos *trans* C18:1 (AbuGhazaleh y Jenkins, 2004).

Las grasas marinas pueden ser tan eficaces como los aceites de oleaginosas para mejorar los contenidos de CLA en leche de vaca (Donovan *et al.*, 2000; AbuGhazaleh *et al.*, 2003 y 2007). Ofrecen además como valor añadido el incremento de los niveles de los PUFA omega-3 de cadena larga. Sin embargo, la utilización de dichos suplementos tiene como contrapartida que su ingesta se relaciona con un descenso en la producción láctea y con una disminución del contenido de grasa en leche (Griinari y Bauman, 2006). En todo caso, para mantener los niveles deseados de VA en el rumen es necesario incluir en la dieta una fuente de su precursor (ácido linoleico) que promueva la ruta convencional de biohidrogenación descrita en la Figura 1.4 (página 15). Whitlock *et al.* (2002 y 2006) estudiaron en ganado vacuno el efecto de la suplementación con una combinación de semilla de soja y aceite de pescado, observando que el aumento de CLA era mayor con la mezcla que con los suplementos administrados por separado. De todas formas, se hace necesaria una mayor investigación en este campo que permita aportar datos de interés para esclarecer las posibles diferencias entre especies de rumiantes.

1.4.2. Aumento de los niveles PUFA omega-3 en grasa láctea

Como se expuso anteriormente (apartado 1.3.4), la grasa de leche de rumiantes presenta niveles muy bajos de ácido α -linolénico (omega-3 de cadena corta) y prácticamente nulos de PUFA omega-3 de cadena larga (Tablas 1.2 y 1.3, páginas 7 y 8). Las estrategias nutricionales dirigidas a ganado vacuno que han tenido más éxito para conseguir mayores contenidos en ácido α -linolénico en la leche han sido la alimentación con pasto y la suplementación de la dieta con semilla o aceite de lino. Por otra parte, también se ha estudiado el efecto de la adición de aceites de pescado o microalgas en la dieta de los animales, con objeto de aumentar los niveles de PUFA omega-3 de cadena larga en la grasa láctea bovina.

a) PUFA omega-3 de cadena corta

El pasto es la principal fuente de ácido α -linolénico de la dieta y su utilización en ganado vacuno puede llegar a triplicar los niveles de RA en leche (Kelly *et al.*, 1998b; Dhiman *et al.*, 1999). Sin embargo, la alimentación del ganado en régimen extensivo está estrechamente relacionada con bajos niveles de producción láctea, limitando el beneficio que se pudiera obtener por la mejora de los niveles de CLA y ácidos grasos omega-3. El contenido en ácido α -linolénico en la leche es mayor cuanto más fresco es el pasto por lo que sus niveles se ven influidos de manera decisiva por las condiciones climatológicas y las variaciones estacionales (Cabiddu *et al.*, 2005). Los niveles máximos de CLA en leche de vaca se detectan en primavera cuando el pasto es más verde y abundante (Collomb *et al.*, 2004) y si éste se utiliza para fabricar ensilados o heno seco los contenidos de VA y RA en leche bovina disminuyen (Boufaïed *et al.*, 2003). Tales resultados no pueden explicarse únicamente con la composición en ácidos grasos del forraje y se cree que el pasto presenta otros componentes adicionales que estimulan la producción de VA cuando está fresco y lo disminuyen cuando madura (Lock y Bauman, 2004). Estos compuestos podrían inhibir la biohidrogenación completa de VA a ácido esteárico de la misma forma que el DHA (Bauman y Lock, 2006).

Aparte del pasto, sólo la semilla de lino suministra niveles altos de ácido α -linolénico en la dieta (más del 50%, ver Tabla 1.7, página 30). De hecho numerosos estudios en ganado bovino (Collomb *et al.*, 2004; Akraim *et al.*, 2007; Flowers *et al.*, 2008; Fuentes *et al.*, 2008; Chilliard *et al.*, 2009) y ovino (Luna *et al.*, 2005d, 2008b; Zhang *et al.*, 2006; Mele *et al.*, 2007) han documentado aumentos de este PUFA omega-3 en leche de animales alimentados con dietas suplementadas con dicho sustrato lipídico. Se ha observado además que el nivel de ácido α -linolénico incorporado a la leche es mayor cuanto menor es la proporción de concentrado en la dieta base (Lor *et al.*, 2005a). Sin embargo la mayoría de los estudios llevados a cabo con raciones que incorporaban semilla de lino, presentaron incrementos de ácido α -linolénico moderados, no alcanzándose contenidos superiores al 1,2% del total de ácidos grasos en la leche (Fuentes, 2009). Además existe el riesgo de que niveles altos de este suplemento lipídico en la dieta afecten a la producción de leche del ganado (Deaville *et al.*, 2004; Gonthier *et al.*, 2005).

b) PUFA omega-3 de cadena larga

La ingesta recomendada de ácidos grasos omega-3 EPA y DHA (200-500 mg/diarios, EFSA, 2005) puede alcanzarse consumiendo diariamente alrededor de 50 g de pescado azul, pero muchas personas no ingieren tal cantidad y para satisfacer los requerimientos aconsejados precisarían recurrir a alimentos enriquecidos. Una estrategia empleada para mejorar las características nutricionales de la leche, como ya se mencionó en el apartado 1.1, consiste en la separación de la grasa láctea y su posterior sustitución por aceites vegetales o grasas enriquecidas en ácidos grasos omega-3 (Luna *et al.*, 2004). Así se consigue modificar su composición, con un descenso de los ácidos grasos saturados a expensas de un aumento de los MUFA y PUFA, muy favorable desde el punto de vista funcional. En la actualidad ya se comercializan en esta línea, derivados lácteos enriquecidos en omega-3, con niveles de EPA y DHA que pueden alcanzar los 110 mg por ración, y el abanico de productos que presentan alegaciones nutricionales relacionadas con los PUFA omega-3 es muy amplio: margarinas, aceites, galletas, aceitunas, huevos, cárnicos, etc (Shahidi, 2008).

Con objeto de incrementar los niveles de EPA y DHA de forma natural en la grasa láctea, como se expuso anteriormente (apartado c.2, página 31), han surgido numerosos trabajos de investigación que analizan el efecto de la inclusión de suplementos de origen marino en la dieta de ganado vacuno (Jones *et al.*, 2005; Lynch *et al.*, 2005; Allred *et al.*, 2006; Castañeda-Gutiérrez *et al.*, 2007; AbuGhazaleh *et al.*, 2009). Esta práctica ganadera no pareció afectar de forma notable la calidad organoléptica final de los productos lácteos (Baer *et al.*, 2001; Ramaswamy *et al.*, 2001; Nelson y Martini, 2009). Sin embargo, debido a que los niveles de EPA y DHA incorporados a la grasa de leche son muy bajos y que estos sustratos lipídicos tienen un coste muy elevado, su interés práctico resulta limitado para ser empleado de forma efectiva en explotaciones ganaderas.

1.5. LA LECHE DE OVEJA

La producción de leche de oveja a nivel mundial, aproximadamente 9 millones de toneladas (FIL-IDF, 2008), es muy inferior a la de vaca en términos cuantitativos pero tiene una gran importancia económica en áreas mediterráneas y de Oriente Medio (Juárez y Ramos, 2003). La cuarta parte de la producción de leche ovina se obtiene en cinco estados de la Unión Europea y España es el tercer productor con 350.000 toneladas, el equivalente a casi un 20% del total. Por delante se encuentran otros dos países mediterráneos, Italia y Grecia (35% y 30% respectivamente), y por detrás Francia (10%) y Portugal (5%). La producción española se encuentra muy localizada en tres grandes áreas geográficas, cada una de ellas ligada a una raza ovina. En primer lugar Castilla y León produce casi el 70% del total nacional y tradicionalmente sus razas lecheras son la Churra y la Castellana. Castilla-La Mancha con el 20% está muy ligada a la raza Manchega, y el País Vasco y Navarra, con un 7%, están unidas a las razas Latxa y Carranzana. Cabe citar también una raza originaria de Alemania y Holanda, la Frisona alemana o *Milchscharf*, que utilizaron los israelitas para obtener la raza Assaf mediante cruzamiento con Awassi y que últimamente está desplazando a las razas autóctonas de nuestro país por su mayor capacidad productora.

La leche de oveja es más rica en nutrientes que la leche de vaca y presenta un buen balance entre las proteínas, la grasa y los carbohidratos, presentes en proporciones comparables. Los contenidos de grasa en leche ovina, con valores en torno al 6%, son superiores al resto de las especies de rumiantes y por ello es el sustrato idóneo para la fabricación de productos lácteos, como los quesos. Prácticamente la totalidad de la leche de oveja se emplea en la fabricación de quesos, un mercado con una media de crecimiento anual del 2,5 %, y con casi la mitad de la producción procedente de la Unión Europea (Figura 1.7) (FIL-IDF, 2008). Además, los quesos fabricados en España a partir de leche ovina son cada vez más reconocidos en los mercados internacionales por la creciente tendencia al consumo de productos naturales y artesanales de calidad.

Figura 1.7: Distribución de la producción de queso a nivel mundial (millones de toneladas).

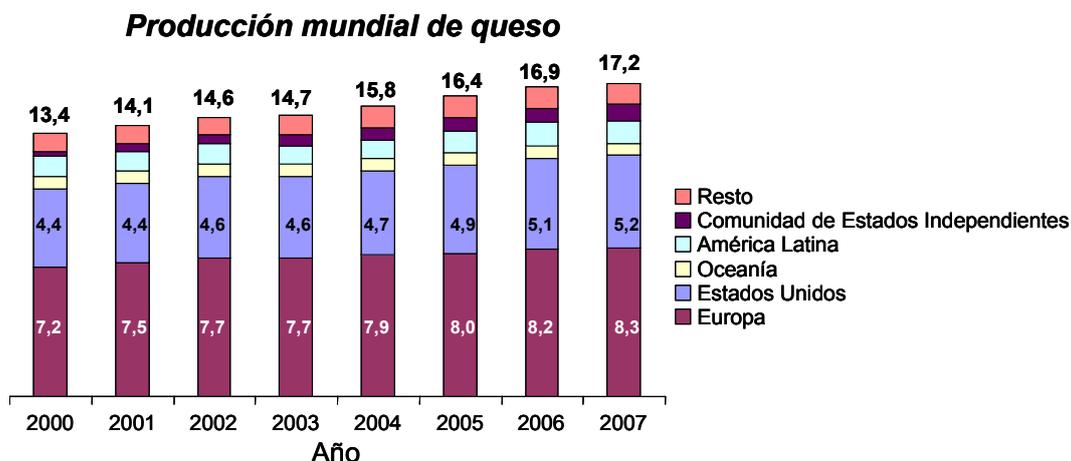


Figura tomada de FIL-IDF (2008).

La composición de la leche de oveja puede verse afectada por factores genéticos, fisiológicos y ambientales, siendo la raza el más decisivo (Juárez y Ramos, 2003). Las ovejas seleccionadas genéticamente, que comúnmente se encuentran en explotaciones ganaderas, suelen producir mayor cantidad de leche aunque con un contenido más bajo de sólidos totales. Por su parte, la grasa muestra más variabilidad entre las distintas razas que las proteínas. Otro factor que debe ser considerado es el estado de lactación. El calostro tiene un nivel alto de grasa (10,7-17,2%) y proteínas (7,1-19,5%), con porcentajes elevados de inmunoglobulinas, y bajo en lactosa (1,6-4,0%). El nivel de grasa y de proteínas en la leche desciende durante las primeras semanas que siguen al parto, y después aumenta gradualmente hasta el final de la lactación, a la vez que el rendimiento en leche disminuye. Otros factores que influyen en la composición de la leche de oveja son la dieta, tema principal de esta Tesis, la salud de los animales, la estación, el número de ordeños y la técnica de manejo aplicada (Chilliard y Ferlay, 2004).

La alimentación del ganado, como se ha expuesto anteriormente en vacuno, tiene una gran influencia en la producción y en la composición en ácidos grasos de la leche. Las ovejas deben recibir los alimentos suficientes para mantener su peso y producir una leche de calidad. Cualquier desequilibrio alimenticio incide en la cantidad y calidad de la leche, en la reproducción y en una menor resistencia a las enfermedades. Los cambios en las raciones deben hacerse lentamente porque la flora microbiana ruminal está

preparada para digerir un tipo de alimento y la readaptación a otro tipo de dieta es un proceso lento que dura de 15 a 20 días. Por lo general, en España la alimentación del ganado ovino sigue un sistema semiextensivo mediante el aprovechamiento de pastos naturales y otros recursos, con posterior suplementación a base de concentrados. A medida que el rebaño se especializa más en producción lechera, las explotaciones siguen un programa más intensivo en las propias instalaciones.

Los factores que afectan a la composición en ácidos grasos de la leche de oveja han sido revisados por varios autores (Pulina *et al.*, 2006; Sanz Sampelayo *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007b) y en estos trabajos se hace referencia a la limitada bibliografía existente. De forma similar a la grasa láctea bovina, los ácidos grasos mayoritarios son el palmítico, oleico, mirístico y esteárico. Sin embargo, los niveles de ácidos grasos de cadena corta y media, especialmente el ácido caproico, caprílico y cáprico, que potencian las características organolépticas de los productos elaborados, son significativamente superiores en la leche de oveja (Park *et al.*, 2007b) (Tabla 1.3, página 8). Asimismo, la grasa de leche ovina es, en general, la que presenta los niveles más altos de CLA total si se compara con otros animales rumiantes (Jahreis *et al.*, 1999; Khanal y Olson, 2004; Tsiplakou y Zervas, 2008). Esta composición característica de la leche de oveja la convierte en una materia prima muy atractiva desde el punto de vista científico, dejando a un lado el interés económico que la fabricación de quesos genera en la industria láctea.

Por último se ha observado, en contraposición a lo descrito en leche bovina, que los contenidos en grasa láctea de pequeños rumiantes no disminuyen cuando la dieta se suplementa con aceites vegetales ricos en PUFA (Chilliard *et al.*, 2003; Chilliard y Ferlay, 2004; Sanz-Sampelayo *et al.*, 2007). Estos indicios ponen en duda que la velocidad de digestión y los efectos producidos por distintos suplementos lipídicos sean similares en vaca y oveja. Por ello algunos grupos de investigación se han interesado recientemente por el ganado ovino, y el número de trabajos en esta área ha comenzado a aumentar de forma considerable.

1.6. ASPECTOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN GRASA DE LECHE

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos de la grasa de leche, sobre todo los isómeros *trans*, CLA y PUFA resulta cada vez más importante para poder determinar el potencial impacto que el consumo de productos lácteos pudiera tener en la salud. Por ello, paralelamente a la investigación dirigida a mejorar la composición de la grasa láctea, la atención prestada a los aspectos analíticos se ha incrementado notablemente en los últimos años.

1.6.1. Extracción de la grasa de leche

Las primeras técnicas utilizadas para la separación de la grasa de leche estaban basadas en la utilización de disolventes orgánicos como cloroformo y metanol en distintas proporciones (Folch *et al.*, 1957; Bligh y Dyer, 1959). Posteriormente se sustituyó alguno de estos reactivos por otros de menor toxicidad. En la actualidad, el procedimiento de referencia normalizado por la *Federación Internacional de Lechería* (FIL-IDF) para una gran variedad de sustratos lácteos (ISO-IDF, 2001) utiliza una mezcla de éter etílico y pentano, tras la digestión de la muestra con una solución de hidróxido amónico. Aunque la validez analítica de este procedimiento está plenamente contrastada, se trata de una técnica laboriosa que precisa mucha atención por parte del analista y el empleo de gran cantidad de reactivos.

Para el tipo de estudios referidos anteriormente, se precisan procedimientos rápidos para separar la grasa láctea. Luna *et al.* (2005c) validaron un método de separación de la grasa de leche cruda sin disolventes, basado en el procedimiento de Feng *et al.* (2004), y que requiere únicamente dos centrifugaciones consecutivas a temperatura ambiente. Esta técnica resulta de interés para extraer la grasa láctea como método de rutina cuando es necesario analizar un número elevado de muestras.

1.6.2. Determinación de la composición en ácidos grasos de la grasa láctea

a) Derivatización de los ácidos grasos

La preparación de derivados volátiles para determinar el perfil de ácidos grasos es una etapa previa fundamental antes del análisis cromatográfico. El procedimiento más extendido en grasa láctea es la formación de ésteres metílicos (FAME). Los catalizadores más efectivos para la metilación de la grasa láctea son aquellos que tienen lugar en medio básico (Kramer *et al.*, 1997). La transesterificación en medio ácido es desaconsejable porque puede provocar la isomerización de los ácidos grasos insaturados: favorece la conformación *trans*, más estable, así como la aparición de dimetilacetales y otros productos de reacción no deseados (Cruz-Hernández *et al.*, 2006). Por este motivo, el método recomendado por la ISO-FIL para la derivatización de la grasa de leche con bajos niveles de ácidos grasos libres, utiliza el hidróxido potásico en metanol como catalizador (ISO-IDF, 2002) que no provoca isomerizaciones.

b) Análisis por Cromatografía de Gases (GC)

El procedimiento más utilizado para determinar el perfil de ácidos grasos de la leche es la cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). La separación de los ácidos grasos se lleva a cabo en columnas capilares de 25 o más metros dotadas de alta capacidad de resolución. La CP-Sil 88 es la más recomendada por la elevada polaridad de su fase estacionaria, que permite resolver gran cantidad de ácidos grasos (Kramer *et al.*, 2001b). La identificación de los FAME está basada en la comparación de los tiempos de retención de los distintos picos con patrones inyectados en idénticas condiciones cromatográficas. No obstante, dada la enorme variedad de ácidos grasos presentes en la grasa láctea, la escasa disponibilidad de patrones y los problemas de resolución y coelución asociados a los análisis cromatográficos, esta identificación tiene un carácter tentativo para una parte de los isómeros C18:1 y CLA. Por un lado, hay que tener en cuenta que sólo hay disponible comercialmente un número limitado de isómeros *cis* y *trans* C18:1 y por otro, que las mezclas comercializadas de CLA sólo incluyen 4 isómeros mayoritarios (*trans*-8, *cis*-10; *cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12 y *cis*-11, *trans* 13). Respecto a la cuantificación, debido al

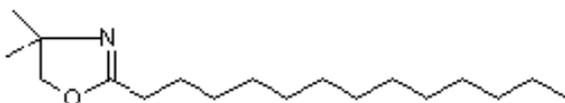
amplio intervalo de puntos de ebullición del conjunto de los ácidos grasos de la leche y a la elevada volatilidad de los FAME de cadena corta, se precisa el empleo de factores de respuesta (Kramer *et al.*, 2001a). Para poder superar todas estas limitaciones y determinar de forma más completa el perfil lipídico de la grasa láctea se utilizan otras técnicas cromatográficas complementarias.

Una herramienta muy valiosa en el análisis cualitativo de ácidos grasos es aquella que combina la elevada capacidad de resolución de las columnas capilares de gran longitud con la detección por espectrometría de masas (MS). La GC-MS es útil para evaluar si los picos encontrados en el cromatograma de GC pertenecen a componentes puros y ayuda a determinar la estructura molecular de los ácidos grasos si se utilizan los derivados apropiados. La GC-MS de impacto electrónico de los FAME permite determinar el peso molecular y el número de dobles enlaces de un ácido graso. Estos datos, unido al tiempo de retención cromatográfico, proporcionan información relevante para la caracterización de cada pico. Sin embargo, esta no suele ser suficiente para determinar la posición y geometría de los dobles enlaces ni para discriminar completamente entre isómeros de ácidos grasos insaturados. Para ello se han ensayado otros derivados cuyos espectros de masas suministran información estructural más completa. La utilización de ésteres de picolinilo o derivados de dimetiloxazolona (DMOX) (Figura 1.8), capaces de mantener la geometría y posición de los dobles enlaces de los ácidos grasos durante su paso por la cámara de ionización del detector de masas, supuso un avance en la caracterización de los PUFA y de los isómeros de CLA (Roach, 1999; Roach *et al.*, 2002). A pesar de ello, la utilización de GC-MS de dichos derivados no permite discriminar entre los isómeros *cis* y *trans*.

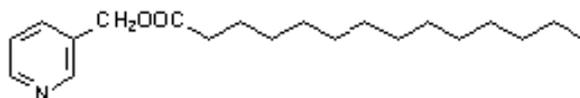
Figura 1.8: Estructura química de los derivados empleados en la identificación de ácidos grasos por GC-MS.



FAME¹



DMOX²



Ésteres de Picolinilo

¹ Éster metílico de ácido graso. ² Derivados de dimetiloxazolona.

La GC acoplada a un detector de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) puede ayudar a la determinación de la configuración geométrica de los dobles enlaces de los FAME. FTIR suministra información específica sobre la naturaleza de los grupos funcionales de las moléculas y se ha venido utilizando para determinar el contenido total de ácidos grasos *trans* C18:1 en distintos sustratos lipídicos (Azizian y Kramer, 2006). GC-FTIR se ha revelado como un procedimiento útil para discriminar entre enlaces *cis-cis*, *trans-trans* y *cis-trans/trans-cis* en moléculas de CLA (Mossoba *et al.*, 2004). No obstante, esta técnica es costosa, y además no distingue entre las configuraciones *cis-trans* y *trans-cis*, por lo que la caracterización de estos isómeros de CLA debería ser resuelta por otros métodos.

c) Análisis por Espectrometría de Masas en Tandem tras Ionización Química del Acetonitrilo y Formación de Aductos Covalentes (CACI-MS/MS)

Otra técnica instrumental, que podría contribuir a elucidar la estructura posicional y geométrica de los ácidos grasos con uno o más dobles enlaces, es la GC acoplada a un espectrómetro de masas en tandem equipado con un dispositivo de ionización química. Una de las principales ventajas de CACI-MS/MS es que está basada en el análisis de FAME y por tanto no precisa la preparación de otros derivados complejos, que durante su síntesis podrían alterar la estructura posicional y geométrica de los dobles enlaces de las moléculas (Michaud y Brenna, 2006).

El análisis mediante CACI-MS/MS se divide en tres etapas:

1. Ionización química del acetonitrilo. Generación del ión MIE (*1-etenil-1-metileniminio*, $m/z = 54$) por autorreacción del acetonitrilo en la cámara de ionización química del espectrómetro de masas (Figura 1.9).

Figura 1.9: Formación del ión MIE (*1-etenil-1-metileniminio*).

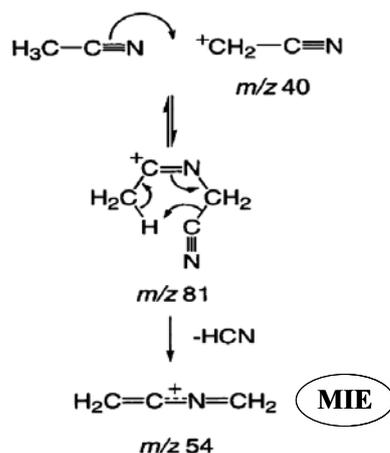


Figura tomada de Brenna (2005).

2. Impacto del MIE contra los FAME y formación de iones característicos $[M+54]^+$: Los iones MIE colisionan con los FAME para formar un aducto covalente. Si los dobles enlaces del ácido graso no están conjugados, se forma una estructura provista de un anillo de 4 miembros entre el MIE y el FAME. Si por el contrario los dobles enlaces son conjugados, como en el caso de los isómeros de CLA, se genera uno de 6 (Figura 1.10). De esta manera se obtiene el ión característico $[M+54]^+$ (Brenna, 2005).

Figura 1.10: Formación del ión de diagnóstico ω del *trans*-10, *cis*-12 CLA por CACI-MS/MS.

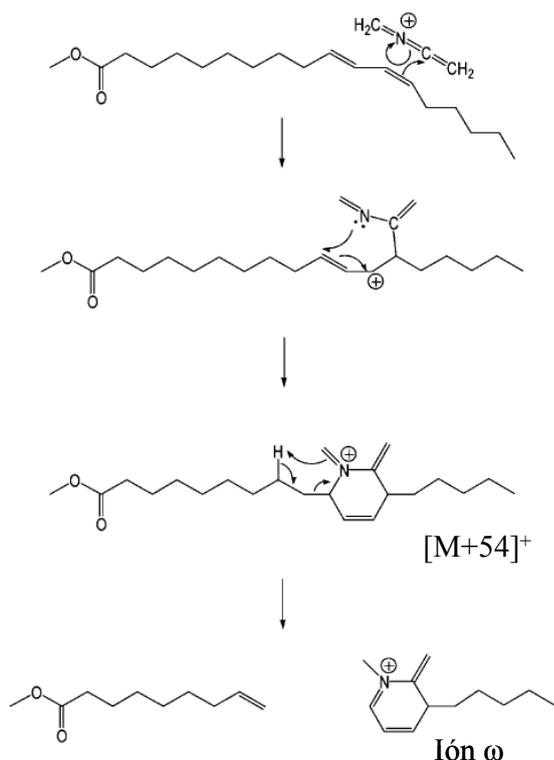


Figura tomada de Brenna (2005).

3. Aislamiento y fragmentación del ión $[M+54]^+$: La última etapa del análisis por CACI-MS/MS es el aislamiento y posterior fragmentación del ión $[M+54]^+$. La estructura del ión $[M+54]^+$ puede romperse por la posición alílica (monoenos) o vinílica (polienos) del doble enlace y así proporciona dos nuevos iones de diagnóstico, α y ω (Figura 1.10). Los m/z de dichos iones permitirían determinar la posición de los dobles enlaces en la molécula, mientras su abundancia relativa puede posibilitar la asignación de la geometría de los mismos (Michaud *et al.*, 2003) (Tabla 1.8).

Tabla 1.8: Abundancia relativa (α/ω) de los iones de diagnóstico α y ω para distintos isómeros posicionales de CLA determinada por CACI-MS/MS.

Isómero posicional	Isómero geométrico (Relación α/ω)			
	<i>cis/trans</i>	<i>trans/cis</i>	<i>cis/cis</i>	<i>trans/trans</i>
6,8	5,6	0,9	0,7	2,1
7,9	10,0	0,3	1,1	3,1
8,10	5,3	0,4	1,0	2,3
9,11	4,9	0,1	2,4	2,1
10,12	11,0	0,1	1,4	2,1
11,13	6,8	0,2	3,2	1,9
12,14	5,8	0,1	*	0,9

* El isómero *cis*-12, *cis*-14 CLA no se resolvió cromatográficamente.

Datos tomados de Michaud *et al.*, (2003).

En definitiva, CACI-MS/MS es un método que permitiría caracterizar completamente la estructura de cualquier isómero desconocido de CLA o PUFA presente en la grasa de leche. La sencillez del tratamiento previo de las muestras y los resultados tan fiables que proporciona esta técnica hacen del CACI-MS/MS uno de los métodos más efectivos y con más futuro en la identificación de los ácidos grasos.

d) Cromatografía de ión plata (Ag^+) o de Argentación

La aplicación de la cromatografía por argentación o de ión plata (Ag^+) ha supuesto un avance importante en el estudio de la grasa láctea, porque es capaz de proporcionar información complementaria a la obtenida por GC sobre el perfil de ácidos grasos. Se trata de una técnica cromatográfica que permite separar en distintas fracciones los ácidos grasos según la geometría de sus dobles enlaces (*cis* y *trans*). El fundamento de esta metodología se basa en la interacción reversible de los iones Ag^+ de la fase estacionaria con los electrones π de los dobles enlaces presentes en las moléculas de los FAME insaturados. Las moléculas con geometría *cis* son más fuertemente retenidas que las que poseen configuración *trans*. Además, al aumentar el número de dobles enlaces de la molécula incrementa la afinidad de la misma por la fase

estacionaria. En función del tipo de soporte que alberga dicha fase se distinguen varios tipos de cromatografía de argentación. Las más utilizadas en el análisis de grasa láctea son la cromatografía en capa fina (Ag^+ -TLC), la cromatografía de líquidos de alta eficacia (Ag^+ -HPLC) y, más recientemente, la extracción en fase sólida (Ag^+ -SPE).

d.1. Cromatografía en Capa Fina con intercambiador de iones plata (Ag^+ -TLC)

Tradicionalmente ha sido el procedimiento más utilizado para fraccionar los ácidos grasos *cis* de los *trans* (Christie, 1982). La separación se lleva a cabo en placas de vidrio o plástico con una capa de sílice impregnada con AgNO_3 que constituye la fase estacionaria. Sobre esta superficie, y mediante la aplicación de distintas fases móviles, los FAME se resuelven en varias bandas en función de su configuración geométrica. Además los ácidos grasos *trans* se pueden cuantificar, con ayuda de un patrón interno, si las muestras se analizan por GC antes y después de la separación por Ag^+ -TLC.

El empleo de esta técnica ha permitido resolver numerosos problemas de coelución que comúnmente se asocian a la GC, en especial aquellos casos en los que los FAME presentan distinto número de dobles enlaces o de configuración geométrica (Cruz-Hernández *et al.*, 2006). Sin embargo se trata de un procedimiento laborioso que no es fácilmente automatizable, lo que hace que sea poco atractivo en estudios que precisen el análisis de gran número de muestras.

d.2. Fraccionamiento por Extracción en Fase Sólida con intercambiador de iones plata (Ag^+ -SPE)

La sustitución de las placas de separación por columnas de extracción en fase sólida con intercambiador de iones plata (Ag^+ -SPE) es una técnica más reciente, también complementaria a GC, y por su rapidez, llamada a reemplazar a la Ag^+ -TLC en el análisis de grasa láctea (Kramer *et al.*, 2008; Luna *et al.*, 2009). En ella, según los mismos principios que rigen en la Ag^+ -TLC, los FAME quedan retenidos en la fase estacionaria de los cartuchos de extracción. La elución de los diferentes grupos de

ácidos grasos se lleva a cabo con fases móviles basadas en distintas mezclas de hexano:acetona (Kramer *et al.*, 2008).

La aplicación más importante de esta técnica de fraccionamiento es la discriminación de los ácidos grasos *cis* y *trans* monoinsaturados, los cuales por GC eluyen en la misma zona cromatográfica. Una vez separados los FAME según la geometría de los dobles enlaces, cada una de las fracciones individuales y la grasa láctea sin fraccionar se analiza por GC. De este modo, se puede lograr un perfil completo de los C18:1 MUFA presentes en la grasa de leche (Figura 1.11).

Figura 1.11: Cromatogramas de la zona C18:1 (GC-FID) de los FAME de una grasa láctea y sus correspondientes fracciones *cis* y *trans* separadas previamente por Ag⁺-SPE.

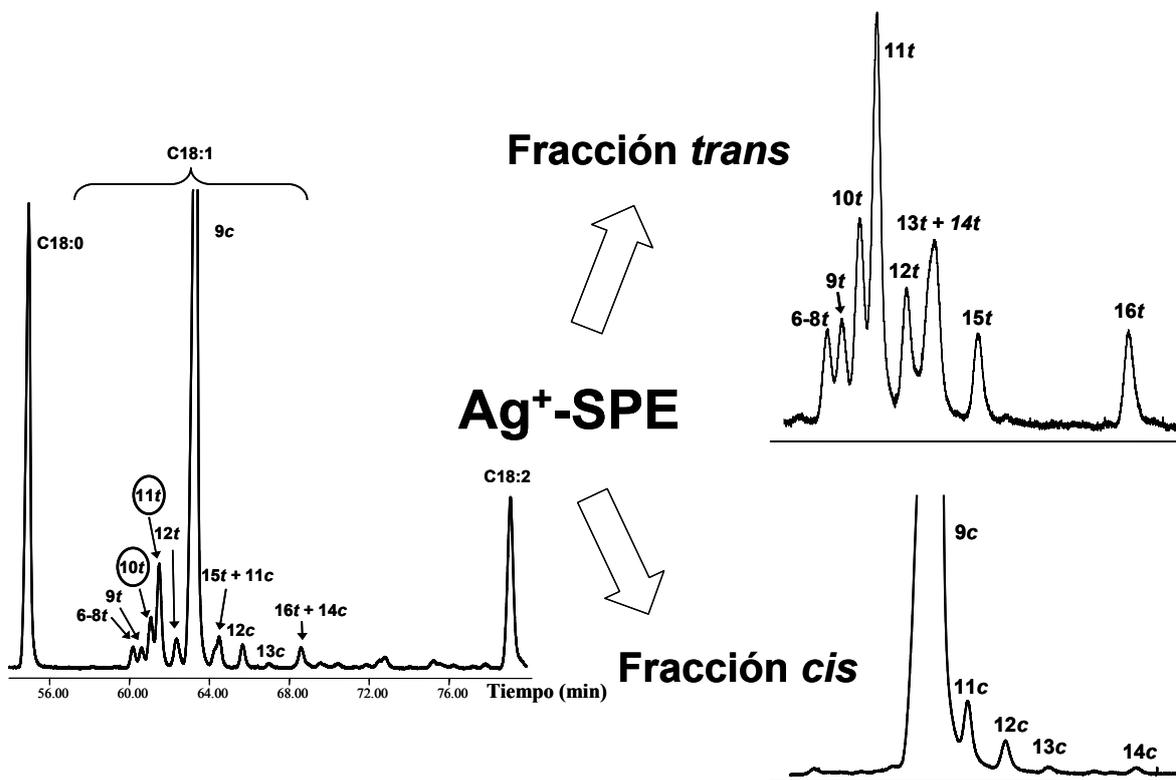


Figura adaptada de Luna *et al.* (2009).

d.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia con intercambiador de iones plata (Ag⁺-HPLC)

Otra técnica instrumental complementaria a GC que resulta muy útil para determinar de forma directa los isómeros de CLA, es la cromatografía de líquidos de alta eficacia (Ag⁺-HPLC). Sehat *et al.* (1998) la aplicaron por primera vez a grasa láctea, basándose en trabajos previos de Adlof (1997). En menos de 10 años se ha consolidado junto a GC como el método más utilizado en el análisis de FAME con dienos conjugados. Ag⁺-HPLC se basa en los mismos principios que las técnicas descritas anteriormente, donde los ácidos grasos se separan en función del número y la geometría de los dobles enlaces de cada molécula. El empleo de Ag⁺-HPLC con columnas empaquetadas de 25 cm de longitud y 5 μm de tamaño de partícula ha mejorado notablemente la resolución de los isómeros.

Aunque se han llevado a cabo análisis con hasta seis columnas en serie (Sehat *et al.*, 1999), la mayoría de los isómeros de CLA pueden resolverse con sólo tres. La fase móvil que comúnmente se emplea es hexano con 0,1% de acetonitrilo y 0,5% de dietiléter (o metil *terc*-butil éter) (v/v) a una temperatura de elución de 30°C (Cruz-Hernández *et al.*, 2004; Kramer *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2005a). En estas condiciones eluyen en primer lugar los isómeros *trans-trans*, seguidos de los *cis-trans/trans-cis* y finalmente de los *cis-cis* (Figura 1.12). Los FAME de CLA son detectados selectivamente en el espectro UV ya que los dienos conjugados absorben a la longitud de onda característica de 233 nm. Esta gran selectividad evita la interferencia de otros ácidos grasos y facilita su cuantificación.

Una de las limitaciones de esta técnica es la baja reproducibilidad de los tiempos de retención entre inyecciones. La identidad de los isómeros de CLA se puede determinar co-inyectando material de referencia, obtenido de fuentes comerciales o por isomerización con I₂ (Eulitz *et al.*, 1999), con las muestras. Otra opción sería añadir tolueno a cada muestra problema, lo cual permitiría hacer una estimación del volumen muerto y calcular los volúmenes de retención relativos de cada isómero de CLA (Delmonte *et al.*, 2004).

Figura 1.12: Cromatogramas por Ag^+ -HPLC de los ésteres metílicos de distintos isómeros posicionales (del 6-8 al 13-15) de CLA sintetizados químicamente. (*c* = *cis* y *t* = *trans*).

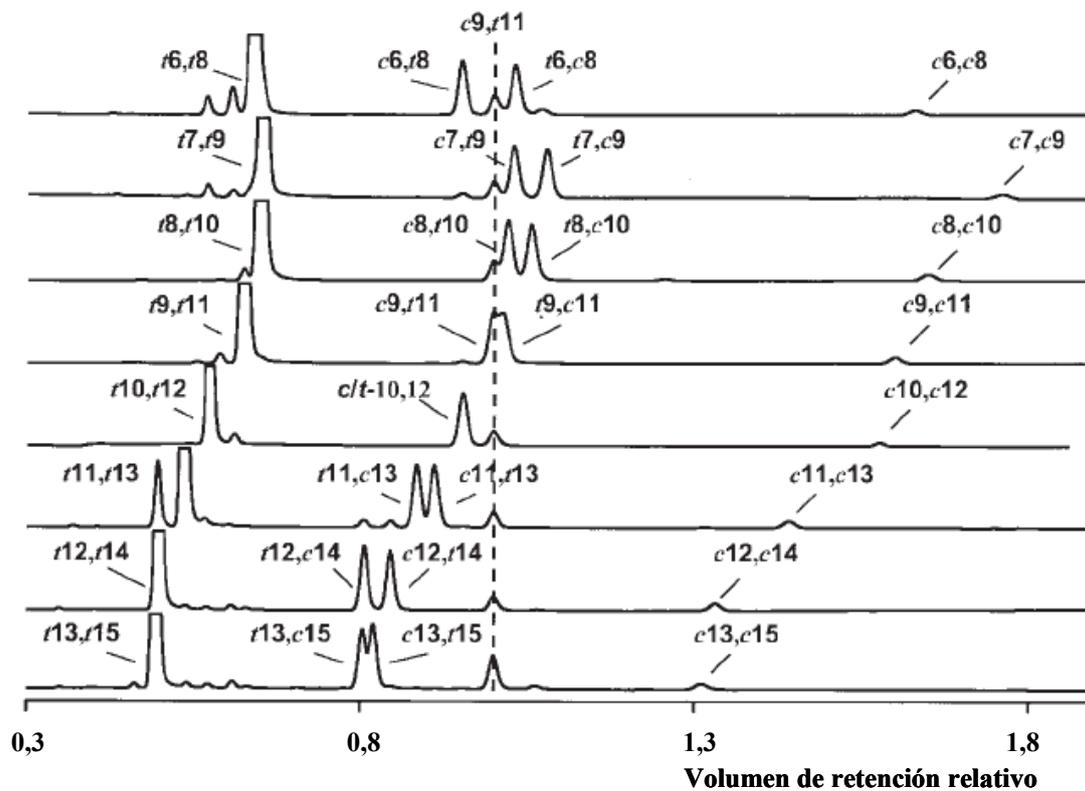


Figura tomada de Delmonte *et al.* (2005).

2. Objetivo y Plan de Trabajo

La leche y los productos lácteos son una de las fuentes de aporte de lípidos en nuestra alimentación. Aunque la grasa de leche posee niveles altos de ácidos grasos saturados (C14:0 y C16:0 principalmente) también contiene otros que podrían tener efectos beneficiosos en la salud de los consumidores. Es bien conocido el papel preventivo de los ácidos grasos omega-3 en las enfermedades cardiovasculares, pero en los últimos años la grasa láctea ha despertado un gran interés por su contenido en ácido linoleico conjugado (CLA) y sus potenciales propiedades anticarcinogénicas y antiarterioescleróticas.

Distintos estudios han puesto de manifiesto la gran importancia de la dieta de los animales rumiantes en los contenidos de ácidos grasos saturados, omega-3 y CLA presentes en la grasa de leche. La mayoría de estos trabajos se han realizado en ganado bovino y la información disponible sobre leche de oveja es muy escasa. Por ello, el objetivo principal de esta Tesis es mejorar el perfil nutricional en ácidos grasos de la grasa láctea ovina de forma natural, mediante la suplementación de la dieta de los animales con distintas fuentes lipídicas y prestando especial atención a los siguientes aspectos parciales:

1. Aumentar los niveles del ácido ruménico (RA, *cis*-9, *trans*-11 C18:2) y del ácido vacénico (VA, *trans*-11 C18:1), su precursor fisiológico en la glándula mamaria, en la leche de oveja.
2. Incrementar los contenidos de ácidos grasos omega-3, esenciales en la dieta humana, en grasa láctea.
3. Disminuir simultáneamente los ácidos grasos saturados, sin modificar el contenido de ácidos grasos *trans*-monoinsaturados que podrían ser perjudiciales para la salud.
4. No afectar negativamente al rendimiento productivo del ganado.

5. Determinar los posibles efectos beneficiosos o adversos de una grasa rica en VA y RA o *trans*-10 C18:1 en modelos animales.

6. Contrastar la aceptación organoléptica y la ausencia de modificaciones en la composición lipídica de quesos elaborados a partir de leche enriquecida en ácidos grasos saludables.

7. Identificar los ácidos grasos minoritarios presentes en grasa láctea que pudieran ayudar a esclarecer el metabolismo lipídico, prestando especial atención a los intermediarios de la ruta de biohidrogenación del ácido α -linolénico.

Para llevar a cabo los objetivos, el plan de trabajo propuesto es el que se indica a continuación:

1. Estudio de la influencia, sobre el perfil en ácidos grasos de la leche, de la adición a la dieta ovina de un suplemento graso rico en ácidos grasos monoinsaturados, mediante la incorporación de aceite de oliva en las raciones.

2. Evaluación de la suplementación de la dieta de ovejas lecheras con una fuente lipídica rica en ácido linoleico, aceite de soja, para mejorar las características nutricionales de la grasa de la leche.

3. Determinación del efecto, sobre el contenido de ácidos grasos saludables de la leche, de la inclusión en la dieta ovina de suplementos ricos en ácidos grasos omega-3 de cadena corta (semilla de lino) y larga (aceite de pescado).

4. Valoración de las potenciales ventajas que ofrece la alimentación en régimen extensivo frente a la explotación intensiva en la calidad nutricional de la grasa de leche de oveja.

5. Elaboración y posterior estudio de quesos fabricados con la leche que presente la composición en ácidos grasos más saludable.

6. Valoración en modelos animales de los posibles riesgos toxicológicos de grasas de leche enriquecidas en *trans*-10 C18:1 y de las potenciales ventajas de la grasa láctea con altos contenidos en VA y RA.

7. Caracterización en grasa láctea de intermediarios de biohidrogenación del ácido α -linolénico mediante el empleo de distintas técnicas cromatográficas.

3. Resultados y Discusión

Artículo 1:

P. Gómez-Cortés, P. Frutos, A.R. Mantecón, M. Juárez, M.A. de la Fuente y G. Hervás.

Addition of Olive Oil to Dairy Ewe Diets: Effect on Milk Fatty Acid Profile and Animal Performance

Journal of Dairy Science. 2008. 91:3119-3127.

INCORPORACIÓN DE ACEITE DE OLIVA EN LA DIETA OVINA: EFECTO SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA GRASA LÁCTEA Y EL RENDIMIENTO PRODUCTIVO

El objetivo de este trabajo fue valorar el efecto de la incorporación de niveles altos de aceite de oliva en forma libre sobre el perfil de ácidos grasos de la grasa de leche de oveja y el rendimiento productivo. Para ello 24 ovejas de raza Assaf se alimentaron durante 28 días con una dieta control (dos grupos de seis animales) y otra suplementada con 6% de aceite de oliva (dos grupos de seis animales). Se utilizaron técnicas cromatográficas (GC y Ag⁺-HPLC) para determinar la composición de ácidos grasos de la grasa láctea a 0, 7, 14, 21 y 28 días. Asimismo se registraron semanalmente la ingesta de alimento, el rendimiento y la composición de la leche.

La dieta suplementada con aceite de oliva dio lugar a cambios positivos en la composición en ácidos grasos, con un descenso en el contenido de los ácidos C12:0, C14:0 y C16:0 y un notable aumento de C18:0 y *cis*-9 C18:1. Este resultado cabe atribuirlo a la entrada en la glándula mamaria de cantidades elevadas de ácido esteárico, procedente de la hidrogenación en el rumen del ácido oleico y de este mismo ácido incluido en la dieta. Ambos competirían por la esterificación en los triglicéridos con los ácidos grasos saturados producidos por síntesis *de novo* en la glándula mamaria.

Simultáneamente se produjo un aumento destacable en el contenido de ácidos grasos *trans* C18:1 monoinsaturados minoritarios, intermediarios producidos por isomerización del ácido oleico antes de la hidrogenación completa a ácido esteárico en el rumen.

Entre los isómeros de CLA se observó un aumento significativo de *trans*-7 *cis*-9 y *trans*-9 *cis*-11 C18:2, mientras que los porcentajes de *cis*-9 *trans*-11 C18:2 disminuyeron como consecuencia de la suplementación. El aumento del *trans*-7 *cis*-9 C18:2 se justifica por su síntesis, casi exclusivamente de forma endógena, a partir del *trans*-7 C18:1 generado en el rumen. Los cambios en otros isómeros de CLA tendrían que ser atribuidos a modificaciones en las rutas de biohidrogenación ruminal como consecuencia de los altos niveles de concentrado y/o la alta suplementación lipídica.

A pesar de los aspectos positivos derivados de la disminución de los ácidos grasos saturados y el incremento de los niveles de ácido oleico en la grasa de leche, el descenso de RA y sobre todo el aumento de distintos isómeros *trans* C18:1, principalmente *trans*-10, desaconsejan el empleo de esta dieta para mejorar las características nutricionales de la grasa láctea.

Artículo 2:

P. Gómez-Cortés, P. Frutos, A.R. Mantecón, M. Juárez, M.A. de la Fuente y G. Hervás.

Milk Production, Conjugated Linoleic Acid Content, and *In Vitro* Ruminal Fermentation in Response to High Levels of Soybean Oil in Dairy Ewe Diet

Journal of Dairy Science. 2008. 91:1560-1569.

ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO Y PRODUCCIÓN LECHERA EN OVEJAS ALIMENTADAS CON DIETAS ALTAMENTE SUPLEMENTADAS EN ACEITE DE SEMILLA DE SOJA

La incorporación a la dieta de fuentes lipídicas ricas en ácido linoleico se ha demostrado, en ganado vacuno, como una estrategia efectiva para enriquecer la grasa de leche en CLA. Sin embargo, también se ha documentado que un exceso de aceite en forma libre en las raciones podría afectar a la eficacia productiva del ganado. El objetivo de este trabajo fue mejorar el perfil nutricional de la grasa de leche de oveja, mediante el incremento de ácidos grasos potencialmente saludables como el *cis-9 trans-11 C18:2*, sin afectar al rendimiento ni a la composición lechera.

Para cubrir este objetivo 24 ovejas fueron incluidas en dos tratamientos (dos lotes de 6 ovejas por tratamiento), uno control (forraje:concentrado 20:80) y otro suplementado con un 6% de aceite de semilla de soja, sustrato rico en ácido linoleico, durante un período de tres semanas.

La incorporación a la dieta del aceite de semilla de soja se tradujo en una disminución de los ácidos grasos saturados de cadena par (C6:0 al C16:0), a expensas de un incremento en C18:0, de distintos isómeros de C18:1 y de CLA, todo ello sin una disminución significativa del rendimiento lechero. Las proporciones de *cis-9 trans-11 C18:2* y *trans-11 C18:1*, su precursor en la glándula mamaria, aumentaron de 1.04 a 3.44 y de 2.08 a 6.20 g/100 g del total de ácidos grasos, respectivamente. Sin embargo, estas dietas generaban también niveles altos de *trans-10 C18:1* y otros isómeros *trans* monoinsaturados, cuya incidencia desde el punto de vista nutricional plantea dudas.

Por otra parte, se encontraron aumentos en los ácidos *trans-10 cis-12* y *trans-9 cis-11 C18:2*, dos isómeros de CLA implicados en el síndrome de depresión de grasa en leche, en ganado bovino. Sin embargo, en este caso, no fueron acompañados por una caída en el contenido y en el rendimiento de grasa.

Estos resultados demuestran que se puede mejorar notablemente los niveles de CLA en leche ovina sin afectar al rendimiento productivo del ganado, suplementando la dieta con altas concentraciones de aceite en forma libre.

Artículo 3:

P.G. Toral, P. Frutos, G. Hervás, P. Gómez-Cortés, M. Juárez y M.A. de la Fuente.

Changes in Milk Fatty Acid Profile and Animal Performance in Response to Fish Oil Supplementation, Alone or in Combination with Sunflower Oil, in Dairy Ewes.

Journal of Dairy Science. 2010. 93:1604-1615.

CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE Y EN LA EFICACIA PRODUCTIVA DEL GANADO EN RESPUESTA A LA INCORPORACIÓN DE ACEITE DE PESCADO, SÓLO O EN COMBINACIÓN CON ACEITE DE GIRASOL, EN LA DIETA OVINA

La incorporación de sustratos lipídicos ricos en ácidos grasos omega-3 de cadena larga y ácido linoleico a la dieta de rumiantes, podría ser una buena estrategia para incrementar los niveles de componentes saludables de la grasa de leche. En este trabajo la dieta ovina se suplementó con aceite de pescado, sólo o en combinación con aceite de girasol, con el propósito de mejorar la calidad nutricional de la leche y evaluar su influencia en el rendimiento productivo. Para ello se utilizaron 64 ovejas, alimentadas con una relación forraje:concentrado 20:80 como dieta base, que se distribuyeron en 8 lotes de 8 animales cada uno en cuatro tratamientos (dos por lote): sin suplementación lipídica (Control) y suplementados con 2% de aceite de girasol (SO), 1% de aceite de pescado (FO) y 2% de aceite de girasol más 1% de aceite de pescado (SOFO). El rendimiento productivo y la composición de ácidos grasos de la leche se registraron a los 0, 3, 7, 14, 21, y 28 días.

Todos los suplementos lipídicos ensayados disminuyeron en leche los rendimientos en ácidos grasos saturados, desde el C6:0 al C16:0, mientras que las dietas FO y SOFO provocaron además un fuerte descenso en los contenidos de C18:0 y *cis*-9 C18:1, como consecuencia del efecto inhibitor que el aceite de pescado ejerce sobre la conversión de VA a C18:0 en el rumen. Todos los tratamientos ensayados incrementaron los contenidos de RA y VA en leche, alcanzándose los niveles más altos (multiplicados por 4) con la dieta SOFO, a los siete días de suplementación. Sin embargo estos valores fueron transitorios y disminuyeron después de la primera semana, probablemente como consecuencia de cambios en las rutas de biohidrogenación. Este hecho provocó incrementos significativos en otros ácidos grasos *trans* C18:1, particularmente en el isómero *trans*-10. Los niveles de ácidos grasos omega-3 de cadena larga también aumentaron con los tratamientos FO y SOFO, pero con un bajo nivel de transferencia de la dieta a la leche.

El aceite de pescado, sólo o en presencia de aceite de girasol, provocó una disminución del contenido y del rendimiento de grasa en leche (*Milk Fat Depression*, MFD). Aunque los responsables de este síndrome no están completamente perfilados, de los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían deducirse varios mecanismos. El primero estaría basado en el potencial efecto inhibitor que sobre la síntesis de grasa ejercerían ciertos ácidos grasos como el *trans*-10 C18:1 y *trans*-9 *cis*-11 C18:2, cuyos contenidos experimentaron un aumento significativo con las dietas FO y SOFO. El segundo estaría relacionado con la disminución de la síntesis *de novo* de ácidos grasos saturados de cadena corta y media, así como con el fuerte descenso de la producción de C18:0 en el rumen y la caída en la producción de *cis*-9 C18:1 en la glándula mamaría que ello acarrearía. Este cambio en el perfil lipídico de la leche implicaría una disminución de la secreción de grasa al objeto de mantener la fluidez de la misma en un intervalo fisiológico viable.

Los resultados del trabajo permiten concluir que la incorporación de pequeñas cantidades de aceite de pescado en las raciones es una estrategia efectiva para aumentar los contenidos de CLA y ácidos omega-3 de cadena larga en la leche. Sin embargo, la disminución de la producción lechera y de los niveles de grasa de leche, que incidiría negativamente en el rendimiento en queso, así como el aumento de los contenidos de *trans*-10 C18:1, no aconsejan la utilización de este tipo de suplementación.

Artículo 4:

A. Anadón, M.R. Martínez-Larrañaga, M.A. Martínez, I. Ares, E. Ramos, P. Gómez-Cortés, M. Juárez y M.A. de la Fuente.

Acute Oral Safety Study of Dairy Fat Rich in *trans*-10 C18:1 versus Vaccenic plus Conjugated Linoleic Acid in Rats

Food and Chemical Toxicology. 2010. 48:591-598.

EVALUACIÓN DEL GRADO DE TOXICIDAD DE GRASAS LÁCTEAS ENRIQUECIDAS EN *trans*-10 C18:1 Y EN UNA MEZCLA DE ÁCIDO VACÉNICO Y RUMÉNICO

El propósito de esta experiencia fue valorar la toxicidad aguda de dos grasas lácteas, la primera (T10) enriquecida en *trans*-10 C18:1 (20% del total de ácidos grasos) y una segunda (T11-CLA) con contenidos muy altos de ácido vacénico y ruménico (14 y 4.8% del total de ácidos grasos, respectivamente). Ambas grasas se administraron en una dosis única (2.000 mg/Kg de peso corporal) por vía oral a ratas.

Tanto T10 como T11-CLA fueron bien toleradas por los animales y durante el período de observación (dos semanas) no se observaron ni efectos adversos ni mortalidad alguna. Si exceptuamos los niveles de lípidos plasmáticos, no se detectaron cambios significativos en parámetros histopatológicos, hematológicos y patológicos, así como en el peso de los distintos órganos corporales. En las ratas tratadas con T10 hubo un aumento en los niveles de triglicéridos plasmáticos en contraste con T11-CLA, que mostró una disminución significativa.

La principal conclusión del trabajo es que ambas grasas muestran una baja toxicidad oral a la dosis suministrada. Sin embargo estos resultados también sugieren que el tratamiento T10 podría favorecer el aumento de triglicéridos en plasma, mientras que la presencia de ácido vacénico y ruménico en grasa de leche podría incidir de forma positiva sobre ese parámetro.

Artículo 5:

P. Gómez-Cortés, P. Frutos, A.R. Mantecón, M. Juárez, M.A. de la Fuente y G. Hervás.

**Effect of the Supplementation of Grazing Dairy Ewes
with a Cereal Concentrate on Animal Performance and
Milk Fatty Acid Profile**

Journal of Dairy Science. 2009. 92:3964-3972.

EFFECTOS DEL REFUERZO DE LA DIETA DE OVEJAS EN RÉGIMEN DE PASTOREO CON CONCENTRADO DE CEREALES SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS Y LA PRODUCCIÓN LECHERA

Aunque el perfil de ácidos grasos de la leche producida en régimen de pastoreo es generalmente reconocido como uno de los más favorables desde el punto de vista nutricional, esta práctica ganadera lleva generalmente asociada una productividad más baja de los animales. El objetivo principal de este trabajo fue valorar los efectos, sobre el perfil de ácidos grasos y el rendimiento productivo de leche de oveja, de la adición de un concentrado de cereales a una dieta basada en el consumo exclusivo de pasto. Para ello 90 ovejas fueron asignadas durante cinco semanas a tres tratamientos (tres lotes de 10 ovejas por tratamiento). El primero basado en una alimentación exclusiva a base de pasto, el segundo (PS) reforzando dicha dieta con grano de avena (700 g por animal y día) y el tercero representativo de un régimen intensivo (TMR) basado en una ración rica en concentrado (forraje:concentrado 20:80).

Como cabía esperar, la producción más alta de leche se observó en ovejas alimentadas con TMR. Sin embargo, la suplementación del pasto con grano de avena fue en detrimento del rendimiento productivo y de la composición de la leche. El índice de aterogenicidad no fue diferente en las dos dietas basadas en pasto, pero resultó inferior al obtenido con la ración TMR (1.53 para Pasto, 1.54 para PS y 3.22 para TMR). Por otra parte, mientras el tratamiento PS generó cantidades más altas de C18:0 y *cis*-9 C18:1 en comparación con el tratamiento exclusivo a base de pasto, la presencia de grano de avena disminuyó significativamente los niveles de ácido α -linolénico y de la mayoría de sus intermediarios de biohidrogenación. El ácido ruménico y el ácido vacénico fueron más bajos en el tratamiento PS (0.58 y 1.59 g/100 g del total de ácidos grasos) que en el TMR (0.72 y 1.92 g/100 g del total de ácidos grasos) y estuvieron alejados de los valores alcanzados en leche de ovejas bajo régimen exclusivo de pastoreo (1.21 y 3.88 g/100 g del total de ácidos grasos). Además en esta última dieta se detectaron los niveles más bajos de *trans*-10 C18:1 y *trans*-10 *cis*-12 C18:2. Por tanto se puede concluir que cuando la calidad y la disponibilidad del pasto no limitan la producción de leche, la suplementación de la dieta ovina con grano de avena compromete un perfil saludable de ácidos grasos, sin redundar en una mejora del rendimiento productivo.

Artículo 6:

P. Gómez-Cortés, A. Bach, P. Luna, M. Juárez y M.A. de la Fuente.

**Effects of Extruded Linseed Supplementation on n-3
Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acid in Milk and
Cheese from Ewes**

Journal of Dairy Science. 2009. 92:4122-4134.

INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN CON DISTINTOS NIVELES DE SEMILLA EXTRUSIONADA DE LINO SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LECHE Y QUESO DE OVEJA

El objetivo de este estudio fue valorar los efectos de una dieta suplementada con semilla extrusionada de lino sobre el perfil de ácidos grasos de leche de oveja, para la posterior producción de un queso tipo Manchego enriquecido simultáneamente en CLA y ácidos grasos omega-3. Para ello un rebaño de 300 ovejas se dividió en tres grupos que se alimentaron durante dos meses con dietas (relación forraje:concentrado 60:40) suplementadas respectivamente con 0 (Control), 6 (LEL) y 12 (HEL) g de semilla extrusionada de lino por 100 g de materia seca. A los 0, 7, 14, 28, 45 y 60 días desde el comienzo de la suplementación se recogieron muestras de leche de gran mezcla y de 5 ovejas individuales de cada uno de los tres grupos de alimentación, para determinar la composición de la leche y el contenido en ácidos grasos.

El rendimiento lechero aumentó como consecuencia de la suplementación lipídica y el contenido en proteínas, grasa y sólidos totales no se vio afectado negativamente.

Los niveles de ácido α -linolénico se incrementaron desde 0.36 en la dieta Control hasta 1.91% en el tratamiento con 12% de semilla de lino. De igual forma las concentraciones de RA y VA aumentaron desde 0.73 y 1.55 hasta 2.33% y 5.76% respectivamente con la dieta HEL. No se observaron incrementos significativos de *trans*-10 C18:1 y *trans*-10 *cis*-12 C18:2. La suplementación con semilla extrusionada de lino favoreció también una caída en los contenidos de C12:0 (-30%), C14:0 (-15%) y C16:0 (-28%), disminuyendo de esta forma el índice de aterogenicidad de la grasa de leche.

Por otra parte, la respuesta a la suplementación lipídica no decayó durante todo el período ensayado para los ácidos grasos mencionados, y el proceso de fabricación y maduración de quesos no modificó los perfiles lipídicos de la grasa láctea. Las características organolépticas de los quesos fabricados con leches enriquecidas en ácidos grasos omega-3 y CLA fueron similares a las de quesos Control.

Por tanto la suplementación con semilla extrusionada de lino, en las cantidades ensayadas y con una dieta rica en forraje, se configura como una de las estrategias más útiles para mejorar la calidad nutricional de la grasa de productos lácteos fabricados con leche ovina.

Artículo 7:

P. Gómez-Cortés, C. Tyburczy, J.T. Brenna, M. Juárez y M.A. de la Fuente.

**Characterization of *cis-9 trans-11 trans-15 C18:3* in
Milk Fat by GC and Covalent Adduct Chemical
Ionization Tandem MS**

Journal of Lipid Research. 2009. 50:2412-2420.

CARACTERIZACIÓN DE *cis-9 trans-11 trans-15* C18:3 EN GRASA DE LECHE POR CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM TRAS IONIZACIÓN QUÍMICA DEL ACETONITRILLO Y FORMACIÓN DE ADUCTOS COVALENTES

La biohidrogenación del ácido α -linolénico presente en la dieta de rumiantes genera distintos intermediarios que pueden ser transferidos posteriormente desde el tracto digestivo a la grasa de leche. El ácido rumelénico (*cis-9 trans-11 cis-15* C18:3), producido por isomerización del enlace *cis-12* a *trans-11*, ha sido caracterizado recientemente en leche de vaca. Sin embargo, la estructura de otros ácidos grasos producidos en menores cantidades en el curso de la biohidrogenación del ácido α -linolénico es todavía desconocida.

El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar un nuevo isómero del ácido octadecatrienoico presente en leche de ovejas alimentadas con dietas enriquecidas en ácido α -linolénico.

El análisis por cromatografía de gases con detector de masas de impacto electrónico de los derivados dimetiloxazolona y de los ésteres de picolinilo de dicho ácido graso, permitió determinar la posición de los tres dobles enlaces de la molécula desconocida (9-11-15). La utilización de la espectrometría de masas en tandem tras ionización química del acetonitrilo y formación de aductos covalentes confirmó dicha estructura posicional, idéntica a la del ácido rumelénico, y ayudó a establecer la configuración geométrica de los dobles enlaces (*cis-trans-trans*). Este nuevo isómero C18:3 podría ser formado por isomerización del enlace *cis-15* del ácido rumelénico y posteriormente ser convertido por biohidrogenación a *trans-11 trans-15* C18:2, un ácido octadecadienoico también detectado en este estudio.

4. Discusi3n General

El objetivo general de la presente Tesis es mejorar el perfil en ácidos grasos de la grasa de leche de oveja hacia uno más saludable, en la línea de una disminución de los ácidos grasos saturados e incremento de insaturados, incluido el CLA y los ácidos grasos omega-3. Entre las alternativas consideradas, la modificación de la dieta de los animales mediante suplementación con aceites o semillas ricas en ácidos grasos MUFA y PUFA es la que ha aportado resultados más interesantes desde el punto de vista nutricional y constituye el tema central de este trabajo.

4.1. ADICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS A LA DIETA OVINA

La primera de las estrategias empleadas para mejorar las características nutricionales de la grasa láctea consistió en suplementar la dieta base de ovejas lecheras (relación forraje:concentrado 20:80) con niveles altos de aceite de oliva (6% en materia seca), sustrato muy rico en ácido oleico. La utilización de dosis tan altas de aceite en forma libre ha sido generalmente desaconsejada con objeto de evitar cambios en la actividad microbiana ruminal y no afectar al rendimiento lechero ni a la composición de la leche (Jenkins, 1993). Sin embargo estudios recientes en ganado ovino, alimentado con dietas suplementadas con niveles elevados de aceites ricos en ácido linoleico, no observaron cambios perjudiciales en dichos parámetros productivos (Mele *et al.*, 2006; Hervás *et al.*, 2008).

El rendimiento lechero de las ovejas que seguían la dieta suplementada con aceite de oliva aumentó, y además se observó una tendencia hacia una mayor producción de grasa, proteína y sólidos totales (Tabla 2, página 64). Este aumento en la productividad cabría atribuirlo al mayor nivel energético de las raciones. Por otro lado, el contenido en proteínas de la leche disminuyó significativamente con la dieta enriquecida. Este hecho se ha descrito en ovejas que ingieren dietas suplementadas con lípidos (Pulina *et al.*, 2006) y podría derivarse de la falta de respuesta a la creciente

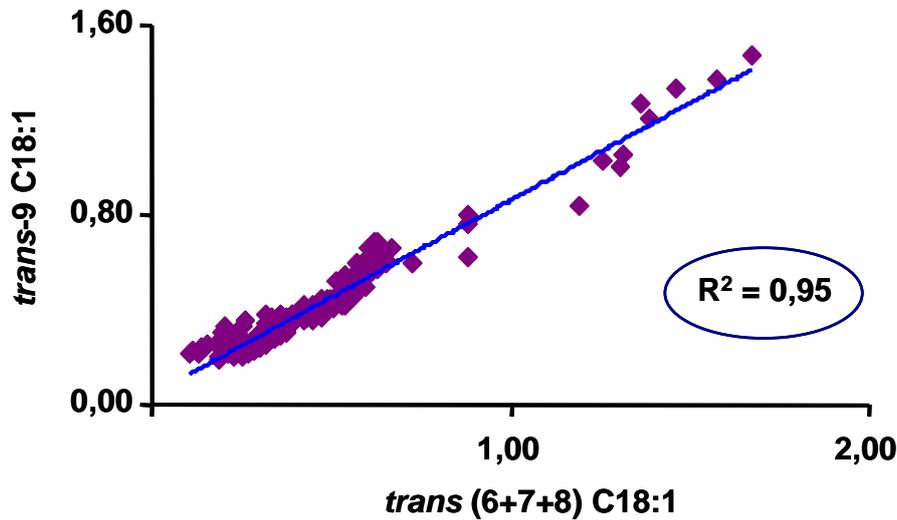
necesidad de aminoácidos en la glándula mamaria al incrementar la producción de leche (Gaynor *et al.*, 1994).

Los cambios más importantes en el perfil lipídico fueron un fuerte incremento en los ácidos grasos saturados y monoinsaturados (*cis* y *trans*) de 18 átomos de carbono. Por otro lado, el contenido de ácidos grasos saturados (C10:0–C16:0) presentes en la grasa láctea disminuyó durante el período de suplementación. Este resultado podría ser consecuencia del efecto de dilución provocado por la entrada de grandes cantidades de ácidos grasos de 18 átomos de carbono en la glándula mamaria. También se ha documentado (Palmquist *et al.*, 1993; Barber *et al.*, 1997) que estos ácidos grasos podrían ejercer una inhibición de las actividades enzimáticas implicadas en la síntesis *de novo* de ácidos grasos saturados de cadena corta y media, particularmente sobre la *acetil-CoA carboxilasa*. Los aumentos de C18:0 serían consecuencia de la hidrogenación en el rumen del ácido oleico presente en las raciones. Los elevados niveles de ácido oleico medidos en la grasa láctea de ovejas alimentadas con el suplemento de aceite de oliva, procederían tanto de la presencia de proporciones importantes de dicho ácido graso en la ración, como de la síntesis endógena en la glándula mamaria a partir de ácido esteárico. En ganado vacuno se ha documentado que aproximadamente el 40% del C18:0 que llega a la glándula mamaria es desaturado a *cis*-9 C18:1 por actuación de la enzima Δ -9 *desaturasa* (Lock y Garnsworthy, 2003). La leche enriquecida en este ácido graso resultaría muy favorable desde el punto de vista nutricional. Sin embargo la presencia de mayores contenidos de ácidos grasos *trans* C18:1, excepto el VA, respecto al grupo control, ofrece dudas sobre los potenciales efectos beneficiosos de la grasa de leche obtenida por adición de aceite de oliva a la dieta.

Como se observa en la Figura 1 (página 66), los ácidos grasos *trans* (6+7+8) y *trans*-9 C18:1 aumentan considerablemente la primera semana de suplementación, mientras que los incrementos en *trans*-10 C18:1 fueron más notorios a partir de los siete días. En contraste, los contenidos en VA apenas fueron modificados durante todo el experimento. A este respecto resulta llamativa la fuerte correlación (Figura 4.1) entre los contenidos de ácido elaídico (*trans*-9 C18:1) y *trans* (6+7+8) C18:1, no sólo en esta experiencia sino para el conjunto de dietas ensayadas en la presente Tesis. Dicha

relación no fue por ejemplo observada entre *trans*-9 C18:1 y otros ácidos grasos *trans* monoenoicos como *trans*-10, VA o *trans*-12.

Figura 4.1: Regresión lineal entre los contenidos de los ácidos grasos *trans* (6+7+8) y *trans*-9 C18:1 (g/100 g de ácidos grasos totales).



* Para llevar a cabo este análisis se consideraron 228 muestras de leche de oveja, procedentes del conjunto de estrategias nutricionales ensayadas en la presente Tesis.

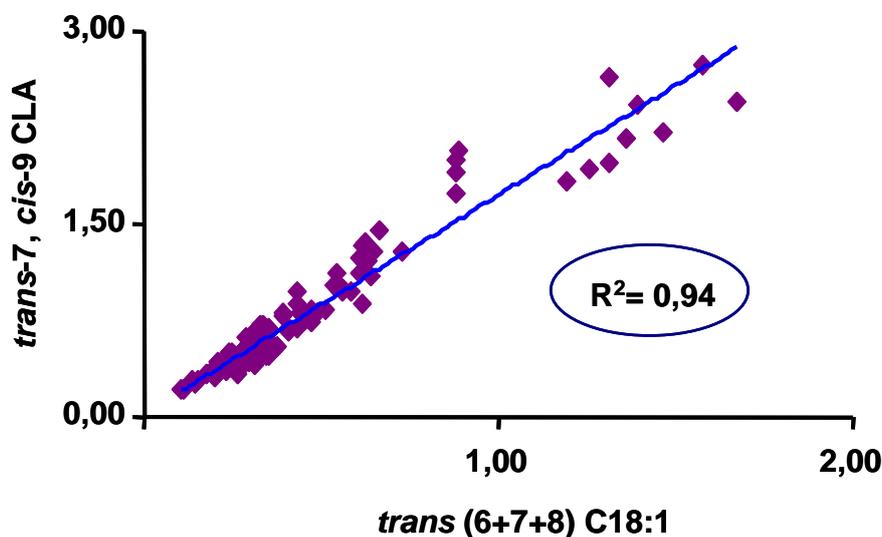
Los primeros estudios sobre la biohidrogenación del ácido oleico indicaban que este ácido graso se convertiría directamente a C18:0, por acción de enzimas presentes en las bacterias ruminales, sin la formación de intermediarios *trans* monoinsaturados (Kellens *et al.*, 1986). Trabajos más recientes, también llevados a cabo *in vitro*, proponen por el contrario que el ácido oleico se isomeriza primero a otros ácidos grasos *trans* C18:1 antes de ser hidrogenado (Mosley *et al.*, 2002; Proell *et al.*, 2002). Proell *et al.* (2002) postularon que la isomerización del ácido oleico podría dar lugar en una primera etapa a un único ácido graso *trans*-MUFA, *trans*-9 o *trans*-11 C18:1 en función de las condiciones fisiológicas del rumen. Posteriormente, el doble enlace podría migrar por reacciones de isomerización a otras posiciones dentro de la cadena hidrocarbonada, dando lugar al resto de ácidos grasos *trans*-C18:1. Los aumentos observados en grasa de leche de la mayor parte de los isómeros *trans*-C18:1, cuando las ovejas se alimentan con aceite de oliva, apoyarían esta última hipótesis (Tabla 3, página 65). Por tanto, y a pesar de que las rutas de biohidrogenación de los MUFA precisarían un estudio más

exhaustivo, si parece evidente que el *cis*-9 C18:1 presente en la dieta proporcionaría una variedad de isómeros *trans*-C18:1 en el rumen antes de ser hidrogenado a ácido esteárico. Buena parte de estos isómeros *trans* monoenoicos generados en el rumen serían susceptibles de ser incorporados posteriormente a la grasa láctea.

Respecto a los isómeros de CLA, la dieta suplementada con aceite de oliva aumentó significativamente los contenidos de *trans*-9, *cis*-11 y *trans*-7, *cis*-9 C18:2. El incremento de los niveles de *trans*-7, *cis*-9 CLA es coincidente con los resultados obtenidos cuando se suplementa la dieta bovina con ácido oleico (Collomb *et al.*, 2004). La fuerte relación existente entre *trans*-7, *cis*-9 C18:2 y el pico en el que eluye el *trans*-7 C18:1, que incluye los ácidos grasos *trans* (6+7+8) C18:1 (Figura 4.2), no sólo en raciones suplementadas con aceite de oliva sino en las distintas experiencias expuestas en esta Memoria, confirmaría en ganado ovino lo que distintos autores describieron en vacuno (Corl *et al.*, 2002; Piperova *et al.*, 2002). Esto es, que el *trans*-7 *cis*-9 C18:2 se sintetiza casi exclusivamente de forma endógena, a partir de *trans*-7 C18:1 por acción de la enzima Δ -9 desaturasa en la glándula mamaria.

Los aumentos de *trans*-9, *cis*-11 C18:2 en dietas suplementadas con aceite de oliva, unido al incremento en *trans*-10 C18:1 y la disminución de RA, tendrían que ser atribuidos a modificaciones en las rutas de biohidrogenación en el rumen como consecuencia de los altos niveles de concentrado y/o la alta suplementación lipídica, tema sobre el que se incidirá en apartados posteriores.

Figura 4.2: Regresión lineal entre los contenidos de los ácidos grasos *trans* (6+7+8) C18:1 (g/100 g de ácidos grasos totales), determinado por GC, y *trans*-7, *cis*-9 CLA (mg/100 g de ácidos grasos totales), determinado por Ag⁺-HPLC.



* Para llevar a cabo este análisis se consideraron 129 muestras de leche de oveja, procedentes del conjunto de estrategias nutricionales ensayadas en la presente Tesis.

En resumen, la suplementación de la dieta con un 6% de aceite de oliva y una relación forraje:concentrado 20:80 provocó cambios sustanciales en el perfil de ácidos grasos de la leche sin afectar negativamente la producción y composición de la misma. Destacan aspectos positivos tales como la disminución de los ácidos grasos saturados, a excepción del C18:0, y el aumento de los niveles de ácido oleico. Sin embargo, la bajada de RA y el aumento de distintos isómeros *trans* C18:1, principalmente *trans*-10, no aconsejan la utilización de esta dieta si el objetivo que se persigue es mejorar las características nutricionales de la grasa láctea.

4.2. SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA DE OVEJAS CON ACEITE DE SOJA

Tal como se expuso en la Introducción, la suplementación de la dieta ovina con un aceite vegetal rico en ácido linoleico, sustrato necesario para la síntesis ruminal de RA, podría ser una de las estrategias más efectivas para aumentar los contenidos de los ácidos grasos saludables de la leche. Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que la incorporación de un 6% de aceite de girasol en la dieta de ovejas lecheras, se traducía en un considerable aumento de los niveles de CLA en la grasa láctea (Hervás *et al.*, 2008). Para complementar esta línea de investigación se ensayó una dieta con un 6% de aceite de soja en forma libre, rico en ácido linoleico pero con pequeñas cantidades de ácido α -linolénico, y la misma dieta base que se utilizó en la experiencia anterior de suplementación con aceite de oliva.

En cuanto a la producción láctea, el aceite de soja no disminuyó el rendimiento lechero, al igual que ocurría con las ovejas que seguían la dieta enriquecida con aceite de oliva. Tampoco se encontraron diferencias en la composición de la leche o el rendimiento de grasa y proteínas entre la dieta control y la suplementada con soja (Tabla 2, página 78). Estas observaciones coinciden con buena parte de la investigación desarrollada en ganado ovino (Pulina *et al.*, 2006), pero en cambio entran en conflicto con estudios llevados a cabo en bovino, donde dietas bajas en fibra y suplementadas con altas cantidades de aceite provocan una disminución en la secreción de grasa láctea (Bauman *et al.*, 2001). A pesar de que este mecanismo no es todavía bien comprendido, nuestros resultados podrían indicar que existen diferencias en el comportamiento fisiológico de las distintas especies de rumiantes tal como ha sido recogido en estudios precedentes (Chilliard *et al.*, 2003 y 2007).

Al igual que en la experiencia anterior, la disminución encontrada en los contenidos de ácidos grasos saturados de C6:0 a C16:0 podría justificarse atendiendo al efecto de dilución provocado por la entrada en la glándula mamaria de ácidos grasos de 18 átomos de carbono procedentes tanto de la dieta como de intermediarios de la biohidrogenación ruminal, o por el potencial efecto inhibitor que estos mismos ácidos pudieran ejercer sobre la síntesis *de novo* de ácidos grasos en la glándula mamaria (Chilliard y Ferlay, 2004; Kadegowda *et al.*, 2009). Los menores incrementos en ácido

oleico en leche procedente de dietas suplementadas con aceite de semilla de soja, en comparación con los obtenidos con aceite de oliva, se justificarían atendiendo a la menor presencia de *cis*-9 C18:1 en dicho sustrato lipídico. Por idéntico motivo, los niveles de ácido α -linolénico y principalmente linoleico aumentaron significativamente con la dieta suplementada con soja, en concordancia con estudios previos en ganado ovino (Antongiovanni *et al.*, 2004; Mele *et al.*, 2006). Dado que ambos PUFA no se sintetizan en los tejidos de rumiantes, sus concentraciones en la leche sólo pueden ser aumentadas a través de la dieta, exclusivamente a partir de las moléculas que escapan a la biohidrogenación ruminal.

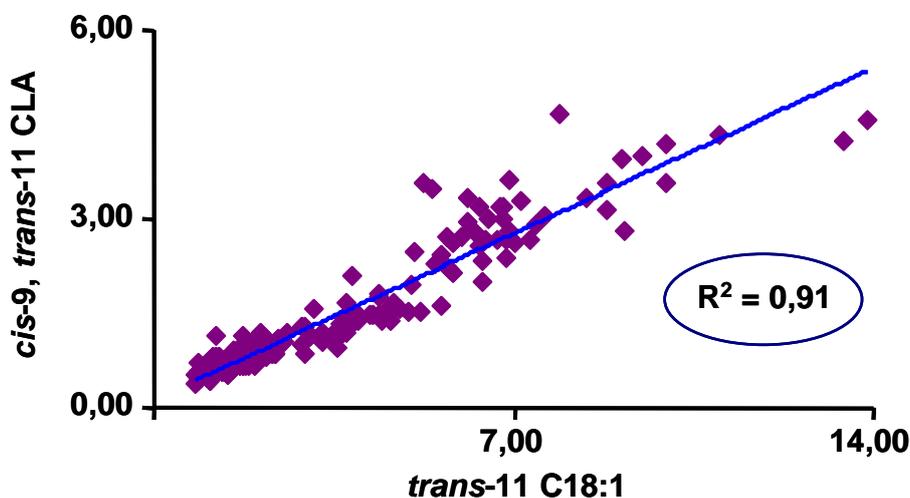
Aparte del ácido oleico, los isómeros *trans* C18:1 más abundantes en grasa de leche de ovejas que seguían la dieta suplementada con soja fueron el VA y el *trans*-10. Los elevados porcentajes de ambos, que alcanzaron niveles superiores al 6% del total de ácidos grasos en leche, indicarían la existencia de cierto equilibrio entre las dos rutas de biohidrogenación del ácido linoleico expuestas en el apartado 1.2.4 (principal y alternativa). Sin embargo, la disminución de los niveles de VA y el aumento de *trans*-10 C18:1 observados durante el transcurso de la experiencia (Figura 1, página 80) implicarían un predominio de la ruta de biohidrogenación alternativa (Figura 1.5, página 18) después de la primera semana de suplementación. En ganado vacuno se ha observado que la presencia de una baja relación forraje:concentrado desencadena subidas generalizadas en los niveles de *trans*-10 C18:1 en detrimento de los contenidos de VA en el líquido ruminal (Piperova *et al.*, 2000 y 2002). En la misma línea Daniel *et al.* (2004) reportaron, en ganado ovino, disminuciones drásticas de VA asociadas a fuertes aumentos de *trans*-10 C18:1 en líquido abomasal después de un incremento del contenido de concentrado en las raciones.

La alimentación con raciones abundantes en concentrado y fuertemente suplementadas con aceites vegetales en forma libre, provocarían alteraciones del medio ambiente ruminal que afectarían a la flora microbiana y al metabolismo lipídico. Aunque en el presente estudio estos cambios no tuvieron repercusiones negativas sobre los parámetros productivos, es muy probable que indujeran cambios en las rutas de biohidrogenación de los PUFA de la dieta. Este desplazamiento del equilibrio, provocado por la dieta base y el contenido de suplemento lipídico, explicaría la preponderancia del *trans*-10 C18:1 sobre el VA en grasa de leche en las etapas finales

tanto en la experiencia de suplementación con un 6% de aceite de oliva como con semilla de soja. La disminución del contenido en ácidos grasos saturados impares y ramificados detectada en ambos ensayos (Tabla 3, página 65 y Tabla 3, página 79), también sería indicativa de alteraciones en el ecosistema del rumen puesto que su formación es, en su mayor parte, dependiente de la flora microbiana (Vlaeminck *et al.*, 2006).

Los niveles de RA aumentaron significativamente como resultado de la adición de aceite de soja a las raciones, llegando a ser más del triple de los encontrados con la dieta control (3.44 frente a 1.04%). Como se observa en la Figura 1 (página 80), la evolución del contenido de RA a lo largo del periodo experimental es similar a la del VA. La estrecha correlación entre ambos ácidos grasos (Figura 4.3) es debida a la conversión de VA a RA en la glándula mamaria via Δ -9 *desaturasa*, mecanismo descrito en ganado vacuno por Griinari *et al.* (2000) y deducido para leche de oveja en trabajos posteriores (Cabbidu *et al.*, 2005; Luna *et al.*, 2005d; Nudda *et al.*, 2005).

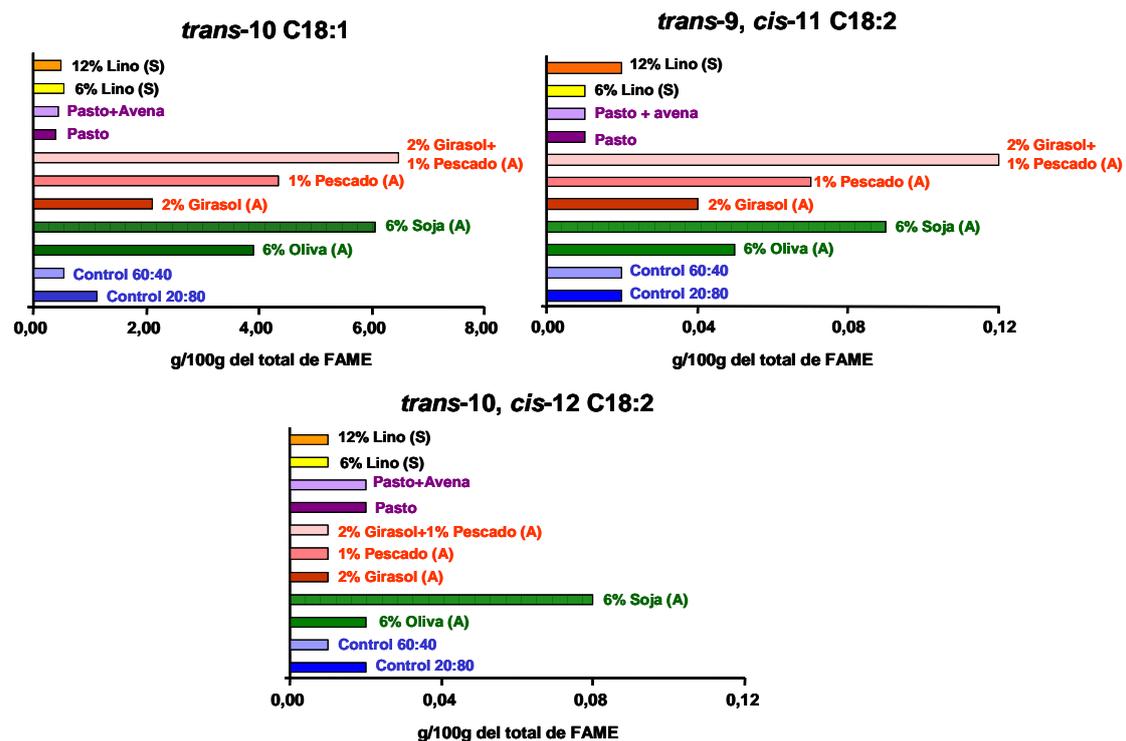
Figura 4.3: Regresión lineal entre los contenidos de los ácidos grasos VA y RA.



* Para llevar a cabo este análisis se consideraron 228 muestras de leche de oveja, procedentes del conjunto de estrategias nutricionales ensayadas en la presente Tesis.

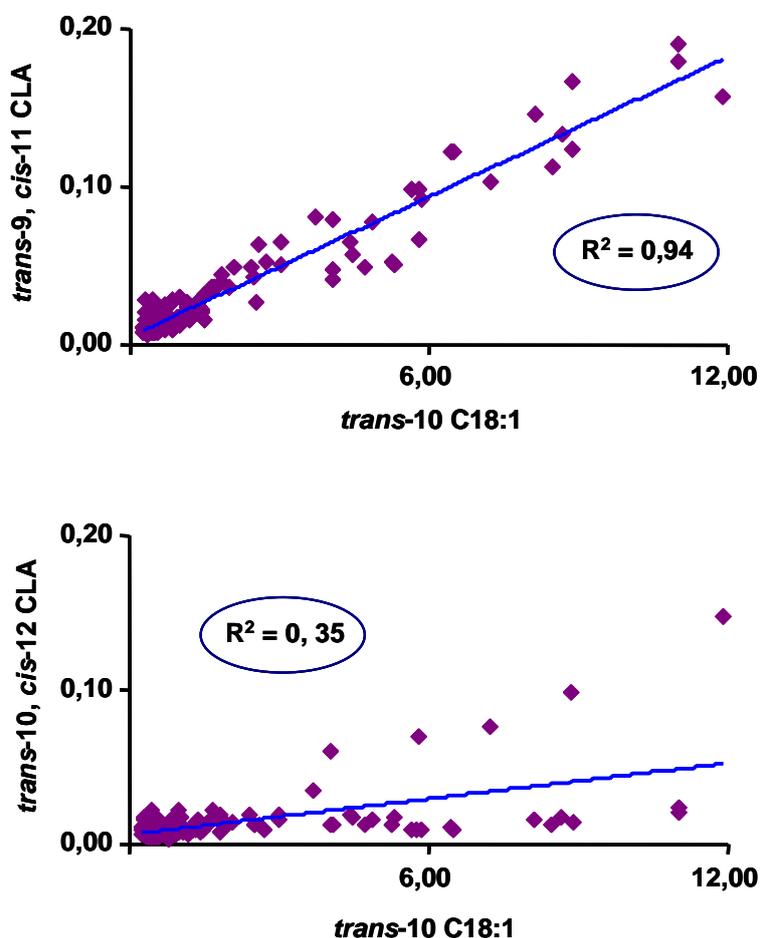
Entre los isómeros de CLA minoritarios destacan las subidas de *trans*-10 *cis*-12 y *trans*-9 *cis*-11 (Tabla 3 y Figura 1, páginas 79 y 80). Pero mientras los incrementos del segundo eran comunes a todas las dietas ricas en concentrado y aceites en forma libre descritas a lo largo de esta Memoria, los aumentos de *trans*-10 *cis*-12 C18:2 se circunscribían a las raciones suplementadas con un 6% de aceite de soja (Figura 4.4). Estos resultados, unidos a los documentados por Hervás *et al.* (2008) en leche de ovejas alimentadas con idéntica dieta base y suplementada con un 6% de aceite de girasol, subrayarían que la presencia de este isómero de CLA en grasa láctea ovina está condicionada por la incorporación de niveles elevados de ácido linoleico a las raciones y apenas estaría influida por la relación forraje:concentrado de la dieta base.

Figura 4.4: Concentración (g/100g de ácidos grasos totales) de los ácidos *trans*-10 C18:1, *trans*-9, *cis*-11 C18:2 y *trans*-10, *cis*-12 C18:2 en grasa láctea de oveja procedente del conjunto de experiencias ensayadas en esta memoria. (S = semilla, A = aceite).



Resulta llamativa la baja correlación existente entre los ácidos grasos *trans*-10 C18:1 y el *trans*-10 *cis*-12 C18:2 (Figura 4.5) a la vista de la ruta de biohidrogenación postulada para ambos (Figura 1.5, página 18). En contraste, también es interesante destacar la elevada correlación lineal entre los ácidos grasos *trans*-10 C18:1 y *trans*-9 *cis*-11 C18:2 (Figura 4.5). Este hecho (observado en todas las experiencias llevadas a cabo durante el desarrollo de esta Tesis) sugiere la existencia de un precursor común para ambos ácidos grasos, aunque las rutas metabólicas implicadas aún son desconocidas.

Figura 4.5: Regresión lineal entre los contenidos del ácido graso *trans*-10 C18:1 con los isómeros *trans*-9, *cis*-11 y *trans*-10, *cis*-12 C18:2.



* Para llevar a cabo este análisis se consideraron 228 muestras de leche de oveja, procedentes del conjunto de estrategias nutricionales ensayadas en la presente Tesis.

Los principales problemas que puede plantear la adición de un 6% de aceite de soja en la dieta ovina, desde una perspectiva nutricional, son los elevados porcentajes de *trans*-10 C18:1 que se generan, y la disminución de VA y RA en grasa de leche una vez transcurrida la primera semana de suplementación. Con objeto de favorecer la acumulación de VA en la cavidad ruminal, por inhibición de la biohidrogenación completa de los PUFA, y el aumento de RA por síntesis endógena, en la experiencia siguiente se incorporó aceite de pescado a las raciones.

4.3. INCORPORACIÓN DE ACEITE DE PESCADO A LA DIETA OVINA

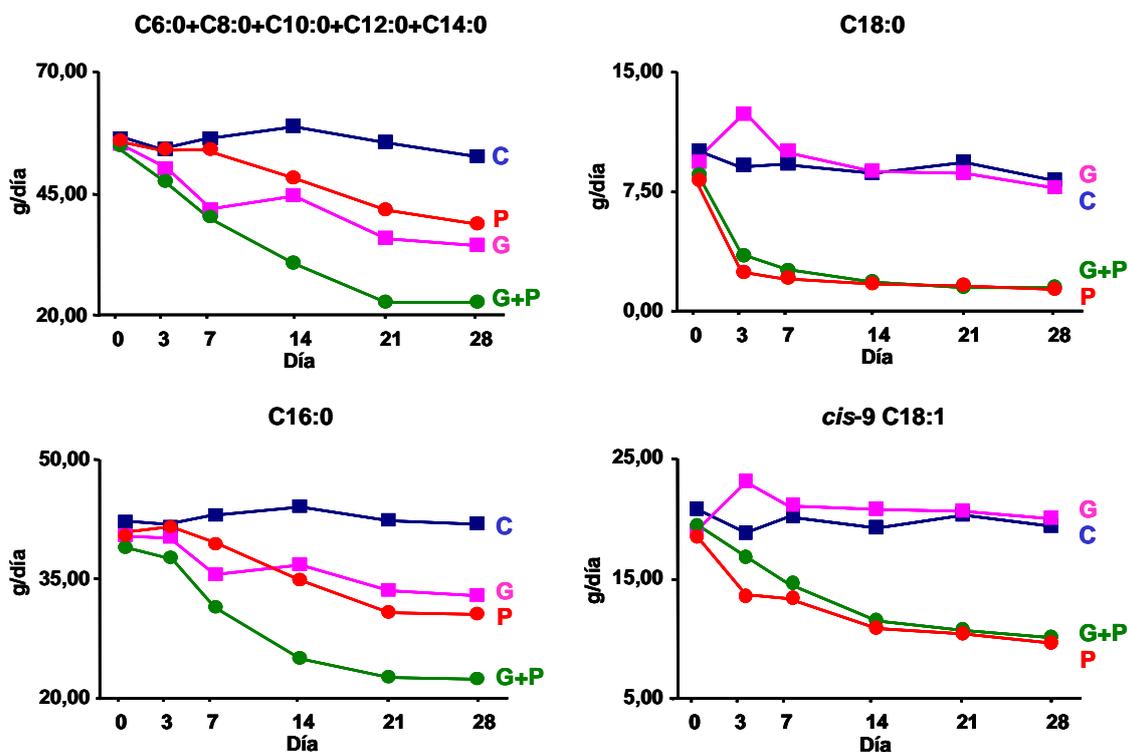
Distintos estudios han documentado, en ganado bovino, que la combinación de un aceite vegetal rico en ácido linoleico con un aceite de origen marino, es una buena estrategia para aumentar los contenidos de RA y ácidos grasos omega-3 de cadena larga en grasa láctea (Palmquist y Griinari, 2006; Shingfield *et al.*, 2006; Cruz-Hernández *et al.*, 2007). El objetivo de esta nueva experiencia fue estudiar el efecto de la adición de aceite de pescado, de forma individual y en combinación con una fuente de ácido linoleico, en la dieta ovina sobre el perfil en ácidos grasos de la leche y el rendimiento productivo. Para ello 4 grupos de ovejas se alimentaron, durante 4 semanas, con las siguientes dietas:

1. Dieta control (relación forraje:concentrado 20:80) sin suplementación lipídica.
2. Dieta control suplementada con 2% de aceite de girasol (G).
3. Dieta control suplementada con 1% de aceite de pescado (P).
4. Dieta control suplementada con una combinación de ambos aceites: 2% de girasol + 1% de pescado (G+P).

Las dietas que contenían aceite de girasol en su composición (G y G+P), redujeron significativamente desde el comienzo de la suplementación los niveles de ácidos grasos originados mediante síntesis *de novo* en la glándula mamaria, en coincidencia con los resultados obtenidos previamente con raciones enriquecidas en aceites de oliva y soja. Por el contrario, la dieta suplementada exclusivamente con aceite

de pescado no modificó los porcentajes de los ácidos grasos saturados del C6:0 a C14:0 en grasa de leche (Figura 2, página 95). Sin embargo, al expresar el contenido de esos ácidos grasos en base a la producción de leche se observó también con este suplemento una disminución del rendimiento productivo de los mismos frente al control aunque en menor grado que con las dietas G y G+P (Figura 4.6). Este descenso podría ser atribuido a un efecto de dilución, ya que la disminución del rendimiento en leche de este grupo de ácidos grasos coincide con el mayor nivel de suplementación lipídica (3% con G+P, 2% con G y 1% con P). Los PUFA procedentes de la dieta y del metabolismo ruminal se incorporarían a través del torrente sanguíneo en mayor medida a los triglicéridos en las células de la glándula mamaria, desplazando a los ácidos grasos sintetizados *de novo*. Otra explicación que justificaría estos resultados, como se expuso en el apartado 1.2.1, se basa en el efecto inhibitorio que la presencia de PUFA podría tener sobre la actividad de enzimas implicadas en la síntesis *de novo* (Chilliard y Ferlay, 2004; Kadegowda *et al.*, 2009).

Figura 4.6: Evolución del rendimiento (g/día) de los ácidos grasos saturados sintetizados *de novo* (C6:0+C8:0+C10:0+C12:0+C14:0), C16:0, C18:0 y *cis*-9 C18:1 de la dieta control sin suplementar (C, relación forraje:concentrado 20:80) y suplementada con un 2% de aceite de girasol (G), 1% de aceite de pescado (P) o la combinación de ambos aceites (G+P, 2% de girasol + 1% de pescado).



El comportamiento del ácido palmítico fue similar al del resto de ácidos grasos saturados (Figura 2, página 95 y Figura 4.6). Por otra parte, los contenidos de ácido esteárico en grasa láctea, y su rendimiento global en base a la producción de leche, disminuyeron drásticamente desde el comienzo del experimento con los tratamientos P y G+P (Figura 2, página 95 y Figura 4.6) mientras que en las dietas control y G apenas variaron. Estos resultados se explican atendiendo al efecto inhibitorio que sobre la última etapa de biohidrogenación del ácido linoleico (la conversión de ácido vacénico a esteárico) ejercen los aceites de origen marino. Estudios llevados a cabo en ganado vacuno han documentado que la suplementación de la dieta con este sustrato lipídico producía fuertes disminuciones del contenido de ácido esteárico en el líquido postruminal (Loor *et al.*, 2005b; Or-Rashid *et al.*, 2008), que venían acompañadas de aumentos notables en el flujo de ácidos grasos *trans* C18:1. El hecho de que las dietas G+P y P presentaran rendimientos similares de C18:0 (Figura 4.6) evidenciaría que la inhibición del último paso de la biohidrogenación del ácido linoleico está más relacionada con la presencia de aceite de pescado en la dieta que con el nivel total de suplementación lipídica. Experimentos *in vitro* (Abu-Ghazaleh y Jenkins, 2004) e *in vivo* (Abu-Ghazaleh *et al.*, 2009) han atribuido este papel inhibitorio al DHA, el ácido graso omega-3 cuantitativamente más importante en los lípidos de origen marino.

Respecto al ácido oleico, el rendimiento del mismo en leche evolucionó de forma similar al ácido esteárico (Figura 4.6). La escasez de sustrato (C18:0), derivada de la inclusión en la dieta de aceite de pescado, limitaría la síntesis endógena de *cis*-9 C18:1 en la glándula mamaria vía Δ -9 *desaturasa*. Esta disminución del rendimiento de ambos ácidos grasos, como se expondrá más adelante, podría contribuir a explicar la reducción del contenido de grasa en la leche (MFD, de sus siglas en inglés “*Milk Fat Depression*”) con las raciones G+P y P.

Las raciones que presentaban aceite de pescado en su composición aumentaron rápidamente los niveles de VA en grasa láctea (Figura 1, página 94). Sin embargo, esta respuesta fue transitoria y los contenidos de VA disminuyeron una vez transcurrida la primera semana. Los niveles de RA se llegaron a multiplicar por 5 con la dieta G+P pero su evolución fue similar a la del VA, con un pico de producción durante la primera semana y un declive posterior (Figura 1, página 94).

Esta carencia de sostenibilidad en los niveles de VA y RA, en respuesta a la suplementación con aceite de pescado, no supone el único problema derivado del empleo de este suplemento lipídico. Las raciones G+P y P proporcionaron contenidos muy elevados de *trans*-10 C18:1 a partir de la segunda semana de suplementación, que se mantuvieron estables hasta el final del ensayo (Figura 1, página 94). Los niveles de *trans*-10 C18:1 en las raciones G+P y P fueron comparables a los obtenidos con la dieta suplementada con 6% de aceite de soja (Figura 4.4, página 171), a pesar de contener la mitad o la sexta parte de suplemento lipídico. La generación de una mayor cantidad de ácidos grasos relacionados con alteraciones del metabolismo lipídico (*trans*-10 C18:1 y *trans*-9, *cis*-11 CLA) pone de manifiesto que la adición de pequeñas cantidades de aceite de pescado a la dieta ovina afectaría en mayor medida al ecosistema ruminal que la incorporación a la dieta de mayores cantidades de aceites de oleaginosas.

La dieta suplementada con un 2% de aceite de girasol mejoró los contenidos de VA y RA al comienzo del experimento, y éstos se mantuvieron constantes durante las 4 semanas. Además, durante este período, los aumentos registrados de *trans*-10 C18:1 fueron significativamente más bajos que los observados en las raciones suplementadas con aceite de pescado (Figura 1, página 94). Por otro lado, los resultados de la dieta G difieren de los ensayos precedentes (adición a las raciones de un 6% de aceite de oliva o soja), e incidirían sobre la evidencia de que niveles elevados de VA y RA, sin grandes aumentos en *trans*-10 C18:1, sólo pueden mantenerse si las condiciones del rumen permanecen inalteradas, esto es, con dietas ricas en forraje y contenidos bajos de aceite vegetal en forma libre (Shingfield y Griinari, 2007; Shingfield *et al.*, 2008b). Cruz-Hernández *et al.* (2007), en un experimento llevado a cabo en leche de vacas alimentadas con una dieta forraje:concentrado 50:50 y suplementadas con 0.5% de aceite de pescado observaron que los niveles de VA y RA declinaban en apenas unos días cuando el contenido en aceite de girasol en la ración superaba el 3%. Este carácter transitorio en los niveles de VA y RA no difería sustancialmente del aportado por otros autores (Abu-Ghazaleh *et al.*, 2004; Shingfield *et al.*, 2006). Ante tales observaciones, el máximo nivel de suplemento recomendado debería evaluarse cuidadosamente y siempre teniendo en cuenta la relación forraje:concentrado de las raciones que se vayan a utilizar.

Los contenidos de ácidos grasos omega-3 de cadena larga (EPA, DPA y DHA) en grasa láctea de ovejas alimentadas con aceite de pescado (P y G+P) fueron bajos en comparación con su ingesta (Tabla 4 y Figura 4, páginas 96 y 98), aunque comparables a los documentados en otros estudios en ovino (Papadopoulos *et al.*, 2002; Kitessa *et al.*, 2003). Los bajos niveles de transferencia en leche de EPA (11%) y DHA (13%), medidos al final del período de suplementación, serían fruto de la extensa biohidrogenación de estos ácidos grasos en el rumen (Lor *et al.*, 2005b; Castañeda-Gutiérrez *et al.*, 2007; Or-Rashid *et al.*, 2008) y su acumulación selectiva, en forma de ésteres de colesterol y fosfolípidos, en distintos tejidos corporales (Offer *et al.*, 1999 y 2001). A pesar de ello, la suplementación de la dieta con pequeñas cantidades de aceite de pescado (P y G+P) resultaría muy favorable desde el punto de vista nutricional, por reducir significativamente la relación omega-6/omega-3 de la grasa láctea (Tabla 4, página 96).

Una consecuencia destacable de la incorporación de aceite de pescado a las raciones fue la MFD, efecto que ha sido muy estudiado en ganado vacuno (Griinari y Bauman, 2006; Harvatine *et al.*, 2009), pero que no se observó en el tratamiento G ni tampoco en ensayos anteriores al adicionar aceite de oliva o soja. Como se muestra en la Figura 1 (página 94), el contenido de grasa láctea disminuyó drásticamente a partir del séptimo día de suplementación con la dieta G+P y, en menor medida, con la dieta P. Este síndrome ha sido asociado al efecto inhibitorio de ciertos ácidos grasos sobre la lipogénesis en la glándula mamaria (Shingfield y Griinari, 2007; Kadegowda *et al.*, 2008; Harvatine *et al.*, 2009). Sin embargo ninguna de las dietas ensayadas generaron cambios significativos en los niveles de *trans*-10, *cis*-12 C18:2 (Figura 4.4, página 171), el primer isómero de CLA que se relacionó directamente con la MFD en ganado vacuno (Baumgard *et al.*, 2000 y 2002) y ovino (Lock *et al.*, 2006; Sinclair *et al.*, 2007).

Las evoluciones análogas de los contenidos de *trans*-10 C18:1 y *trans*-9, *cis*-11 C18:2 en los tratamientos G+P y P durante el desarrollo del ensayo (Figura 1, página 94) y su estrecha relación con el rendimiento de grasa láctea (Tabla 5, página 98), podrían convertir a estos ácidos grasos en potenciales responsables de la MFD en ganado ovino. De hecho *trans*-9 *cis*-11 C18:2 ha sido reconocido ya como un inhibidor de la lipogénesis en leche de vaca (Perfield *et al.*, 2007) y aunque la información sobre el efecto de *trans*-10 C18:1 en la MFD suscita gran controversia (Lock *et al.*, 2007), las

evidencias más recientes (Kadegowda *et al.*, 2008 y 2009; Shingfield *et al.*, 2009) apuntan también en el mismo sentido. Sin embargo, dado que ambos ácidos grasos aumentan también en dietas carentes de aceite de pescado (Figura 4.4, página 171), sin que ello repercuta negativamente sobre el rendimiento en grasa de la leche, otros mecanismos derivados de cambios más globales del metabolismo lipídico deberían estar también implicados.

Distintos autores (Shingfield and Griinari, 2007; Gama *et al.*, 2008) han sugerido el impacto que el mantenimiento de la fluidez de la grasa láctea pueda tener sobre la capacidad de secreción de la misma por parte de la glándula mamaria. Hay que tener en cuenta que para que dicha secreción tenga lugar, la grasa de leche debe permanecer en estado líquido a temperatura fisiológica (39°C) (Timmen y Patton, 1988). Este hecho está directamente relacionado con la incorporación a los glóbulos de grasa de moléculas de triglicéridos con puntos de fusión bajos, que posean esterificados ácidos grasos como el oleico o saturados de cadena corta y media. La inhibición que ejerce el aceite de pescado sobre la conversión de VA a ácido esteárico en el rumen reduciendo la disponibilidad de C18:0 para la síntesis endógena de ácido oleico, junto a la disminución en la síntesis de ácidos grasos *de novo* en la glándula mamaria observada en el presente ensayo para los tratamientos G+P y P (Figura 4.6) irían en detrimento del mantenimiento de la fluidez de la grasa de leche. Además el aumento en ácidos grasos *trans* C18:1, con puntos de fusión más altos que sus homólogos *cis* (Gunstone *et al.*, 1994), característico de ambas dietas podría contribuir también a reducir la fluidez de la grasa láctea. En definitiva, en aquellos tratamientos que incluyan aceite de pescado, la MFD podría representar un mecanismo fisiológico para que la secreción de grasa de leche pueda continuar.

En esta experiencia se ha demostrado que la incorporación de pequeñas cantidades de aceite de pescado en las raciones sería una estrategia mucho más efectiva que los aceites vegetales para aumentar la presencia de CLA y PUFA omega-3 de cadena larga en leche. Sin embargo, la caída en la producción de leche así como la disminución en los niveles de grasa láctea desaconseja esta suplementación por el descenso consecuente en el rendimiento en queso a partir de dicha materia prima. Otro aspecto desfavorable son las proporciones de *trans*-10 C18:1 encontradas en grasa de leche procedente de dietas suplementadas con pescado, que llegaron a alcanzar el 11%

del total de ácidos grasos en muestras individuales (G+P). Las modificaciones tan importantes que tienen lugar en el perfil de isómeros *trans*-MUFA con las distintas alternativas de suplementación ensayadas y los porcentajes elevados de *trans*-10 C18:1 que pueden alcanzarse, hacen aconsejable la evaluación de la toxicidad de este tipo de grasas enriquecidas en isómeros *trans* C18:1.

4.4. ESTUDIO TOXICOLÓGICO DE GRASAS ENRIQUECIDAS EN VA+RA y *trans*-10 C18:1 EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La ingesta de ácidos grasos *trans* se relaciona comúnmente con el riesgo de padecer enfermedades coronarias. Sin embargo, como se expuso en el apartado 1.3.2, los efectos fisiológicos de los *trans* MUFA son isómero-dependientes. En esta experiencia se evaluó la toxicidad aguda de dos grasas lácteas enriquecidas en *trans*-10 C18:1 (20% del total de ácidos grasos) y VA+RA (14% y 5% del total de ácidos grasos, respectivamente) en animales de experimentación. Para ello se administró oralmente una dosis única de 2000 mg de grasa/kg de peso vivo a ratas, 6 machos y 6 hembras por grupo, y los resultados se compararon con dos grupos control. El primero no recibió ningún tratamiento mientras que al segundo se le administró una grasa de leche comercial con un contenido total de ácidos grasos *trans* inferior al 3,5%.

Los bajos niveles de toxicidad encontrados en las grasas lácteas objeto de estudio indicaron que la dosis letal, en ratas, está por encima de los valores ensayados. Aunque la mayoría de los parámetros clínicos no se vieron afectados, las grasas enriquecidas en *trans* MUFA provocaron cambios en los niveles de lípidos plasmáticos. La concentración de triglicéridos aumentó, sin importar el género del animal, con la grasa rica en *trans*-10 C18:1 en comparación con las dietas VA+RA y ambos controles (Tabla 3, página 111). Bauchart *et al.* (2007), que llevaron a cabo un estudio similar en conejos, también documentaron una subida de los niveles de triglicéridos en plasma al administrar a los animales grasas con contenidos altos en *trans*-10 C18:1 (menores del 12% del total de ácidos grasos). En consecuencia, ingerir cantidades elevadas de *trans*-10 C18:1 resultaría negativo en modelos animales desde el punto de vista cardiovascular. Por el contrario, las dietas enriquecidas en VA y RA se mostrarían

neutras o tenderían a reducir los factores de riesgo asociados a enfermedades coronarias (Roy *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en el presente estudio (Tabla 3, página 111) suponen una evidencia más en dicho sentido, debido a que la grasa VA+RA provocó una disminución significativa de la concentración de triglicéridos plasmáticos en animales de ambos sexos. Este hecho indicaría que la inclusión de dosis altas de VA+RA en la dieta podría proteger de la trigliceridemia.

En la misma línea, las grasas que presentaban un 14% de VA y un 5% de RA en su composición no modificaron negativamente los parámetros relativos al colesterol, de acuerdo con resultados previos obtenidos en hamsters (Lock *et al.*, 2005a) y conejos (Roy *et al.*, 2007). La grasa enriquecida en VA+RA disminuyó los niveles de colesterol total y LDL en ratas hembra, respecto a la administración de grasa láctea control, mientras que tales indicadores se mantuvieron estables en ratas macho (Tabla 3, página 111). La mayoría de las investigaciones realizadas con animales de experimentación no tuvieron en cuenta la diferencia de géneros (LeDoux *et al.*, 2007; Bauchart *et al.*, 2007). Sin embargo Chardigny *et al.* (2008) observaron, en un trabajo desarrollado en humanos, que los efectos ocasionados por dietas ricas en grasas *trans* de distinta procedencia (natural e industrial) estaban influenciados por el sexo.

Un estudio reciente demostró que los efectos hipercolesterolemicos asociados a los ácidos grasos *trans* C18:1 no eran dependientes de la presencia de VA ni *trans*-9 C18:1 en la dieta de hamsters macho (Tyburczy *et al.*, 2009). Estos autores postularon que los aceites vegetales parcialmente hidrogenados aumentaban el riesgo de padecer enfermedades coronarias debido a la presencia de *trans*-10 C18:1. La subida significativa de los niveles de triglicéridos y colesterol LDL, en ratas macho a las que se administró la grasa con un 20% de *trans*-10 C18:1 (Tabla 3, página 111), sería otro indicio que apuntaría en la misma dirección. Sin embargo, las diferencias ligadas al género de los animales hacen necesaria una investigación más exhaustiva en este ámbito.

4.5. EFECTOS DEL PASTOREO CON O SIN SUPLEMENTACIÓN DE CONCENTRADO SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS Y LA PRODUCCIÓN LACHERA

El estudio toxicológico realizado en animales de experimentación apoya la importancia que desempeña el perfil de ácidos grasos *trans* sobre la calidad nutricional de la grasa láctea. A la vista de los resultados obtenidos, en los experimentos siguientes se procuró aumentar los contenidos de los ácidos grasos potencialmente beneficiosos para la salud humana sin afectar, en la medida de lo posible, los niveles de *trans*-10 C18:1.

Distintos estudios han señalado que la aplicación de sistemas de producción extensivos basados en el consumo de pasto, típicos de países mediterráneos, pueden ser una estrategia muy útil para la producción de leche de oveja con un contenido elevado de CLA y PUFA omega-3 de cadena corta (Cabiddu *et al.*, 2005; Tsiplakou *et al.*, 2006; Pulina *et al.*, 2006). El pasto es rico en fibra y posee niveles altos de ácido α -linolénico cuya biohidrogenación en el rumen puede generar cantidades importantes de VA (Addis *et al.*, 2005). No obstante, estas características están condicionadas por factores medioambientales (el pasto fresco sólo se encuentra disponible durante un período limitado) y a menudo, con objeto de evitar una caída en la producción de leche, la dieta de los animales se suplementa con concentrados (Bargo *et al.*, 2003; Molle *et al.*, 2008).

En esta experiencia se pretendía evaluar la repercusión de algunas técnicas de explotación de ganado ovino sobre el perfil de ácidos grasos de la grasa láctea. Para ello, durante cinco semanas, se llevó a cabo el seguimiento de tres grupos de ovejas que consumieron tres tipos de dietas: una control, ensayada anteriormente y característica de sistemas intensivos (TMR, relación forraje:concentrado 20:80), una segunda basada exclusivamente en un sistema extensivo (pasto fresco) y una tercera semiextensiva (P+S, pasto fresco suplementado con concentrado). En esta última se utilizó como concentrado grano de avena, producto consumido tradicionalmente por pequeños rumiantes y conocido por su capacidad para mantener estable el medio ambiente ruminal (Orskov *et al.*, 1974).

Como cabía esperar, el rendimiento lechero de las ovejas alimentadas con pasto fresco disminuyó significativamente respecto a la ración TMR. Sin embargo, los valores mínimos de producción alcanzados con la dieta P+S (Tabla 2, página 122) hacen desaconsejable, desde el punto de vista productivo, el empleo de grano de avena como suplemento. No obstante, la alimentación a base de pasto (con y sin suplementación de avena) resultó ser una estrategia viable para obtener leches con un reducido índice aterogénico (IA, Tabla 4, página 124), y por tanto más favorables desde el punto de vista nutricional (Chilliard *et al.*, 2007). La alteración positiva del IA está directamente relacionada con los niveles más altos de ácidos grasos insaturados (MUFA y PUFA) y más bajos de ácidos grasos saturados en la leche procedente de sistemas no intensivos.

Aunque el efecto positivo del pastoreo en la calidad de la grasa láctea ha sido resaltado en experiencias previas en ganado bovino (Kelly *et al.*, 1998b), los estudios llevados a cabo con pequeños rumiantes no proporcionaron un perfil detallado de la composición en ácidos grasos minoritarios de la leche (Cabiddu *et al.*, 2005; Tsiplakou *et al.*, 2006). La alimentación exclusiva con pasto fresco aumentó significativamente en grasa láctea los niveles de los ácidos grasos α -linolénico, rumelénico (*cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 C18:3; RLnA), *trans*-11, *cis*-15 C18:2, VA, *cis*-15 C18:1 y *trans*-15 C18:1 (Tabla 3, página 123). Todos ellos procederían de la vía clásica de biohidrogenación del ácido α -linolénico descrita en la Introducción (Figura 1.4, página 15). La leche procedente de sistemas extensivos también incrementó los isómeros *trans*-11, *trans*-13; *trans*-11, *cis*-13; *trans*-12, *trans*-14 y *cis*-12, *trans*-14 CLA (Figura 1, página 126), pero las rutas metabólicas que podrían explicar su presencia en grasa láctea son todavía desconocidas (Kraft *et al.*, 2003). Únicamente existen indicios de que *trans*-11, *cis*-15 C18:2 podría isomerizarse en presencia de *Butyrivibrio fibrisolvens* a *trans*-11, *cis*-13 C18:2 (Hino y Fukuda, 2006).

El ácido α -linolénico y la mayoría de los ácidos grasos relacionados directa o indirectamente con su metabolismo alcanzaron los niveles máximos con la ingesta de pasto sin suplementar, mientras que tales contenidos disminuyeron significativamente con la adición de avena (Tabla 3 y Figura 1, páginas 123 y 126). La ingesta exclusiva de pasto duplicó los contenidos de VA y RA, y llegó a triplicar los del ácido α -linolénico respecto a TMR. Sin embargo, los incrementos de estos ácidos grasos potencialmente beneficiosos para la salud humana no resultaron tan notables en presencia del

suplemento de avena (Tablas 3 y 5, páginas 123 y 124). Los bajos porcentajes de los intermediarios de biohidrogenación del ácido α -linolénico, unidos al aumento simultáneo de C18:0 y *cis*-9 C18:1 en la leche P+S, indicarían que el grano de avena favorece la hidrogenación completa de los PUFA procedentes de la dieta en el rumen, confirmando su capacidad para mantener estable el medio ambiente ruminal (Orskov *et al.*, 1974).

Por otra parte, las dietas que presentaban pasto fresco en su composición generaron cantidades bajas de *trans*-10 C18:1 y de otros ácidos grasos característicos de rutas de biohidrogenación alternativas, un indicio del mantenimiento de las condiciones ruminales (Griinari y Bauman, 1999) (Tablas 3 y 5, páginas 123 y 124). En contraste, los porcentajes significativamente más altos de *trans*-10 C18:1 y *trans*-9, *cis*-11 C18:2 detectados con la dieta TMR indicarían que las explotaciones ganaderas que siguen sistemas intensivos derivarían en condiciones más drásticas para el ecosistema ruminal que las prácticas de pastoreo.

En resumen, los sistemas ganaderos extensivos podrían ser útiles para estimular la producción de una grasa láctea enriquecida en VA, RA y omega-3 de cadena corta, además de mantener bajos los niveles de *trans*-10 C18:1 y ácidos grasos saturados. Sin embargo, conviene destacar que este ensayo se desarrolló bajo condiciones experimentales muy controladas, de forma que un cambio en la calidad del pasto podría modificar considerablemente el perfil lipídico de la leche. Además persiste el rendimiento lechero limitado, característico de este tipo de alimentación. Por dichos motivos, el objetivo de la siguiente experiencia sería el diseño de una dieta destinada a granjas de producción en régimen intensivo, que proporcione una grasa láctea de similares o mejores características nutricionales que la lograda por el sistema extensivo descrito en el presente apartado.

4.6. COMPLEMENTACIÓN DE LA DIETA OVINA CON SEMILLA EXTRUSIONADA DE LINO

Dos cuestiones fundamentales que se consideraron en la siguiente estrategia nutricional, para no afectar negativamente el perfil de ácidos grasos de la leche, fueron la composición de la dieta base y la naturaleza fisico-química del suplemento lipídico. De los ensayos anteriores se confirmó que dietas ricas en concentrado y suplementadas con niveles elevados de aceite podían conducir a cambios en las condiciones ruminales, que favorecían el aumento en grasa láctea de ácidos grasos no deseables. Por tales motivos, los parámetros experimentales del presente trabajo se modificaron sustancialmente respecto a los anteriores. La cantidad de forraje de la dieta basal se aumentó hasta alcanzar una proporción forraje:concentrado de 60:40. Las raciones se complementaron además con distintas proporciones de semilla de lino, 6% (LEL) y 12% (HEL), que se correspondían con unos contenidos en grasa aproximados de 2,5% y 5%, respectivamente. Este sustrato lipídico es rico en ácido α -linolénico, precursor de VA en el rumen, pero presenta niveles bajos de ácido linoleico. Por último, estas semillas se presentaron en la dieta en forma extrusionada, con objeto de hacer más accesibles los PUFA a los microorganismos presentes en la cavidad ruminal.

La presencia de semilla de lino en la dieta provocó un aumento significativo en la producción de leche, debido al mayor contenido energético de las raciones, y en el rendimiento de grasa, proteína, lactosa y sólidos totales (Tabla 2, página 136). Sin embargo este suplemento no modificó la composición de la leche ni originó el síndrome MFD.

Como se observó en la mayoría de experimentos anteriores, la incorporación de un suplemento lipídico de origen vegetal en las raciones redujo considerablemente la concentración de ácidos grasos originados por la síntesis *de novo* en la glándula mamaria. Este hecho repercutió de forma directa en la disminución del IA de la leche procedente de dietas suplementadas (Tabla 3, página 138). Aunque la adición de un 6% de semilla extrusionada de lino proporcionó un IA comparable a la alimentación con pasto (Tabla 4, página 124), la ración HEL (12%) mejoró notablemente dicho índice. Por otra parte la dieta control (forraje:concentrado 60:40) redujo el IA en un 34%,

respecto a la ración con una relación forraje:concentrado 20:80, una respuesta favorable desde el punto de vista de la salud cardiovascular.

La suplementación de la dieta con un 12% de semilla de lino multiplicó por cinco la concentración de ácido α -linolénico y disminuyó sustancialmente la relación omega-6:omega-3 en grasa láctea (Tabla 3, página 138), lo que reviste gran importancia desde el punto de vista nutricional (Simopoulos, 2008). Los niveles de ácido α -linolénico se encontraron entre los más altos documentados en la bibliografía (Fuentes, 2009) y fueron muy superiores a los disponibles para ganado ovino alimentado con raciones suplementadas con semilla de lino no extrusionada (Zhang *et al.*, 2006 y Luna *et al.*, 2008a).

La forma de presentación del suplemento lipídico en la dieta podría jugar un papel relevante y no debería ser ajena a estos resultados. La ruptura física de las semillas por extrusión incrementó los niveles de ácido α -linolénico en leche de vaca (Akraim *et al.*, 2007; Chilliard *et al.*, 2009) y oveja (Mele *et al.*, 2007). Esta estrategia nutricional aumentó la disponibilidad de dicho ácido graso omega-3 de cadena corta en el rumen (Doreau *et al.*, 2009), por lo que sería absorbido en mayor cantidad en el tracto digestivo y posteriormente incorporado, también en mayor proporción, a la grasa de leche. Además, la semilla de lino en forma extrusionada facilitaría el acceso del ácido α -linolénico a los microorganismos ruminales. Este argumento justificaría que los intermediarios principales de biohidrogenación del *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 también aumentarían significativamente en la grasa láctea procedente de las raciones suplementadas (LEL y HEL). Entre todos ellos destaca el VA, que triplicó su concentración con la dieta HEL (Tabla 3, página 137) y que sería el responsable del aumento de RA por síntesis endógena en la glándula mamaria (Bauman *et al.*, 2006).

Un resultado muy positivo de esta experiencia es que los niveles de *trans*-10 C18:1 no se modificaron con la adición de semilla de lino a las raciones (Tabla 3, página 137), a diferencia de lo que se observa normalmente con dietas que presentan relaciones bajas de forraje:concentrado y suplementos enriquecidos en ácido linoleico (Hervás *et al.*, 2008) así como en las experiencias de oliva, soja y pescado de esta Tesis (apartados 4.1, 4.2 y 4.3). Las bajas concentraciones de *trans*-10 C18:1 y del ácido *trans*-9, *cis*-11 C18:2 serían indicativas de que las dietas ensayadas no afectarían

negativamente al medio ambiente ruminal. Estos resultados evidencian también la importancia de la composición de la dieta base en la calidad nutricional de la grasa láctea, un aspecto que debería ser considerado con cuidado en las explotaciones ganaderas.

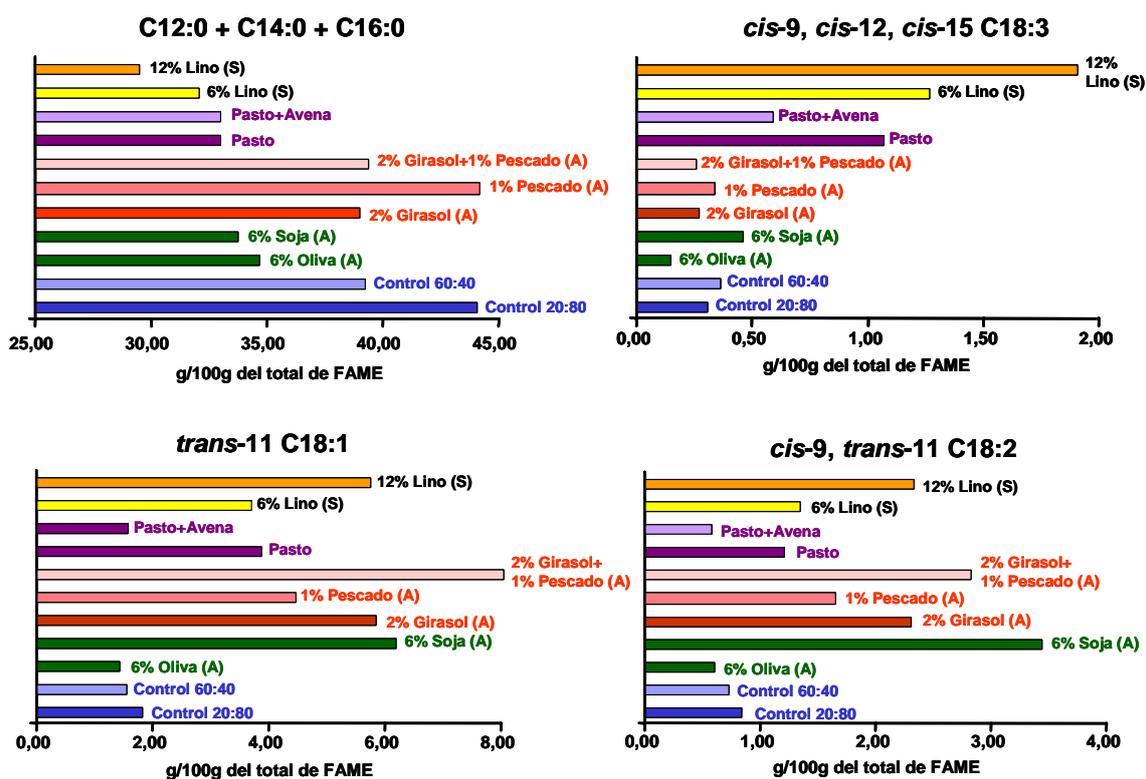
La sostenibilidad de la respuesta a este tipo de dietas representó además un valor añadido. El perfil de ácidos grasos de la leche, se mantuvo estable durante el transcurso del período experimental (dos meses) y, además, los animales que seguían los tratamientos LEL y HEL aumentaron su producción lechera. En resumen, la suplementación con semilla extrusionada de lino resultó ser una estrategia nutricional y productiva mucho más eficaz, para incrementar de forma natural los ácidos grasos potencialmente beneficiosos para la salud humana, que los sistemas ganaderos en régimen extensivo. Los ácidos grasos saturados, con potencial incidencia negativa en riesgos cardiovasculares, disminuyeron entre un 15 y un 30%, mientras que los contenidos de VA/RA y omega-3 de cadena corta se multiplicaron por más de 3 y 5, respectivamente. Respecto a *trans*-10 C18:1, sus niveles se mantuvieron bajos y estables durante todo el período experimental (Figura 2, página 140). Todos estos resultados ponen de manifiesto que el pienso diseñado en este trabajo supone un gran avance, desde el punto de vista de la alimentación animal, en la obtención de una grasa láctea más saludable.

4.7. ESTUDIO DE QUESOS ELABORADOS A PARTIR DE LECHE CON UN PERFIL EN ACIDOS GRASOS SALUDABLE

La leche que presentó de forma natural un perfil en ácidos grasos más saludable se empleó en la fabricación de quesos. En la Figura 4.7 se muestra el efecto de las distintas estrategias de alimentación sobre el contenido de los ácidos grasos con más relevancia desde el punto de vista nutricional (saturados, *trans*-10 C18:1, VA, RA y α -linolénico) en grasa láctea ovina. Los ácidos grasos calificados como hipercolesterolémicos (C12:0, C14:0, C16:0) fueron reducidos en distinto grado mediante la suplementación con aceites o semillas vegetales. Sin embargo sólo el empleo de semilla de lino proporcionó niveles destacados, desde una perspectiva

nutricional, del ácido α -linolénico (Figura 4.7). Atendiendo a ambos resultados, la incorporación de semilla extrusionada de lino en una dieta con una relación forraje:concentrado de 60:40, parecería la opción idónea para mejorar las características nutricionales de la grasa de leche.

Figura 4.7: Concentración (g/100g de ácidos grasos totales) de los ácidos C12:0+C14:0+C16:0, α -linolénico, VA y RA en grasa láctea de oveja procedente del conjunto de experiencias ensayadas en esta memoria. (S = semilla, A = aceite).



Además los contenidos del isómero mayoritario de CLA, el *cis-9, trans-11* C18:2, y su precursor fisiológico, VA, se triplicaron al añadir un 12% de semilla de lino a las raciones. Aunque el empleo de otras dietas (6% de aceite de soja o la combinación de 2% de aceite de girasol con 1% de aceite de pescado) proporcionó concentraciones más elevadas de RA, también multiplicó en leche la concentración de *trans-10* C18:1 (Figura 4.4, página 171). El empleo de semilla de lino, sin embargo, no incrementó los niveles de dicho isómero *trans* C18:1 en grasa láctea. Éstos se mantuvieron estables durante los 2 meses del período experimental y con valores en torno al 0,5% del total de ácidos grasos (Figura 4.4, página 171).

El queso tipo Manchego elaborado a partir de leche enriquecida en CLA y omega-3 de cadena corta, presentó un perfil de ácidos grasos similar al de la materia prima de partida, resultado coincidente con experiencias previas en quesos de leche de oveja (Nudda *et al.*, 2005; Luna *et al.*, 2005d y 2008b). Según las recomendaciones de la *European Food Safety Authority* (EFSA, 2005), un producto etiquetado como “Fuente de ácidos grasos omega-3” debe contener más del 15% de las cantidades diarias recomendadas de ácidos grasos omega-3 por cada 100 g de producto. Por otra parte, si las concentraciones de dichos ácidos grasos superan el 30%, el alimento puede ser considerado como “Rico en ácidos grasos omega-3”. Dado que la ingesta recomendada de ácidos grasos omega-3 es de 2 g/día para adultos (EFSA, 2005) y que el contenido en grasa del queso Manchego fue alrededor de 39,5%, los quesos fabricados con la leche procedente de las dietas LEL y HEL podrían presentarse a la *Agencia Española de Seguridad de los Alimentos y Nutrición* (ASEAN) y a la EFSA para la alegación de “Fuente de” y “Rico en” ácidos grasos omega-3, respectivamente.

Por último, se llevó a cabo un análisis sensorial de los quesos tipo Manchego (Control, LEL y HEL), no detectándose diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados (Tabla 5, página 142). La aceptabilidad de los quesos que presentaban concentraciones elevadas de CLA y PUFA omega-3 de cadena corta no difirió de los procedentes de la leche sin suplementar, por lo que la presencia de los niveles citados de dichos ácidos grasos no afectaría negativamente a las propiedades organolépticas de este alimento, confirmando resultados de experiencias anteriores (Luna *et al.*, 2005d y 2008a).

La composición del pienso que proporcionó de forma natural una grasa láctea con propiedades saludables y que se empleó en la fabricación de un alimento enriquecido en ácidos grasos omega-3, ha dado lugar a una patente licenciada con la empresa LODYN S.L. que está en vías de explotación (Anexo I, página 221). Además, al artículo correspondiente al trabajo de suplementación de la dieta ovina con semilla de lino se le ha concedido el *Premio Internacional Hipócrates 2009 de Investigación Médica sobre Nutrición Humana* (Anexo II, página 229).

4.8. CARACTERIZACIÓN DE INTERMEDIARIOS DE LA RUTA DE BIOHIDROGENACIÓN DEL ÁCIDO α -LINOLÉNICO

La alimentación a base de pasto fresco y la suplementación de la dieta de rumiantes con semilla de lino, además de mejorar el perfil lipídico, incrementó de forma considerable la concentración de la mayoría de los intermediarios conocidos de biohidrogenación del ácido α -linolénico en grasa láctea (Figura 1.4, página 15). En ambas experiencias se detectó también por GC-FID e inmediatamente después de la zona de elución de CLA, un pico cromatográfico que no había sido identificado con anterioridad (Figura 1, página 153). El ácido graso sin caracterizar aumentó únicamente en muestras de leche procedente de dietas enriquecidas en ácido α -linolénico (Pasto, LEL y HEL). Este hecho sugirió que podía tratarse de un producto desconocido de la biohidrogenación del ácido *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 de la dieta.

A pesar de que los contenidos de este ácido graso fueron bajos con la alimentación exclusiva a base de pasto y la dieta suplementada con semilla de lino al 6%, cercanos al 0,05% del total de ácidos grasos, con la ración suplementada con un 12% de semilla de lino se llegó a alcanzar un 0,21%. Los niveles del ácido graso desconocido aumentaron en proporciones similares al RLnA (Figura 3, página 155), una evidencia de que el metabolismo de ambos podría estar relacionado. Trabajos recientes han reportado subidas notables en los niveles de RLnA en la leche de rumiantes alimentados con semilla extrusionada de lino (Akraim *et al.*, 2007) o pasto (Plourde *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta la fecha no se ha documentado la presencia de otros intermediarios C18:3 en la biohidrogenación del ácido α -linolénico.

El estudio detallado por GC-MS de los ésteres metílicos permitió catalogar al pico desconocido, por presentar el ión molecular $m/z = 292$, como un ácido graso de 18 átomos de carbono y tres insaturaciones. La determinación de la posición de los dobles enlaces dentro de la molécula se llevó a cabo por conversión de los FAME a DMOX y ésteres de picolinilo. Estos derivados se fragmentan en la cámara de ionización del detector de masas dando lugar a iones que son característicos de los isómeros posicionales. La presencia de dos iones intensos a $m/z = 262$ (espectro DMOX) (Figura 4, página 155) y $m/z = 300$ (espectro de ésteres de picolinilo) fue indicativa de una estructura con dobles enlaces en posiciones 11 y 15. Además se observó una gran

similitud entre los espectros de masas del C18:3 sin identificar, el del RLnA de las muestras analizadas en nuestro laboratorio y los de aquellos descritos en la bibliografía para los derivados DMOX (Plourde *et al.*, 2007) y los ésteres de picolinilo (Destailats *et al.*, 2005) de RLnA. Estos resultados indicarían que el ácido graso objeto de estudio podría ser un isómero geométrico del RLnA y en tal caso, los dobles enlaces se localizarían en las posiciones 9, 11 y 15.

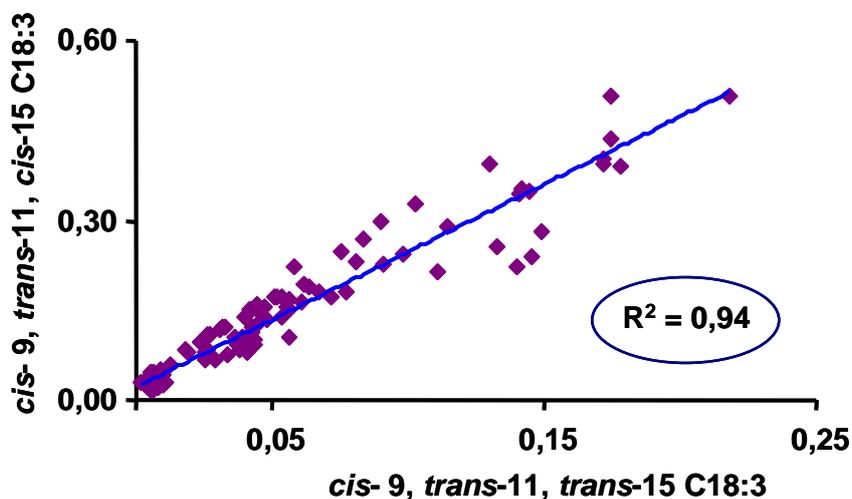
Finalmente, con el propósito de confirmar la estructura posicional y tratar de elucidar la configuración geométrica de los dobles enlaces, se llevó a cabo el análisis de los FAME presentes en grasa de leche por CACI-MS/MS. Dicha técnica, como se expuso en el apartado 1.6.2c, podría resultar una herramienta muy útil para la caracterización de los ácidos grasos. Los espectros de masas CACI-MS/MS del pico desconocido y del RLnA se muestran en la Figura 6 (página 156). La presencia de tres iones de diagnóstico con $m/z = 190$, 264 y 318 en ambas estructuras confirmó los resultados obtenidos por GC-MS, esto es, la presencia de insaturaciones en los carbonos 9, 11 y 15. Por otra parte, el cociente de intensidades de los iones α y ω del ácido graso desconocido (Figura 6B, página 156) es consistente con la estructura *cis*-9, *trans*-11 del RA, cuyo espectro de masas CACI-MS/MS presenta una mayor intensidad para el ión α ($m/z = 264$) que para el ω ($m/z = 192$) (Figura 2B, página 154). Además, la intensidad del ión $m/z = 318$ resultó ser menor para el C18:3 desconocido que para el RLnA (Figura 6, página 156). Este hecho, unido al orden de elución cromatográfico, reveló que el doble enlace en posición 15 poseería configuración *trans*, por lo que la estructura final del ácido graso se asignó a la configuración *cis*-9, *trans*-11, *trans*-15 C18:3.

Un segundo pico no identificado se detectó en la zona de elución de los ácidos grasos C18:2 no-conjugados. De todos ellos, el *trans*-11, *cis*-15 C18:2 es el único intermediario reconocido de la biohidrogenación ruminal del ácido α -linolénico (Harfoot y Hazlewood, 1997) y no existen evidencias científicas que relacionen su metabolismo con otros isómeros C18:2 no-conjugados. Los espectros de masas CACI-MS/MS de este segundo pico desconocido y del *trans*-11, *cis*-15 C18:2 mostraron patrones similares de fragmentación (Figura 9, página 158). En ambos se detectaron los iones de diagnóstico α ($m/z = 320$) y ω ($m/z = 164$), además de un tercer ión derivado de la fragmentación interna del doble enlace ($m/z = 292$). Estos resultados avalan una configuración posicional 11-15. Aunque mediante CACI-MS/MS no fue posible

confirmar la geometría de los dobles enlaces, y la estructura *cis-trans* no debería ser completamente descartada, la diferencia de los tiempos de retención entre el C18:2 desconocido ($t_r = 61.8$ min) y el *trans-11 cis-15* C18:2 ($t_r = 67.5$ min) indicaría una potencial configuración *trans-trans*. En los últimos años algunos trabajos han reportado la presencia del isómero *trans-11, trans-15* C18:2 en líquido ruminal (Shingfield *et al.*, 2008b) y grasa láctea (Shingfield *et al.*, 2006), hecho que podría justificar su existencia en este estudio.

El hallazgo de *cis-9, trans-11, trans-15* C18:3 y *trans-11, trans-15* C18:2 en grasa láctea de ovejas alimentadas con pasto y semilla de lino, indica que estos ácidos grasos podrían estar involucrados en el metabolismo ruminal del ácido α -linolénico. La estrecha correlación encontrada entre el RLnA y el *cis-9, trans-11, trans-15* C18:3 (Figura 4.8) refuerza la idea de la existencia de un precursor común para ambos ácidos grasos.

Figura 4.8: Regresión lineal entre los contenidos de los ácidos grasos RLnA y *cis-9, trans-11, trans-15* C18:3 (g/100 g de ácidos grasos totales).



* Para llevar a cabo este análisis se consideraron 144 muestras de leche de oveja, procedentes de los ensayos con pasto y semilla extrusionada de lino.

La Figura 8 (página 157) muestra la potencial ruta alternativa de estos intermediarios. Una vez formado el RLnA, a partir de ácido α -linolénico, el doble enlace en posición 15 podría ser isomerizado a *trans*-15 por enzimas de los microorganismos presentes en el tracto digestivo. Esta etapa proseguiría con una primera hidrogenación del enlace *cis*-9 para formar *trans*-11, *trans*-15 C18:2, y una segunda que podría dar lugar a *trans*-15 C18:1 o VA. Finalmente, la formación de ácido esteárico a partir de VA sería idéntica a la descrita para la ruta convencional de biohidrogenación del ácido α -linolénico (Figura 8, página 157).

En definitiva, la presencia de los ácidos grasos *cis*-9, *trans*-11, *trans*-15 C18:3 y *trans*-11, *trans*-15 C18:2 en grasa de leche ovina, como resultado de una alimentación enriquecida en ácido α -linolénico, se utilizó como punto de partida para postular una ruta de biohidrogenación alternativa para el ácido graso *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios que permitan esclarecer el metabolismo ruminal del ácido α -linolénico y otros intermediarios producidos durante su biohidrogenación, principalmente el origen de distintos isómeros de CLA.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. La suplementación de la dieta de ganado ovino con fuentes lipídicas ricas en ácidos grasos insaturados provoca una disminución significativa en leche del contenido de ácidos grasos saturados de menos de 18 átomos de carbono. Este descenso podría ser atribuido, tanto a un efecto de dilución provocado por la entrada en la glándula mamaria de un gran número de ácidos grasos de 18 átomos de carbono procedentes del torrente sanguíneo, como al efecto inhibitorio que alguno de estos ácidos grasos provenientes de la dieta o generados en el rumen, ejercerían sobre las vías metabólicas implicadas en la lipogénesis y la síntesis de ácidos grasos *de novo*.

2. Las raciones de ganado ovino que presentan una baja relación forraje:concentrado (20:80) y se suplementan con niveles altos (6%) de aceites vegetales ricos en los ácidos oleico y linoleico, provocan alteraciones en el metabolismo lipídico. Estas dietas modifican el perfil de ácidos grasos *trans* monoinsaturados, con aumentos destacables de *trans*-10 C18:1, así como de *trans*-9 *cis*-11 C18:2 en la grasa láctea. Sin embargo dichas raciones no afectan negativamente al rendimiento productivo del ganado, ni generan el síndrome de depresión de grasa en leche, lo que sugiere posibles diferencias entre el metabolismo lipídico del ganado bovino y ovino.

3. El aumento de distintos isómeros *trans* C18:1 observado en leche de ovejas alimentadas con dietas suplementadas con aceite de oliva es una evidencia de que las vías de biohidrogenación del ácido oleico, durante su paso por el tracto digestivo, implican distintas reacciones de isomerización.

4. La depresión de grasa en leche, observada en dietas suplementadas con aceite de pescado, podría justificarse atendiendo al potencial efecto inhibitorio de los ácidos grasos *trans*-10 C18:1 y *trans*-9 *cis*-11 CLA –que aumentaron con

dicho suplemento-, a la disminución de la síntesis *de novo* de ácidos grasos saturados de cadena corta y media, así como al descenso en la generación de ácido esteárico en el rumen, con la consiguiente caída en la producción de ácido oleico en la glándula mamaría.

5. Los aumentos de *trans*-10, *cis*-12 C18:2 en grasa láctea ovina están condicionados por la suplementación de niveles elevados de ácido linoleico a la dieta y no dependen de la relación forraje:concentrado de las raciones.

6. El enriquecimiento natural de leche ovina en ácidos grasos omega-3 de cadena larga (EPA, DPA y DHA), mediante suplementación de la dieta con una fuente lipídica rica en dichos componentes, es una estrategia que ofrece escasa rentabilidad debido a la baja eficiencia de transferencia de estos componentes desde la dieta a la grasa láctea.

7. La alimentación del ganado ovino con pasto fresco disminuye el rendimiento productivo pero mejora las características nutricionales de la grasa láctea. El mantenimiento de niveles elevados de VA y RA, sin aumentos significativos en *trans*-10 C18:1, hace aconsejable el empleo de dietas ricas en forraje con un bajo nivel de concentrado.

8. La adición de un 12% de semilla extrusionada de lino a la dieta ovina con una relación forraje:concentrado 60:40 es, de todas las prácticas ganaderas ensayadas, la mejor estrategia para mejorar el perfil nutricional de los ácidos grasos de la leche. Dicha ración aumenta de forma destacada los contenidos de VA, RA y ácido α -linolénico, disminuye los ácidos grasos saturados y mantiene bajos y estables los niveles de *trans*-10 C18:1 en la grasa de leche, todo ello sin un descenso del rendimiento productivo. La sostenibilidad de la respuesta a este tipo de dieta para los citados ácidos grasos implicaría una estabilidad del metabolismo lipídico, incluidas las vías de biohidrogenación.

9. El proceso de fabricación y maduración de queso tipo Manchego, elaborado con leche enriquecida en ácido α -linolénico y CLA, no modifica el perfil lipídico ni las características organolépticas de este producto, que podría acceder a la alegación nutricional “*Rico en Acidos Grasos Omega-3*”.

10. La presencia de los ácidos grasos identificados en este trabajo *cis-9*, *trans-11*, *trans-15 C18:3* y *trans-11*, *trans-15 C18:2*, en grasa láctea de ovejas alimentadas con pasto y semilla de lino, es una evidencia de que ambos están involucrados en el metabolismo ruminal del ácido α -linolénico.

11. La administración de grasa láctea con niveles altos de ácido *trans-10 C18:1* (más del 20% del total de ácidos grasos) no induce toxicidad aguda en modelos animales. Sin embargo la presencia de cantidades elevadas de este ácido graso resulta negativa desde el punto de vista cardiovascular, puesto que favorece el aumento de triglicéridos en el plasma. Por el contrario, una grasa láctea enriquecida en VA+RA, protegería de la trigliceridemia en animales de experimentación.

6. Bibliografía

- AbuGhazaleh A.A., Schingoethe D.J., Hippen A.R., Kalscheur K.F. 2003. Milk conjugated linoleic acid response to fish oil supplementation of diets differing in fatty acid profiles. *Journal of Dairy Science* 86:944-953.
- AbuGhazaleh A.A., Jenkins T.C. 2004. Short Communication: Docosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *Journal of Dairy Science* 87:1047-1050.
- AbuGhazaleh A.A., Felton D.O., Ibrahim S.A. 2007. Milk conjugated linoleic acid response to fish oil and sunflower oil supplementation to dairy cows managed under two feeding systems. *Journal of Dairy Science* 90:4763-4769.
- AbuGhazaleh A.A., Potu R.B., Ibrahim S. 2009. Short Communication: The effect of substituting fish oil in dairy cow diets with docosahexaenoic acid-micro algae on milk composition and fatty acids profile. *Journal of Dairy Science* 92: 6156-6159.
- Addis M., Cabiddu A., Pinna G., Decandia M., Piredda G., Pirisi A., Molle G. 2005. Milk and cheese fatty acid composition in sheep fed mediterranean forages with reference to conjugated linoleic acid *cis*-9, *trans*-11. *Journal of Dairy Science* 88:3443-3454.
- Adlof R.O. 1997. Normal-phase separation effects with lipids on a silver ion high-performance liquid chromatography column. *Journal of Chromatography A* 764:337-340.
- Ahren B., Mari A., Fyfe C.L., Tsofliou F., Sneddon A.A., Wahle K.W., Winzell M.S., Pacini G., Williams L.M. 2009. Effects of conjugated linoleic acid plus n-3 polyunsaturated fatty acids on insulin secretion and estimated insulin sensitivity in men. *European Journal of Clinical Nutrition* 63:778-786.
- Akraim F., Nicot M.C., Juaneda P., Enjalbert F. 2007. Conjugated linolenic acid (CLnA), conjugated linoleic acid (CLA) and other biohydrogenation intermediates in plasma and milk fat of cows fed raw or extruded linseed. *Animal* 1:835-843.
- Allred S.L., Dhiman T.R., Brennand C.P., Khanal R.C., McMahon D.J., Luchini N.D. 2006. Milk and cheese from cows fed calcium salts of palm and fish oil alone or in combination with soybean products. *Journal of Dairy Science* 89:234-248.
- Alonso L., Fontecha J., Lozada L., Fraga M.J., Juárez M. 1999. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and *trans* fatty acids. *Journal of Dairy Science* 82: 878-884.
- Amarù D.L., Field C.J. 2009. Conjugated linoleic acid decreases MCF-7 human breast cancer cell growth and insulin-like growth factor-1 receptor levels. *Lipids* 44:449-458.
- Antongiovanni M., Mele M. Buccioni A., Petacchi F., Serra A., Melis M.P., Cordeddu L., Banni S., Secchiari P. 2004. Effect of forage/concentrate ratio and oil supplementation on C18:1 and CLA isomers in milk fat from Sarda ewes. *Journal of Animal and Feed Sciences* 13:669-672.
- Aranceta J. Serra L. 2005. *Leche, lácteos y salud*. Editor: Puleva Food, Fundación Puleva. España.
- Aryaeian N., Shahram F., Djalali M., Eshragian M.R., Djazayeri A., Sarrafnejad A., Salimzadeh A., Naderi N., Maryam C. 2009. Effect of conjugated linoleic acids, vitamin E and their combination on the clinical outcome of Iranian adults with active rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases* 12:20-28.
- Azizian H., Kramer J.K.G. 2006. Application of FT-NIR for rapid determination of the *trans* fatty acid composition in fats and oils. *Lipid Analysis and Lipidomics*, pp. 303-334. Editores: M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, J.T. Brenna y R.E. McDonald. AOCS Press, Estados Unidos.
- Baer R.J., Ryali J., Schingoethe D.J., Kasperson K.M., Donovan D.C., Hippen A.R., Franklin S.T. 2001. Composition and properties of milk and butter from cows fed fish oil. *Journal of Dairy Science* 84:345-353.

- Banu J., Bhattacharya A., Rahman M., Fernandes G. 2008. Beneficial effects of conjugated linoleic acid and exercise on bone of middle-aged female mice. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 26:436-445.
- Barber M.C., Clegg R.A., Travers M.T., Vernon R.G. 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochimica and Biophysica Acta* 1347:101-126.
- Bargo F., Muller L.D., Kolver E.S., Delahoy J.E. 2003. Invited review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science* 86:1-42.
- Bauchart D., Roy A., Lorenz S., Chardigny J.M., Ferlay A., Gruffat D., Sébédio J.L., Chilliard Y., Durand D. 2007. Butters varying in *trans* 18:1 and *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid modify plasma lipoproteins in the hypercholesterolemic rabbit. *Lipids* 42:123-133.
- Bauman D.E., Baumgard L.H., Corl B.A., Griinari J.M. 2001. Conjugated Linoleic Acid (CLA) and the dairy cow. *Recent Advances in Animal Nutrition: pp. 221-250*. Editores: J. Garnsworthy y J. Wiseman. Nottingham University Press, Reino Unido.
- Bauman D.E., Corl B.A., Peterson D.G. 2003. The biology of conjugated linoleic acids in ruminants. *Advances in CLA Research, Volumen 2: pp. 146-173*. Editores: J.L. Sebedio, W.W. Christie, R. Adlof. AOCS Press, Estados Unidos.
- Bauman D.E., Lock A.L. 2006. Conjugated Linoleic Acid: biosynthesis and nutritional significance. *Advanced Dairy Chemistry, Volumen 2: pp. 93-136*. *Lipids*, 3^ª edición. Editores: P.F. Fox y P.L.H. McSweeney, Springer, Estados Unidos.
- Bauman D.E., Mather I.H., Wall R.J., Lock A.L. 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science* 89:1235-1243.
- Baumgard L.H., Corl B.A., Dwyer D.A., Sæbø A., Bauman D.E. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 278:179-184.
- Baumgard L.H., Matitashvili E., Corl B.A., Dwyer D.A., Bauman D.E. 2002. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85:2155-2163.
- Blankson H., Stakkestad J.A., Fagertun H., Thom E., Wadstein J., Gudmundsen O. 2000. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *Journal of Nutrition* 130:2943-2948.
- Bligh E.G., Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917.
- Boufaïed H., Chouinard P.Y., Tremblay G.F., Petit H.V., Michaud R., Bélanger G. 2003. Fatty acids in forages II. In vitro ruminal biohydrogenation of linolenic and linoleic acids from timothy. *Canadian Journal of Animal Science* 83:513-522.
- Brenna J.T. 2005. Double bond localization in fatty acid methyl esters by covalent adduct chemical ionization (CACI) tandem mass spectrometry. *Lipid Technology* 17:229-232.
- Brownbill R.A., Petrosian M., Ilich J.Z. 2005. Association between dietary conjugated linoleic acid and bone mineral density in postmenopausal women. *Journal of the American College of Nutrition* 24:177-181.
- Cabiddu A., Decandia M., Addis M., Piredda G., Pirisi A., Molle G. 2005. Managing Mediterranean pastures in order to enhance the level of beneficial fatty acids in sheep milk. *Small Ruminant Research* 59:169-180.

Castañeda-Gutiérrez E., De Veth M.J., Lock A.L., Dwyer D.A., Murphy K.D., Bauman D.E. 2007. Effect of supplementation with calcium salts of fish oil on n-3 fatty acids in milk fat. *Journal of Dairy Science* 90:4149-4156.

CE N° 1924/2006. Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de Diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. DOCE n° L12/18, de 18 de Diciembre de 2006.

Cesano A., Visonneau S., Scimeca J.A., Kritchevsky D., Santoli D. 1998. Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Research* 18:1429-1434.

Changhua L., Jindong Y., Defa L., Lidan Z., Shiyan Q., Jianjun X. 2005. Conjugated linoleic acid attenuates the production and gene expression of proinflammatory cytokines in weaned pigs challenged with lipopolysaccharide. *Journal of Nutrition* 135:239-244.

Chardigny J.M., Destailats F., Malpuech-Brugère C., Moulin J., Bauman D.E., Lock A.L., Barbano D.M., Mensink R.P., Bezelgues J.B., Chaumont P., Combe N., Cristiani I., Joffre F., German J.B., Dionisi F., Boirie Y., Sébédio J.L. 2008. Do *trans* fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the *trans* Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study. *American Journal of Clinical Nutrition* 87:558-566.

Chen S.C., Kritchevsky D., Baer D.J. 2007. *Trans* fatty acid effects on cardiovascular disease: animal and human studies. *Trans Fats in Foods*. Editores: G.R. List, D. Kritchevsky y N. Ratnayake. AOCS Press, Estados Unidos.

Cheng W.L., Lii C.K., Chen H.W., Lin T.H., Liu K.L. 2004. Contribution of Conjugated Linoleic Acid to the Suppression of Inflammatory Responses through the Regulation of the NF- κ B Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:71-78.

Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M., Doreau M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. *Annals of Zootechnics* 49:181-205.

Chilliard Y., Ferlay A., Doreau M. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Production Science* 70:31-48.

Chilliard Y., Ferlay A., Rouel J., Lamberet G. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science* 86:1751-1770.

Chilliard Y., Ferlay A. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development* 44:467-492.

Chilliard Y., Glasser F., Ferlay A., Bernard L., Rouel J., Doreau M. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109:828-855.

Chilliard Y., Martin C., Rouel J., Doreau M. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *Journal of Dairy Science* 92:5199-5211.

Choi J.S., Jung M.H., Park H.S., Song J. 2004. Effect of conjugated linoleic acid isomers on insulin resistance and mRNA levels of genes regulating energy metabolism in high-fat-fed rats. *Nutrition* 20:1008-1017.

Chouinard P.Y., Girard V., Brisson G.J. 1997. Performance and profiles of milk fatty acids of cows fed full fat, heat-treated soybeans using various processing methods. *Journal of Dairy Science* 80:334-342.

Chouinard P.Y., Corneau L., Butler W.R., Chilliard Y., Drackley J.K., Bauman D.E. 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *Journal of Dairy Science* 84:680-690.

Christie W.W. 1982. *Lipid Analysis*. Pergamon Press, Reino Unido.

Chujo H., Yamasaki M., Nou S., Koyanagi N., Tachibana H., Yamada K. 2003. Effect of conjugated linoleic acid isomers on growth factor-induced proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Letters* 202:81-87.

Cohen L.A., Zhao Z., Pittman B., Scimeca J. 2003. Effect of soy protein isolate and conjugated linoleic acid on the growth of dunning R-3327-AT-1 rat prostate tumors. *Prostate* 54:169-180.

Collomb M., Sieber R., Bütikofer U. 2004. CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids* 39:355-364.

Collomb M., Schmid A., Sieber R., Wechsler D., Ryhänen E.L. 2006. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *International Dairy Journal* 16:1347-1361.

Corino C., Pastorelli G., Rosi F., Bontempo V., Rossi R. 2009. Effect of dietary conjugated linoleic acid supplementation in sows on performance and immunoglobulin concentration in piglets. *Journal of Animal Science* 87:2299-2305.

Corl B.A., Baumgard L.H., Griinari J.M., Delmonte P., Morehouse K.M., Yurawecz M.P., Bauman D.E. 2002. *Trans*-7, *cis*-9 CLA is synthesized endogenously by Δ 9-desaturase in dairy cows *Lipids* 37:681-688.

Cruz-Hernández C., Deng Z., Zhou J., Hill A.R., Yurawecz M.P., Delmonte P., Mossoba M.M., Dugan M.E.R., Kramer J.K.G. 2004. Methods for analysis of conjugated linoleic acids and *trans*-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 87:545-562.

Cruz-Hernández C., Kramer J.K.G., Kraft J., Santercole V., Or-Rashid M., Deng Z., Dugan M.E.R., Delmonte P., Yurawecz M.P. 2006. Systematic analysis of *trans* and conjugated linoleic acids in the milk and meat of ruminants. *Advances in CLA Research, Volumen 3: pp. 45-93*. Editores: M.P. Yurawecz, J.K.G. Kramer, O. Gudmundsen, M.W. Pariza y S. Banni. AOCS Press, Estados Unidos.

Cruz-Hernández C., Kramer J.K.G., Kennelly J.J., Glimm D.R., Sorensen B.M., Okine E.K., Goonewardene L.A., Weselake R.J. 2007. Evaluating the conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in milk fat of dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. *Journal of Dairy Science* 90:3786-3801.

Cusack S., Jewell C., Cashman K.D. 2005. The effect of conjugated linoleic acid on the viability and metabolism of human osteoblast-like cells. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 72:29-39.

Dabadie H., Peuchant E., Bernard M., Leruyet P., Mendy F. 2005. Moderate intake of myristic acid in *sn*-2 position has beneficial lipidic effects and enhances DHA of cholesteryl esters in an interventional study. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16:375-382.

Daniel Z.C.T.R., Wynn R.J., Salter A.M., BATTERY P.J. 2004. Differing effects of forage and concentrate diets on the oleic acid and conjugated linoleic acid content of sheep tissues: the role of stearoyl-CoA desaturase. *Journal of Animal Science* 82:747-758.

Deaville E.R., Givens D.I., Blake J.S. 2004. Dietary supplements of whole linseed and vitamin E to increase levels of α -linolenic acid and vitamin E in bovine milk. *Animal Research* 53:3-12.

DeLany J.P., West D.B. 2000. Changes in body composition with conjugated linoleic acid. *Journal of the American College of Nutrition* 19:487-493.

- Delmonte P., Yurawecz M.P., Mossoba M.M., Cruz-Hernandez C., Kramer J.K.G. 2004. Improved identification of conjugated linoleic acid isomers using silver-ion HPLC separations. *Journal of AOAC International* 87:563-568.
- Delmonte P., Kataoka A., Corl B.A., Bauman D.E., Yurawecz M.P. 2005. Relative retention order of all isomers of *cis/trans* conjugated linoleic acid FAME from the 6,8- to 13,15-positions using silver ion HPLC with two elution systems. *Lipids* 40:509-514.
- Destailats F., Trottier J.P., Galvez J.M.G., Angers P. 2005. Analysis of α -linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids. *Journal of Dairy Science* 88:3231-3239.
- Dhiman T.R., Anand G.R., Satter L.D., Pariza M.W. 1999. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science* 82:2146-2156.
- Dhiman T.R., Satter L.D., Pariza M.W., Galli M.P., Allbright K., Tolosa M.X. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *Journal of Dairy Science* 83:1016-1027.
- Dhiman T.R., Nam S.H., Ure A.L. 2005. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45:463-482.
- Donovan D.C., Schingoethe D.J., Baer R.J., Ryali J., Hippen A.R., Franklin S.T. 2000. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 83:2620-2628.
- Doreau M., Laverroux S., Normand J., Chesneau G., Glasser F. 2009. Effect of linseed fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on fatty acid rumen metabolism and intestinal digestibility in cows. *Lipids* 44:53-62.
- Dubois V., Breton S., Linder M., Fanni J., Parmentier M. 2007. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109:710-732.
- Durgam V.R., Fernandes G. 1997. The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system. *Cancer Letters* 116:121-130.
- Eder K., Schleser S., Becker K., Körting R. 2003. Conjugated Linoleic Acids Lower the Release of Eicosanoids and Nitric Oxide from Human Aortic Endothelial Cells. *Journal of Nutrition* 133:4083-4089.
- EFSA. 2005. Opinión del Comité Científico de Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias relativa a la propuesta de la Comisión Europea sobre Alegaciones Nutricionales de ácidos grasos omega-3, grasa monoinsaturada, insaturada y poliinsaturada. *The EFSA Journal* 253:1-29.
- Eulitz K., Yurawecz M.P., Sehat N., Fritsche J., Roach J.A.G., Mossoba M.M., Kramer J.K.G., Adlof R.O., Ku Y. 1999. Preparation, separation, and confirmation of the eight geometrical *cis/trans* conjugated linoleic acid isomers 8, 10- through 11, 13-18:2. *Lipids* 34:873-877.
- Feng S., Lock A.L., Garnsworthy P.C. 2004. Technical Note: A rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. *Journal of Dairy Science* 87:3785-3788.
- FENIL. Campaña productos lácteos: insustituibles (2007-2010). <http://www.fenil.org/home.asp>.
- FIL-IDF. 2008. The world dairy situation. *Bulletin of the International Dairy Federation* 432.
- Flowers G., Ibrahim S.A., AbuGhazaleh A.A. 2008. Milk fatty acid composition of grazing dairy cows when supplemented with linseed oil. *Journal of Dairy Science* 91:722-730.
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226:497-509.

Fuentes M.C., Calsamiglia S., Sánchez C., González A., Newbold J.R., Santos J.E.P., Rodríguez-Alcalá L.M., Fontecha J. 2008. Effect of extruded linseed on productive and reproductive performance of lactating dairy cows. *Livestock Science* 113:144-154.

Fuentes M.C. 2009. Modificación del perfil de ácidos grasos de la leche a través de la manipulación nutricional en vacas lecheras: el papel del rumen. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Fuentes M.C., Calsamiglia S., Cardozo P.W., Vlaeminck B. 2009. Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *Journal of Dairy Science* 92:4456-4466.

Gama M.A.S., Garnsworthy P.C., Griinari J.M., Leme P.R., Rodrigues P.H.M., Souza L.W.O., Lanna D.P.D. 2008. Diet-induced milk fat depression: association with changes in milk fatty acid composition and fluidity of milk fat. *Livestock Science* 115:319-331.

García-López S., Echeverría E., Tsui I., Balch B. 1994. Changes in the content of conjugated linoleic acid (CLA) in processed cheese during processing. *Food Research International* 27:61-64.

Gaullier J.M., Halse J., Høye K., Kristiansen K., Fagertun H., Vik H., Gudmundsen O. 2004. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 year reduces body fat mass in healthy overweight humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:1118-1125.

Gaullier J.M., Halse J., Høye K., Kristiansen K., Fagertun H., Vik H., Gudmundsen O. 2005. Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans. *Journal of Nutrition* 135:778-784.

Gaullier J.M., Halse J., Høivik H.O., Syvertsen C., Nurminiemi M., Hassfeld C., Einerhand A., O'Shea M., Gudmundsen O. 2007. Six months supplementation with conjugated linoleic acid induces regional-specific fat mass decreases in overweight and obese. *British Journal of Nutrition* 97:550-560.

Gaynor P.J., Erdman R.A., Teter B.B., Sampugna J., Capuco A.V., Wald D.R., Hamosh M. 1994. Milk fat yield and composition during abomasal infusion of *cis* and *trans* octanodecenoates in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 77:157-165.

German J.B., Dillard C.J. 2006. Composition, structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46:57-92.

German J.B., Gibson R.A., Krauss R.M., Nestel P., Lamarche B., Van Staveren W.A., Steijns J.M., De Groot C.P.G.M., Lock A.L., Destailats F. 2009. A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *European Journal of Nutrition* 48:191-203.

Gnädig S., Chamba J.F., Perreard E., Chappaz S., Chardigny J.M., Rickert R., Steinhart H., Sébédio J.L. 2004. Influence of manufacturing conditions on the conjugated linoleic acid content and the isomer composition in ripened French Emmental cheese. *Journal of Dairy Research* 71:367-371.

Gonthier C., Mustafá A.F., Ouellet D.R., Chouinard P.Y., Berthiaume R., Petit H.V. 2005. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: effects on blood parameters and milk fatty acid composition. *Journal of Dairy Science* 88:748-756.

Goudjil H. 2003. Contribución al estudio de la fracción lipídica de la leche de oveja. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

Goudjil H., Fontecha J., Luna P., De la Fuente M.A., Alonso L., Juárez M. 2004. Quantitative characterization of unsaturated and *trans* fatty acids in ewe's milk fat. *Le Lait* 84:473-482.

Griinari J.M., Bauman D.E. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. *Advances in CLA Research, Volumen 1: pp. 180-200*. Editores: M.P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza y G.J. Nelson. AOCs Press, Estados Unidos.

- Griinari J.M., Corl B.A., Lacy S.H., Chouinard P.Y., Nurmela K.V.V., Bauman D.E. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta 9-desaturase. *Journal of Nutrition* 130:2285-2291.
- Griinari J.M., Bauman D.E. 2006. Milk fat depression: concepts, mechanisms and management applications. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress*: pp. 389-417. Editores: K. Sjersén, T. Hvelplund y M.O. Nielsen. Wageningen Academic Publishers, Holanda.
- Grundy S.M. 1994. Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *American Journal of Clinical Nutrition* 60:986-990.
- Gunstone F.D., Harwood J.L., Padley F.B. 1994. Dictionary section. *The lipid handbook*. Chapman & Hall, Estados Unidos.
- Ha Y.L., Grimm N.K., Pariza M.W. 1989. Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: Identification and quantification in natural and processed cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37:75 - 81.
- Harfoot C.G., Hazlewood G.P. 1997. Lipid metabolism in the rumen. *The Rumen Microbial Ecosystem*, pp.382-426. Editores: P.N. Hobson y C.S. Stewart. Blackie Academic & Professional, Reino Unido.
- Harvatine K.J., Boisclair Y.R., Bauman D.E. 2009. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal* 3:40-54.
- Hegsted D.M., McGandy R.B., Myers M.L., Stare F.J. 1965. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *American Journal of Clinical Nutrition* 17:281-295.
- Herrera J.A., Arévalo-Herrera M., Shahabuddin A.K.M., Ersheng G., Herrera S., García R.G., López-Jaramillo P. 2006. Calcium and conjugated linoleic acid reduces pregnancy-induced hypertension and decreases intracellular calcium in lymphocytes. *American Journal of Hypertension* 19:381-387.
- Hervás G., Luna P., Mantecón A.R., Castañares N., De la Fuente M.A., Juárez M., Frutos P. 2008. Effect of sunflower oil in the diet of sheep on milk production, fatty acid profile and rumen fermentation. *Journal of Dairy Research* 75:399-405.
- Hino T., Fukuda S. 2006. Biohydrogenation of linoleic and linolenic acids, and production of their conjugated isomers by *Butyrivibrio fibrisolvens*. 4th Euro Fed Lipid Congress p. 551, Madrid, España.
- Houseknecht K.L., Heuvel J.P.V., Moya-Camarena S.Y., Portocarrero C.P., Peck L.W., Nickel K.P., Belury M.A. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244:678-682.
- Huth P.J., DiRienzo D.B., Miller G.D. 2006. Major scientific advances with dairy foods in nutrition and health. *Journal of Dairy Science* 89:1207-1221.
- Imaizumi K., Hirata K., Zommara M., Sugano M., Suzuki Y. 1992. Effects of cultured milk products by Lactobacillus and Bifidobacterium species on the secretion of bile acids in hepatocytes and in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 38:343-351.
- Inoue N., Nagao K., Hirata J., Wang Y.M., Yanagita T. 2004. Conjugated linoleic acid prevents the development of essential hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323:679-684.
- Ip C., Chin S.F., Scimeca J.A., Pariza M.W. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Research* 51:6118-6124.
- ISO-IDF. 2001. Milk and milk products-Extraction methods for lipids and liposoluble compounds. International Standard ISO 14156-IDF 172:2001.

- ISO-IDF. 2002. Milk fat-Preparation of fatty acid methyl esters. International Standard ISO 15884-IDF 182:2002.
- Iwakiri Y., Sampson D.A., Allen K.G.D. 2002. Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by conjugated linoleic acid in murine macrophages. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 67:435-443.
- Jahreis G., Fritsche J., Kraft J. 1999. Species-dependent, seasonal, and dietary variation of Conjugated Linoleic Acid in milk. *Advances in CLA Research, Volumen 1: pp. 215-225*. Editores: M.P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza y G.J. Nelson. AOCS Press, Estados Unidos.
- Jaudszus A., Foerster M., Kroegel C., Wolf I., Jahreis G. 2005. *Cis-9, trans-11* CLA exerts anti-inflammatory effects in human bronchial epithelial cells and eosinophils: Comparison to *Trans-10, cis-12* CLA and to linoleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1737:111-118.
- Jaudszus A., Krokowski M., Mockel P., Darcan Y., Avagyan A., Matricardi P., Jahreis G., Hamelmann E. 2008. *Cis-9, trans-11*-conjugated linoleic acid inhibits allergic sensitization and airway inflammation via a PPAR γ -related mechanism in mice. *Journal of Nutrition* 138:1336-1342.
- Jenkins T.C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 76:3851-3863.
- Jenkins T.C., Wallace R.J., Moate P.J., Mosley E.E. 2008. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science* 86:397-412.
- Jensen R.G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science* 85:295-350.
- Jones E.L., Shingfield K.J., Konen C., Jones A.K., Lupoli B., Grandison A.S., Beever D.E., Williams C.M., Calder P.C., Yaqoob P. 2005. Chemical, physical, and sensory properties of dairy products enriched with conjugated linoleic acid. *Journal of Dairy Science* 88:2923-2937.
- Juárez M., Ramos M. 2003. Sheep/Milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences, Volumen 4: pp. 2539-2545*. Editores: H. Roginski, J.W. Fuquay y P.F. Fox. Academic Press, Reino Unido.
- Kalscheur K.F., Teter B.B., Piperova L.S., Erdman R.A. 1997. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of *trans-C_{18:1}* fatty acids and milk fat production in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 80:2104-2114.
- Kang K., Miyazaki M., Ntambi J.M., Pariza M.W. 2004. Evidence that the anti-obesity effect of conjugated linoleic acid is independent of effects on stearoyl-CoA desaturase1 expression and enzyme activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315:532-537.
- Kay J.K., Mackle T.R., Auldist M.J., Thompson N.A., Bauman D.E. 2004. Endogenous synthesis of *cis-9 trans-11* conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture fed dairy cows. *Journal of Dairy Science* 242:5686-5692.
- Kadegowda A.K.G., Piperova L.S., Erdman R.A. 2008. Principle component and multivariate analysis of milk long-chain fatty acid composition during diet-induced milk fat depression. *Journal of Dairy Science* 91:749-759.
- Kadegowda A.K.G., Bionaz M., Piperova L.S., Erdman R.A., Loor J.J. 2009. Peroxisome proliferators-activated receptor- γ activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. *Journal of Dairy Science* 92:4276-4279.
- Kellens M.J., Goderis H.L., Tobback P.P. 1986. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by a mixed culture of rumen microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering* 28:1268-1276.

- Kelly M.L., Berry J.R., Dwyer D.A., Griinari J.M., Chouinard P.Y., Van Amburgh M.E., Bauman D.E. 1998a. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *Journal of Nutrition* 128:881-885.
- Kelly M.L., Kolver E.S., Bauman D.E., Van Amburgh M.E., Muller L.D. 1998b. Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *Journal of Dairy Science* 81:1630-1636.
- Kelly O., Cusack S., Jewell C., Cashman K.D. 2003. The effect of polyunsaturated fatty acids, including conjugated linoleic acid, on calcium absorption and bone metabolism and composition in young growing rats. *British Journal of Nutrition* 90:743-750.
- Kelly O., Cashman K.D. 2004. The effect of conjugated linoleic acid on calcium absorption and bone metabolism and composition in adult ovariectomised rats. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 71:295-301.
- Kemp P., Lander D.J., Gunstone F.D. 1984. The hydrogenation of some *cis*-octadecenoic acids to stearic acid by a rumen *Fusocillus* sp. *British Journal of Nutrition* 52:165-170.
- Kepler C.R., Tove S.B. 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate delta-12-*cis*, delta-11-*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry* 242:5686-5692.
- Keys A., Anderson J.T., Grande F. 1965. Serum cholesterol response to changes in the diet. IV. Particular saturated fatty acids in the diet. *Metabolism* 14:776-787.
- Khanal R.C., Dhiman T.R. 2004. Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *Pakistan Journal Nutrition* 3:72-81.
- Khanal R.C., Olson K.C. 2004. Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat, and egg: A review. *Pakistan Journal of Nutrition* 3:82-98.
- Kim Y.J., Liu R.H., Bond D.R., Russell J.B. 2000. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Applied and Environmental Microbiology* 66:5226-5230.
- Kim Y.J., Liu R.H., Rychlik J.L., Russell J.B. 2002. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. *Journal of Applied Microbiology* 92:976-982.
- Kim K.H., Park H.S. 2003. Dietary supplementation of conjugated linoleic acid reduces colon tumor incidence in DMH-treated rats by increasing apoptosis with modulation of biomarkers. *Nutrition* 19:772-777.
- Kitessa S.M., Gulati S.K., Ashes J.R., Fleck E., Scott T.W., Nichols P.D. 2001. Utilisation of fish oil in ruminants I. Fish oil metabolism in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 89:189-199.
- Kitessa S.M., Peake D., Bencini R., Williams A.J. 2003. Fish oil metabolism in ruminants III. Transfer of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) from tuna oil into sheep's milk. *Animal Feed Science and Technology* 108:1-14.
- Klieve A.V., Hennessy D., Ouwerkerk D., Forster R.J., Mackie R.I., Attwood G.T. 2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *Journal of Applied Microbiology* 95: 621-630.
- Kobayashi T., Shimizugawa T., Osakabe T., Watanabe S., Okuyama H. 1997. A long-term feeding of sphingolipids affected the levels of plasma cholesterol and hepatic triacylglycerol but not tissue phospholipids and sphingolipids. *Nutrition Research* 17:111-114.

- Kraft J., Collomb M., Möckel P., Sieber R., Jahreis G. 2003. Differences in CLA isomer distribution of cows' milk lipids. *Lipids* 38:657-664.
- Kramer J.K.G., Fellner V., Dugan M.E.R., Sauer F.D., Mossoba M.M., Yurawecz M.P. 1997. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids* 32:1219-1228.
- Kramer J.K.G., Parodi P.W., Jensen R.G., Mossoba M.M., Yurawecz M.P., Adlof R.O. 1998. Rumenic acid: A proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. *Lipids* 33:835.
- Kramer J.K.G., Zhou J. 2001a. Conjugated linoleic acid and octadecenoic acids: Extraction and isolation of lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103:594-600.
- Kramer J.K.G., Cruz-Hernández C., Zhou J. 2001b. Conjugated linoleic acids and octadecenoic acids: Analysis by GC. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103:600-609.
- Kramer J.K.G., Cruz-Hernández C., Deng Z., Zhou J., Jahreis G., Dugan M.E. 2004. Analysis of conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in synthetic and animal products. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79:1137-1145.
- Kramer J.K.G., Hernández M., Cruz-Hernández C., Kraft J., Dugan M.E.R. 2008. Combining results of two GC separations partly achieves determination of all *cis* and *trans* 16:1, 18:1, 18:2 and 18:3 except CLA isomers of milk fat as demonstrated using Ag-ion SPE fractionation. *Lipids* 43:259-273.
- Kritchevsky D., Tepper S.A., Wright S., Tso P., Czarnecki S.K. 2000. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. *Journal of the American College of Nutrition* 19:472-477.
- Kritchevsky D., Tepper S.A., Wright S., Czarnecki S.K., Wilson T.A., Nicolosi R.J. 2004. Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: Growth and regression of lesions. *Lipids* 39:611-616.
- Kuniyasu H., Yoshida K., Sasaki T., Sasahira T., Fujii K., Ohmori H. 2006. Conjugated linoleic acid inhibits peritoneal metastasis in human gastrointestinal cancer cells. *International Journal of Cancer* 118:571-576.
- Lai K.L., Torres-Duarte A.P., Vanderhoek J.Y. 2005. 9-*trans*, 11-*trans* CLA: Antiproliferative and proapoptotic effects on bovine endothelial cells. *Lipids* 40:1107-1116.
- Laso N., Brugué E., Vidal J., Ros E., Arnaiz J.A., Carné X., Vidal S., Mas S., Deulofeu R., Lafuente A. 2007. Effects of milk supplementation with conjugated linoleic acid (isomers *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12) on body composition and metabolic syndrome components. *British Journal of Nutrition* 98:860-867.
- LeDoux M., Juaneda P., Sébédio J.L. 2007. *Trans* fatty acids: Definition and occurrence in foods. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109:891-900.
- Lee K.N., Kritchevsky D., Pariza M.W. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108:19-25.
- Lemonnier L.A., Dillehay D.L., Vespremi M.J., Abrams J., Brody E., Schmelz E.M. 2003. Sphingomyelin in the suppression of colon tumors: Prevention versus intervention. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 419:129-138.
- Li D., Bode O., Drummond H., Sinclair A.J. 2003. Omega-3 (*n*-3) fatty acids. *Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals*: pp. 225-262. Editor: F.D. Gunstone. The Oily Press, Reino Unido.
- Liew C., Schut H.A.J., Chin S.F., Pariza M.W., Dashwood R.H. 1995. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: A study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 16:3037-3043.

- Lock A.L., Garnsworthy P.C. 2002. Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Animal Science* 74:163-176.
- Lock A.L., Garnsworthy P.C. 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and delta-9 desaturase in dairy cows. *Livestock Production Science* 79:47-59.
- Lock A.L., Bauman D.E. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197-1206.
- Lock A.L., Horne C.A.M., Bauman D.E., Salter A.M. 2005a. Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile in cholesterol-fed hamsters. *Journal of Nutrition* 135:1934-1939.
- Lock A.L., Parodi P.W., Bauman D.E. 2005b. The biology of *trans* fatty acids: Implications for human health and the dairy industry. *Australian Journal of Dairy Technology* 60:134-142.
- Lock A.L., Teles B.M., Perfield J.W., Bauman D.E., Sinclair L.A. 2006. A conjugated linoleic acid supplement containing *trans*-10, *cis*-12 reduces milk fat synthesis in lactating sheep. *Journal of Dairy Science* 89:1525-1532.
- Lock A.L., Tybureczy C., Dwyer D.A., Harvatine K.J., Destailats F., Mouloungui Z., Candy L., Bauman D.E. 2007. *Trans*-10 octadecenoic acid does not reduce milk fat synthesis in dairy cows. *Journal of Nutrition* 137:71-76.
- Loor J.J., Ueda K., Ferlay A., Chilliard Y., Doreau M. 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87:2472-2485.
- Loor J.J., Ferlay A., Ollier A., Doreau M., Chilliard Y. 2005a. Relationship among *trans* and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil. *Journal of Dairy Science* 88:726-740.
- Loor J.J., Doreau M., Chardigny J.M., Ollier A., Sebedio J.L., Chilliard Y. 2005b. Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of *trans*-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage. *Animal Feed Science and Technology* 119:227-246.
- López C., Briard-Bion V., Menard O., Rousseau F., Pradel P., Besle J.M. 2008. Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk globule membrane are modified by diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:5226-5236.
- Luna P., Martín-Diana A.B., Alonso L., Fontecha J., De La Fuente M.A., Requena T., Juárez M. 2004. Effects of milk fat replacement by PUFA enriched fats on n-3 fatty acids, conjugated dienes and volatile compounds of fermented milks. *European Journal of Lipid Science and Technology* 106:417-423.
- Luna P., Fontecha J., Juárez M. De la Fuente M.A. 2005a. Conjugated linoleic acid in ewe milk fat. *Journal of Dairy Research* 72 :415-424.
- Luna P., De la Fuente M.A., Juárez M. 2005b. Conjugated linoleic acid in processed cheeses during the manufacturing stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2690-2695.
- Luna P., Juárez M., De la Fuente M.A. 2005c. Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. *Journal of Dairy Science* 88:3377-3381.
- Luna P., Fontecha J., Juárez M., De la Fuente M.A. 2005d. Changes in the milk and cheese fat composition of ewes fed commercial supplements containing linseed with special reference to the CLA content and isomer composition. *Lipids* 40:445-454.
- Luna P. 2006. Ácido linoleico conjugado en productos lácteos. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

- Luna P., Juárez M., De la Fuente M.A. 2007. Conjugated linoleic acid content and isomer distribution during ripening in three varieties of cheeses protected with designation of origin. *Food Chemistry* 103:1465-1472.
- Luna P., Bach A., Juárez M., De la Fuente M.A. 2008a. Effect of a diet enriched in whole linseed and sunflower oil on goat milk fatty acid composition and conjugated linoleic acid isomer profile. *Journal of Dairy Science* 91:20-28.
- Luna P., Bach A., Juárez M., De la Fuente M.A. 2008b. Influence of diets rich in flax seed and sunflower oil on the fatty acid composition of ewes' milk fat especially on the level of conjugated linoleic acid, n-3 and n-6 fatty acids. *International Dairy Journal* 18:99-107.
- Luna P., Rodríguez-Pino V., De la Fuente M.A. 2009. Occurrence of C16:1 isomers in milk fats from ewes fed with different dietary lipid supplements. *Food Chemistry* 117:248-253.
- Lynch J.M., Lock A.L., Dwyer D.A., Noorbakhsh R., Barbano D.M., Bauman D.E. 2005. Flavor and stability of pasteurized milk with elevated levels of conjugated linoleic acid and vaccenic acid. *Journal of Dairy Science* 88:489-498.
- Malpuech-Brugère C., Morio B., Mensink R.P. 2009. Dietary *trans* fatty acids and cardiovascular disease risk. *Trans Fatty Acids in Human Nutrition*, pp. 307-318. Editores: F. Destailats, J.L. Sébédio, F. Dionisi y J.M. Chardigny. The Oily Press, Reino Unido.
- Masso-Welch P.A., Zangani D., Ip C., Vaughan M.M., Shoemaker S., Ramirez R.A., Ip M.M. 2002. Inhibition of angiogenesis by the cancer chemopreventive agent conjugated linoleic acid. *Cancer Research* 62:4383-4389.
- Mataix F.J., Gil A. 2004. *Libro blanco de los omega-3*. Editor: Puleva Food, Fundación Puleva. Granada, España.
- Mele M., Buccioni A., Petacchi F., Serra A., Serra S., Banni S., Antongiovanni M., Secchiari P. 2006. Effect of forage/concentrate ratio and soybean oil supplementation on milk yield, and composition from Sarda ewes. *Animal Research* 55:273-285.
- Mele M., Serra A., Conte G., Pollicardo A., Del Viva M., Secchiari P. 2007. Whole extruded linseed in the diet of dairy ewes during early lactation: Effect on the fatty acid composition of milk and cheese. *Italian Journal of Animal Science* 6:560-562.
- Mensink R.P., Katan M.B. 1990. Effect of dietary *trans* fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *New England Journal of Medicine* 323:439-445.
- Mensink R.P., Zock P.L., Kester A.D.M., Katan M.B. 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition* 77:1146-1155.
- Mensink R.P. 2005. Effects of stearic acid on plasma lipid and lipoproteins in humans. *Lipids* 40:1201-1205.
- Michaud A.L., Yurawecz M.P., Delmonte P., Corl B.A., Bauman D.E., Brenna J.T. 2003. Identification and characterization of conjugated fatty acid methyl esters of mixed double bond geometry by acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 75:4925-4930.
- Michaud A.L., Brenna J.T. 2006. Structural characterization of conjugated linoleic acid methyl esters with acetonitrile chemical ionization tandem mass spectrometry. *Advances in CLA Research, Volumen 3: pp. 119-138*. Editores: M.P. Yurawecz, J.K.G. Kramer, O. Gudmundsen, M.W. Pariza y S. Banni. AOCS Press, Estados Unidos.
- Miller A., Stanton C., Devery R. 2001. Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells. *Lipids* 36:1161-1168.

- Mitchell P.L., McLeod R.S. 2008. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: Studies in animal models. *Biochemistry and Cell Biology* 86:293-301.
- Moate P.J., Chalupa W., Boston R.C., Lean I.J. 2007. Milk fatty acids. I. Variation in the concentration of individual fatty acids in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 90: 4730-4739.
- Molkentin J. 2000. Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substances in bovine milk lipids. *British Journal of Nutrition* 84:47-53.
- Molle G., Decandia M., Cabiddu A., Landau S.Y., Cannas A. 2008. An update on the nutrition of dairy sheep grazing Mediterranean pastures. *Small Ruminant Research* 77:93-112.
- Moloney F., Yeow T.P., Mullen A., Nolan J.J., Roche H.M. 2004. Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Clinical Nutrition* 80:887-895.
- Moon E.J., Lee Y.M., Kim K.W. 2003. Anti-angiogenic activity of conjugated linoleic acid on basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *Oncology Reports* 10:617-621.
- Mosley E.E., Powell G.L., Riley M.B., Jenkins T.C. 2002. Microbial biohydrogenation of oleic acid to *trans* isomers in vitro. *Journal of Lipid Research* 43:290-296.
- Mossoba M.M., Yurawecz M.P., Delmonte P., Kramer J.K.G. 2004. Overview of infrared methodologies for *trans* fat determination. *Journal of AOAC International* 87:540-544.
- Mougiou V., Matsakas A., Petridou A., Ring S., Sagredos A., Melissopoulou A., Tsigilis N., Nikolaidis M. 2001. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *Journal of Nutritional Biochemistry* 12:585-594.
- Mozaffarian D., Katan M.B., Ascherio A., Stampfer M.J., Willett W.C. 2006. *Trans* fatty acids and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine* 354:1601-1613.
- Nagao K., Inoue N., Wang Y.M., Yanagita T. 2003. Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin level and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310:562-566.
- Nakamura Y.K., Omaye S.T. 2009. Conjugated linoleic acid isomers' roles in the regulation of PPAR- γ and NF- κ B DNA binding and subsequent expression of antioxidant enzymes in human umbilical vein endothelial cells. *Nutrition* 25:800-811.
- Nelson K.A.S., Martín S. 2009. Increasing omega-3 fatty acid content in cow's milk through diet manipulation: effect on milk flavor. *Journal of Dairy Science* 92:1378-1386.
- Nicolosi R.J., Rogers E.J., Kritchevsky D., Scimeca J.A., Huth P.J. 1997. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* 22:266-277.
- Noone E.J., Roche H.M., Nugent A.P., Gibney M.J. 2002. The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition* 88:243-251.
- Nudda A., McGuire M.A., Battacone G., Pulina G. 2005. Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and Ricotta. *Journal of Dairy Science* 88:1311-1319.
- Ochoa J.J., Farquharson A.J., Grant I., Moffat L.E., Heys S.D., Wahle K.W.J. 2004. Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: Different molecular mechanisms for *cis*-9, *trans*-11, and *trans*-10 *cis*-12 isomers. *Carcinogenesis* 25:1185-1191.

- Offer N.W., Marsden M., Dixon J., Speake B.K., Thacker F.E. 1999. Effect of dietary fat supplements on levels of n-3 poly-unsaturated fatty acids, *trans* acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. *Animal Science* 69:613-625.
- Offer N.W., Speake B.K., Dixon J., Marsden M. 2001. Effect of fish-oil supplementation on levels of (n-3) poly-unsaturated fatty acids in the lipoprotein fractions of bovine plasma. *Animal Science* 73:523-531.
- Ohashi A., Matsushita Y., Shibata H., Kimura K., Miyashita K., Saito M. 2004. Conjugated linoleic acid deteriorates insulin resistance in obese/diabetic mice in association with decreased production of adiponectin and leptin. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 50:416-421.
- Or-Rashid M.M., Kramer J.K.G., Wood M.A., McBride B.W. 2008. Supplemental algal meal alters the ruminal *trans*-18:1 fatty acid and conjugated linoleic acid composition in cattle. *Journal of Animal Science* 86:187-196.
- Orskov E.R., Fraser C., Gordon J.G. 1974. Effect of processing of cereals on rumen fermentation, digestibility, rumination time, and firmness of subcutaneous fat in lambs. *British Journal of Nutrition* 32:59-69.
- O'Shea M., Devery R., Lawless F., Murphy J., Stanton C. 2000. Milk fat conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of human mammary MCF-7 cancer cells. *Anticancer Research* 20:3591-3601.
- Palmquist D.L., Beaulieu A.D., Barbano D.M. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science* 76:1753-1771.
- Palmquist D.L., Lock A.L., Shingfield K.J., Bauman D.E. 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Advances in Food and Nutrition Research* 50:179 -217.
- Palmquist D.L. 2006. Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon. *Advanced Dairy Chemistry, Volumen 2: pp. 43-92. Lipids, 3ª edición*. Editores: P.F. Fox y P.L.H. McSweeney, Springer, Estados Unidos.
- Palmquist D. L., Griinari J.M. 2006. Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oils in the diet. *Animal Feed Science and Technology* 131:358-369.
- Palombo J.D., Ganguly A., Bistrrian B.R., Menard M.P. 2002. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Letters* 177:163-172.
- Papadopoulos G., Goulas C., Apostolaki E., Abril R. 2002. Effects of dietary supplements of algae, containing polyunsaturated fatty acids, on milk yield and the composition of milk products in dairy ewes. *Journal of Dairy Research* 69:357-365.
- Pariza M.W. References on Conjugated Linoleic Acid (CLA). <http://fri.wisc.edu/clarefs.htm>.
- Pariza M.W, Ashoor S.H., Chu F.S., Lund D.B. 1979. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Letters* 7:63-69.
- Pariza M.W. 1999. The biological activities of Conjugated Linoleic Acid. *Advances in CLA Research, Volumen 1: pp. 12-20*. Editores: M.P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza y G.J. Nelson. AOCS Press, Estados Unidos.
- Pariza M.W. 2004. Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:1132-1136.
- Park Y., Albright K.J., Storkson J.M., Cook M.E., Pariza M.W. 1997. Effect of Conjugated Linoleic Acid on Body Composition in Mice. *Lipids* 32:853-858.
- Park Y., Storkson J.M., Albright K.J., Liu W., Pariza M.W. 1999. Evidence that the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 34:235-241.

- Park H.S., Ryu J.H., Ha Y.L., Park J.H.Y. 2001. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: A possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *British Journal of Nutrition* 86:549-555.
- Park H.S., Cho H.Y., Ha Y.L., Park J.H.Y. 2004. Dietary conjugated linoleic acid increases the mRNA ratio of Bax/Bcl-2 in the colonic mucosa of rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 15:229-235.
- Park Y., Albright K.J., Storkson J.M., Liu W., Pariza M.W. 2007a. Conjugated linoleic acid (CLA) prevents body fat accumulation and weight gain in an animal model. *Journal of Food Science* 72:612-617.
- Park Y.W., Juárez M., Ramos M., Haenlein, G.F.W. 2007b. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68:88-113.
- Park Y., Pariza M.W., Park Y. 2008a. Cosupplementation of dietary calcium and conjugated linoleic acid (CLA) improves bone mass in mice. *Journal of Food Science* 73: 556-560.
- Park E., Kim J.M., Kim K.T., Paik H.D. 2008b. Conjugated linoleic acid (CLA) supplementation for 8 weeks reduces body weight in healthy overweight/obese Korean subjects. *Food Science and Biotechnology* 17:1261-1264.
- Parodi P.W. 2003. Conjugated linoleic acid in food. *Advances in CLA Research, Volumen 2: pp. 101-122*. Editores: J.L. Sebedio, W.W. Christie, R. Adlof. AOCS Press, Estados Unidos.
- Parodi P.W. 2004. Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology* 59:3-59.
- Parodi P.W. 2006. Nutritional significance of milk lipids. *Advanced Dairy Chemistry, Volumen 2: pp. 601-639. Lipids, 3ª edición*. Editores: P.F. Fox y P.L.H. McSweeney, Springer, Estados Unidos.
- Parodi P.W. 2009. Has the association between saturated fatty acids, serum cholesterol and coronary heart disease been over emphasized?. *International Dairy Journal* 19:345-361.
- Perfield II J.W., Lock A.L., Griinari J.M., Sæbø A., Delmonte P., Dwyer D.A., Bauman D.E. 2007. *Trans-9 cis-11 C18:2 conjugated linoleic acid (CLA) reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science* 90:2211-2218.
- Piperova L.S., Teter B.B., Bruckental I., Sampugna J., Mills S.E., Yurawecz M.P., Fritsche J., Ku Y., Erdman R.A. 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids are related in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. *Journal of Nutrition* 130:2568-2574.
- Piperova L.S., Sampugna J., Teter B.B., Kalscheur K.F., Yurawecz M.P., Ku Y., Morehouse K.M., Erdman R.A. 2002. Duodenal and milk *trans* octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of *cis-9* containing CLA in lactating dairy cows. *Journal of Nutrition* 132:1235-1241.
- Platt I., Rao L.G., El-Sohehy A. 2007. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid on mineralized bone nodule formation from human osteoblast-like cells. *Experimental Biology and Medicine* 232:246-252.
- Platt I., El-Sohehy A. 2009. Effects of 9cis,11trans and 10trans,12cis CLA on osteoclast formation and activity from human CD14⁺ monocytes. *Lipids in Health and Disease* 8:15.
- Plourde M., Destailats F., Chouinard P.Y., Angers P. 2007. Conjugated α -linolenic acid isomers in bovine milk and muscle. *Journal of Dairy Science* 90:5269-5275.
- Poppitt S.D., Koegh G.F., Mulvey T.B., McArdle B.H., MacGibbon A.K.H., Cooper G.J.S. 2002. Lipid-lowering effects of a modified butter-fat: A controlled intervention trial in healthy men. *European Journal of Clinical Nutrition* 56:64-71.

- Proell J.M., Mosley E.E., Powell G.L., Jenkins T.C. 2002. Isomerization of stable isotopically labeled elaidic acid to *cis* and *trans* monoenes by ruminal microbes. *Journal of Lipid Research* 43:2072-2076.
- Pulina G., Nudda A., Battacone G., Cannas A. 2006. Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk. *Animal Feed Science and Technology* 131:255-291.
- Raff M., Tholstrup T., Toubro S., Bruun J.M., Lund P., Straarup E.M., Christensen R., Sandberg M.B., Mandrup S. 2009. Conjugated linoleic acids reduce body fat in healthy postmenopausal women. *Journal of Nutrition* 139:1347-1352.
- Ramaswamy N., Baer R.J., Schingoethe D.J., Hippen A.R., Kasperson K.M., Whitlock L.A. 2001. Composition and flavour of milk and butter from cows fed fish oil, extruded soybeans, or their combination. *Journal of Dairy Science* 84:2144-2151.
- Renaud S., Lanzmann-Petithory D. 2001. Coronary heart disease: dietary links and pathogenesis. *Public Health Nutrition* 4:459-474.
- Riséus U., Berglund L., Vessby B. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: A randomised controlled trial. *International Journal of Obesity* 25:1129-1135.
- Roach J.A.G. 1999. Identification of CLA isomers in food and biological extracts by mass spectrometry. *Advances in CLA Research, Volumen 1: pp. 126-140*. Editores: M.P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza y G.J. Nelson. AOCS Press, Estados Unidos.
- Roach J.A.G., Mossoba M.M., Yurawecz M.P., Kramer J.K.G. 2002. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Analytica Chimica Acta* 465:207-226.
- Roy A., Chardigny J.M., Bauchart D., Ferlay A., Lorenz S., Durand D., Gruffat D., Faulconnier Y., Sébédio J.L., Chilliard Y. 2007. Butters rich either in *trans*-10-C18:1 or in *trans*-11-C18:1 plus *cis*-9, *trans*-11 CLA differentially affect plasma lipids and aortic fatty streak in experimental atherosclerosis in rabbits. *Animal* 1:467-476.
- Roy B.D., Bourgeois J., Rodríguez C., Payne E., Young K., Shaughnessy S.G., Tarnoplosky M.A. 2008. Conjugated linoleic acid prevents growth attenuation induced by corticosteroid administration and increases bone mineral content in young rats. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* 33:1096-1104.
- Rudkowska I. 2009. Functional foods for health: Focus on diabetes. *Maturitas* 62:263-269.
- Ryder J.W., Portocarrero C.P., Song X.M., Cui L., Yu M., Combatsiaris T., Galuska D., Bauman D.E., Barbano D.M., Charron M.J., Zierath J.R., Houseknecht K.L. 2001. Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid: Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. *Diabetes* 50:1149-1157.
- Ryhänen E.L., Tallavaara K., Griinari J.M., Jaakkola S., Mantere-Alhonen S., Shingfield K.J. 2005. Production of conjugated linoleic acid enriched milk and dairy products from cows receiving grass silage supplemented with a cereal-based concentrate containing rapeseed oil. *International Dairy Journal* 15:207-217.
- Sanz Sampelayo M.R., Chilliard Y., Schmidely P., Boza J. 2007. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68:42-63.
- Schmelz E.M., Dillehay D.L., Webb S.K., Reiter A., Adams J., Merrill Jr. A.H. 1996. Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine: Implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis. *Cancer Research* 56:4936-4941.

- Sehat N., Yurawecz M.P., Roach J.A.G., Mossoba M.M., Kramer J.K.G., Ku Y. 1998. Silver-ion high-performance liquid chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers *Lipids* 33:217-221.
- Sehat N., Rickert R., Mossoba M.M., Kramer J.K.G., Yurawecz M.P., Roach J.A.G., Adlof R.O., Morehouse K.M., Fritsche J., Eulitz K.D., Steinhart H., Ku Y. 1999. Improved separation of conjugated fatty acid methyl esters by silver ion-high-performance liquid chromatography. *Lipids* 34:407-413.
- Shahidi F. 2008. Omega-3 oils: sources, applications, and health effects. *Marine Nutraceuticals and Functional Foods: pp. 99-146*. Editores: C. Barrow y F. Shahidi. CRC Press, Estados Unidos.
- Shingfield K.J., Ahvenjarvi S., Toivonen V., Arola A., Nurmela K.V.V., Huhtanen P., Griinari J.M. 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Animal Science* 77:165-179.
- Shingfield K.J., Reynolds C.K., Hervás G., Griinari J.M., Grandison A.S., Beever D.E. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89:714-732.
- Shingfield K.J., Griinari J.M. 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109:799-816.
- Shingfield K.J., Chilliard Y., Toivonen V., Kairenius P., Givens D.I. 2008a. *Trans* fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 606:3-65.
- Shingfield K.J., Ahvenjärvi S., Toivonen V., Vanhatalo A., Huhtanen P., Griinari J.M. 2008b. Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *British Journal of Nutrition* 99:971-983.
- Shingfield K.J., Sæbø A., Sæbø P.C., Toivonen V., Griinari J.M. 2009. Effect of abomasal infusions of a mixture of octadecenoic acids on milk fat synthesis in lactating cows. *Journal of Dairy Science* 92:4317-4329.
- Simón E., Macarulla M.T., Churrua I., Fernández-Quintela A., Portillo M.P. 2006. *Trans-10*, *cis-12* conjugated linoleic acid prevents adiposity but not insulin resistance induced by an atherogenic diet in hamsters. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17:126-131.
- Simopoulos A.P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine* 233:674-688.
- Sinclair L.A., Lock A.L., Early R., Bauman D.E. 2007. Effects of *trans-10*, *cis-12* conjugated linoleic acid on ovine milk fat synthesis and cheese properties. *Journal of Dairy Science* 90:3326-3335.
- Siró I., Kápolna E., Kápolna B., Lugasi A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite* 51:456-467.
- Soel S.M., Choi O.S., Bang M.H., Yoon Park J.H., Kim W.K. 2007. Influence of conjugated linoleic acid isomers on the metastasis of colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18:650-657.
- Song H.J., Grant I., Rotondo D., Mohede I., Sattar N., Heys S.D., Wahle K.W.J. 2005. Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition* 59:508-517.
- Sri Kantha S. 1987. Dietary effects of fish oils on human health: A review of recent studies. *Yale Journal of Biology and Medicine* 60:37-44.
- Stanton C., Murphy J., McGrath E., Devery R. 2003. Animal feeding strategies for conjugated linoleic acid enrichment of milk. *Advances in Conjugated Linoleic Acid, Vol 2, pp. 123-145*. Editores: J.L. Sebedio, W.W. Christie y R. Adlof. AOCS Press, Estados Unidos.

- Tanmahasamut P., Liu J., Hendry L.B., Sidell N. 2004. Conjugated linoleic acid blocks strogen signaling in human breast cancer cells. *Journal of Nutrition* 134:674-680.
- Tholstrup T., Raff M., Straarup E.M., Lund P., Basu S., Bruun J.M. 2008. An oil mixture with *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid increases markers of inflammation and in vivo lipid peroxidation compared with *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid in postmenopausal women. *Journal of Nutrition* 138:1445-1451.
- Thom E., Wadstein J., Gudmundsen O. 2001. Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *Journal of International Medical Research* 29:392-396.
- Timmen H., Patton S. 1988. Milk fat globules: Fatty acid composition, size and in vivo regulation of fat liquidity. *Lipids* 23:685-689.
- Tricon S., Burdge G.C., Kew S., Banerjee T., Russell J.J., Grimble R.F., Williams C.M., Calder P.C., Yaqoob P. 2004a. Effects of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on immune cell function in healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 80:1626-1633.
- Tricon S., Burdge G.C., Kew S., Banerjee T., Russell J.J., Jones E.L., Grimble R.F., Williams C.M., Yaqoob P., Calder P.C. 2004b. Opposing effects of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 80:614-620.
- Tsiplakou E., Mountzouris K.C., Zervas G. 2006. Concentration of conjugated linoleic acid in grazing sheep and goat milk fat. *Livestock Science* 103:74-84.
- Tsiplakou E., Zervas G. 2008. Comparative study between sheep and goats on rumenic acid and vaccenic acid in milk fat under the same dietary treatments. *Livestock Science* 119:87-94.
- Tsuboyama-Kasaoka N., Takahashi M., Tanemura K., Kim H.J., Tange T., Okuyama H., Kasai M., Ikemoto S., Ezaki O. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49:1534-1542.
- Turpeinen A.M., Ylonen N., Von Willebrand E., Basu S., Aro A. 2008. Immunological and metabolic effects of *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid in subjects with birch pollen allergy. *British Journal of Nutrition* 100:112-119.
- Tyburczy C., Major C., Lock A.L., Destailats F., Lawrence P., Brenna J.T., Salter A.M., Bauman D.E. 2009. Individual *trans* octadecenoic acids and partially hydrogenated vegetable oil differentially affect hepatic lipid and lipoprotein metabolism in golden syrian hamsters. *Journal of Nutrition* 139:257-263.
- Vaille K., Grippois D., Blouquit M.F., Souidi M., Riottot M., Bouthegourd J.C., Serougne C., Martin J.C. 2004. Lipid atherogenic risk markers can be more favourably influenced by the *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoate isomer than a conjugated linoleic acid mixture or fish oil in hamsters. *British Journal of Nutrition* 91:191-199.
- Vaille K., Ferezou J., Amsler G., Quignard-Boulang A., Parquet M., Grippois D., Dorovska-Taran V., Martin J.C. 2005. A *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid-rich oil reduces the outcome of atherogenic process in hyperlipidemic hamster. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289:652-659.
- Vaille K., Ferezou J., Parquet M., Amsler G., Grippois D., Quignard-Boulang A., Martin J.C. 2006. The natural concentration of the conjugated linoleic acid, *cis*-9, *trans*-11, in milk fat has antiatherogenic effects in hyperlipidemic hamsters. *Journal of Nutrition* 136:1305-1310.
- Visonneau S., Cesano A., Tepper S.A., Scimeca J.A., Santoli D., Kritchevsky D. 1997. Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice. *Anticancer Research* 17:969-973.
- Vlaeminck B., Fievez V., Cabrita A.R.J., Fonseca A.J.M., Dewhurst R.J. 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Animal Feed Science and Technology* 131:389-417.

- Wahle K.W.J., Heys S.D., Rotondo D. 2004. Conjugated linoleic acids: Are they beneficial or detrimental to health?. *Progress in Lipid Research* 43:553-587.
- Wang L.S., Huang Y.W., Sugimoto Y., Liu S., Chang H.L., Ye W., Shu S., Lin Y.C. 2005. Effects of human breast stromal cells on conjugated linoleic acid (CLA) modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) expression in MCF-7 cells. *Anticancer Research* 25:4061-4068.
- Wargent E., Sennitt M.V., Stocker C., Mayes A.E., Brown L., O'Dowd J., Wang S., Einerhand A.W.C., Mohede I., Arch J.R.S., Cawthorne M.A. 2005. Prolonged treatment of genetically obese mice with conjugated linoleic acid improves glucose tolerance and lowers plasma insulin concentration: Possible involvement of PPAR activation. *Lipids in Health and Disease* 4:3.
- Werner S.A., Luedecke L.O., Shultz T.D. 1992. Determination of conjugated linoleic acid content and isomer distribution in three cheddar-type cheeses: Effects of cheese cultures, processing, and aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:1817-1821.
- Whigham L.D., Watras A.C., Schoeller D.A. 2007. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: A meta-analysis in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 85:1203-1211.
- Whitlock L.A., Schingoethe D.J., Hippen A.R., Kalscheur K.F., Baer R.J., Ramaswamy N., Kasperson K.M. 2002. Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acids in milk of dairy cows more than when fed separately. *Journal of Dairy Science* 85:234-243.
- Whitlock L.A., Schingoethe D.J., AbuGhazaleh A.A., Hippen A.R., Kalscheur K.F. 2006. Milk production and composition from cows fed small amounts of fish oil with extruded soybeans. *Journal of Dairy Science* 89:3972-3980.
- Wildman R.E.C. 2007. *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. CRC Press, Estados Unidos.
- Williams E.A., Coxhead J.M., Mathers J.C. 2003. Anti-cancer effects of butyrate: Use of micro-array technology to investigate mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society* 62:107-115.
- Wongtangintharn S., Oku H., Iwasaki H., Toda T. 2004. Effect of branched-chain fatty acids on fatty acid biosynthesis of human breast cancer cells. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 50:137-143.
- Yang Z., Liu S., Chen X., Chen H., Huang M., Zheng J. 2000. Induction of apoptotic cell death and in vivo growth inhibition of human cancer cells by a saturated branched-chain fatty acid, 13-methyltetradecanoic acid. *Cancer Research* 60:505-509.
- Yang M., Cook M.E. 2003. Dietary CLA decreased weight loss and extended survival following the onset of kidney failure in NZB/W F1 mice. *Lipids* 38:21-24.
- Yu Y., Correll P.H., Heuvel J.P.V. 2002. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: Evidence for a PPAR γ -dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1581:89-99.
- Yurawecz M.P., Roach J.A.G., Sehat N., Mossoba M.M., Kramer J.K.G., Fritsche J., Steinhart H., Ku Y. 1998. A new conjugated linoleic acid isomer, 7 *trans*, 9 *cis*-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. *Lipids* 33:803-809.
- Zhang R.H., Mustafa A.F., Zhao X. 2006. Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. *Animal Feed Science and Technology* 127:220-233.
- Zhao W.S., Zhai J.J., Wang Y.H., Xie P.S., Yin X.J., Li L.X., Cheng K.L. 2009. Conjugated linoleic acid supplementation enhances antihypertensive effect of ramipril in chinese patients with obesity-related hypertension. *American Journal of Hypertension* 22:680-686.

6. Bibliografía

Zhou X.R., Sun C.H., Liu J.R., Zhao D. 2008. Dietary conjugated linoleic acid increases PPAR γ gene expression in adipose tissue of obese rat, and improves insulin resistance. *Growth Hormone and IGF Research* 18:361-368.

Anexo I:

Patente PCT/ES2009/070421



TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES NOTIFICACIÓN DE LA RECEPCIÓN DE LOS DOCUMENTOS QUE CONSTITUYEN SUPUESTAMENTE UNA SOLICITUD INTERNACIONAL PRESENTADA DE FORMA ELECTRÓNICA.

(Instrucciones Administrativas del PCT, Parte Séptima)

- 1.-Se notifica al solicitante que la Oficina Receptora ha recibido en la fecha de recepción indicada más abajo, los documentos que supuestamente constituyen una solicitud internacional.
- 2.-Se llama la atención del solicitante sobre el hecho de que la Oficina Receptora no ha comprobado aún si estos documentos satisfacen las condiciones del art. 11.1, es decir, si cumple los requisitos para que le sea atribuida una fecha de presentación internacional. En cuanto la Oficina Receptora haya comprobado los documentos, avisará al solicitante.
- 3.-El número de la supuesta solicitud internacional indicado más abajo ha sido otorgado automáticamente a estos documentos. Se invita al solicitante a mencionar este número en toda la correspondencia con la Oficina Receptora.

Número de presentación	300003438	
Solicitud Número PCT	PCT/ES2009/070421	
Fecha de recepción	06 octubre 2009	
Oficina Receptora	Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid	
Referencia del expediente del solicitante o mandatario	PCT1641-136	
Solicitante	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (15%)	
Número de solicitantes	10	
País	ES	
Título de la invención	COMPOSICIÓN PARA SUPLEMENTO ALIMENTICIO	
Documentos presentados	PCT1641136-pkda.xml PCT1641136-appb.xml PCT1641136-vlog.xml PCT1641136-appb-P000001.pdf (11 p.)	PCT1641136-requ.xml PCT1641136-fees.xml pct101.GML PCT1641136-appb-P000002.pdf (2 p.)

	PCT1641136-appb-P000003.pdf (1 p.) pct101.1WO pct101u.gml	PCT1641136-abst.txt Pct101.PDF (6 p.) referenc.inf
Presentado por	EMAIL=gfuster@pons.es,CN=Angel Pons,OU=www.verisign.com/repository/CPS Incorp. by Ref.,LIAB.LTD(c)99,OU=WIPO Customer CA,O=World Intellectual Property Organization	
Método de Transmisión	Online	
Fecha y hora de expedición del recibo	06 octubre 2009, 15:45 (CEST)	
Información oficial condensada de la presentación	0D:D9:F4:7A:5C:BD:A8:C4:8F:3F:98:FC:23:B3:77:CE:EC:82:A3:08	

/Madrid, Oficina Receptora/

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

0	Para uso de la oficina receptora únicamente	
0-1	Solicitud internacional No.	
0-2	Fecha de presentación internacional	
0-3	Nombre de la Oficina receptora y "Solicitud Internacional PCT"	
0-4	Formulario PCT/RO/101 Petitorio PCT	
0-4-1	Preparado usando	PCT-SAFE Version 3.51.041.217 MT/FOP 20090701/0.20.5.17
0-5	Petición El abajo firmante pide que la presente solicitud internacional sea tramitada con arreglo al Tratado de Cooperación en materia de Patentes	
0-6	Oficina receptora (indicada por el solicitante)	Oficina Española de Patentes y Marcas (RO/ES)
0-7	Referencia al expediente del solicitante o del mandatario	PCT1641-136
I	Título de la invención	COMPOSICIÓN PARA SUPLEMENTO ALIMENTICIO
II	Solicitante	
II-1	Esta persona es:	Solicitante únicamente
II-2	Solicitante para	todos los Estados salvo los Estados Unidos de América
II-4	Nombre	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (15%)
II-5	Dirección	C/ Serrano, 117 28006 Madrid España
II-6	Estado de nacionalidad	ES
II-7	Estado de domicilio	ES
III-1	Solicitante y/o inventor	
III-1-1	Esta persona es:	Solicitante únicamente
III-1-2	Solicitante para	todos los Estados salvo los Estados Unidos de América
III-1-4	Nombre	LODYN, S. L. (28,3%)
III-1-5	Dirección	Avda. Tablas Daimiel, 1 - 4º D 13004 Ciudad Real España
III-1-6	Estado de nacionalidad	ES
III-1-7	Estado de domicilio	ES

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

III-2	Solicitante y/o inventor	
III-2-1	Esta persona es:	Solicitante únicamente
III-2-2	Solicitante para	todos los Estados salvo los Estados Unidos de América
III-2-4	Nombre	INSTITUT DE RECERCA I TECHNOLOGÍA AGROALIMENTARIES (IRTA) (28,3%)
III-2-5	Dirección	Passeig de Gràcia, 44 - 3ª 08007 Barcelona España
III-2-6	Estado de nacionalidad	ES
III-2-7	Estado de domicilio	ES
III-3	Solicitante y/o inventor	
III-3-1	Esta persona es:	Solicitante únicamente
III-3-2	Solicitante para	todos los Estados salvo los Estados Unidos de América
III-3-4	Nombre	INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS (ICREA) (28,3%)
III-3-5	Dirección	Pg. Lluís Companys, 23 08010 Barcelona España
III-3-6	Estado de nacionalidad	ES
III-3-7	Estado de domicilio	ES
III-4	Solicitante y/o inventor	
III-4-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-4-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-4-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	DE LA FUENTE LAYOS, Miguel Ángel
III-4-5	Dirección	INSTITUTO DEL FRÍO C/ José Antonio Novais, 10 28040 Madrid España
III-4-6	Estado de nacionalidad	ES
III-4-7	Estado de domicilio	ES
III-5	Solicitante y/o inventor	
III-5-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-5-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-5-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	JUAREZ IGLESIAS, Manuela
III-5-5	Dirección	INSTITUTO DEL FRÍO C/ José Antonio Novais, 10 28040 Madrid España
III-5-6	Estado de nacionalidad	ES
III-5-7	Estado de domicilio	ES

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

III-6	Solicitante y/o inventor	
III-6-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-6-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-6-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	GÓMEZ CORTES, Pilar
III-6-5	Dirección	INSTITUTO DEL FRÍO C/ José Antonio Novais, 10 28040 Madrid España
III-6-6	Estado de nacionalidad	ES
III-6-7	Estado de domicilio	ES
III-7	Solicitante y/o inventor	
III-7-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-7-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-7-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	GARCÍA GARCÍA, Alfonso
III-7-5	Dirección	LODYN, S. L. Avda. Tablas Daimiel, 1 - 4º D 13004 Ciudad Real España
III-7-6	Estado de nacionalidad	ES
III-7-7	Estado de domicilio	ES
III-8	Solicitante y/o inventor	
III-8-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-8-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-8-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	RODRIGUEZ LOZANO, Juan Carlos
III-8-5	Dirección	LODYN, S. L. Avda. Tablas Daimiel, 1 - 4º D 13004 Ciudad Real España
III-8-6	Estado de nacionalidad	ES
III-8-7	Estado de domicilio	ES
III-9	Solicitante y/o inventor	
III-9-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-9-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-9-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	BACH ARIZA, Alejandro
III-9-5	Dirección	INSTITUT DE RECERCA I TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIES (IRTA) Passeig de Gràcia, 44 - 3ª 08007 Barcelona España
III-9-6	Estado de nacionalidad	ES
III-9-7	Estado de domicilio	ES

PETITORIO PCT

Impresión (original en formato electrónico)

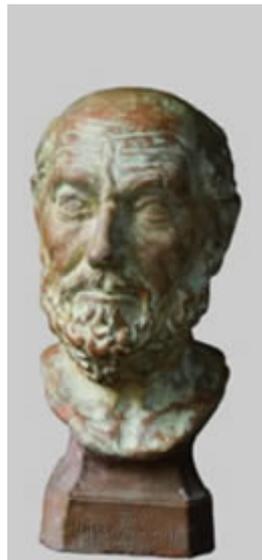
IV-1	Mandatario o representante común; o dirección para la correspondencia La persona identificada a continuación se nombra/ha sido nombrada para actuar en nombre del/de los solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como:	Mandatario
IV-1-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	PONS ARIÑO, Ángel
IV-1-2	Dirección	Glorieta de Rubén Darío, 4 28010 Madrid España
IV-1-3	No. de teléfono	917007600
IV-1-4	No. de facsímil	913086103
IV-1-5	Correo electrónico	patentes@pons.es
IV-1-5(a))	Autorización a utilizar el correo-e La Oficina receptora, la Administración de búsqueda internacional, la Oficina Internacional y la Administración de examen preliminar internacional se han autorizadas a utilizar la dirección de correo-e para enviar con antelación, si la Oficina y la Administración así lo desean, copias de las notificaciones de la presente solicitud internacional.	Sí
V	DESIGNACIONES	
V-1	Según la Regla 4.9.a), la presentación de este petitorio constituye la designación de todos los Estados contratantes vinculados por el PCT en la fecha de presentación internacional a efectos de todo tipo de protección disponible y, cuando proceda, de la concesión tanto de patentes regionales como de patentes nacionales.	
VI-1	Reivindicación de prioridad de una solicitud nacional anterior	
VI-1-1	Fecha de presentación	06 Octubre 2008 (06.10.2008)
VI-1-2	Número	P200802822
VI-1-3	País	ES
VI-2	Petición de documento de prioridad Se ruega a la Oficina receptora que prepare y transmita a la Oficina Internacional una copia certificada de la(s) solicitud(es) anterior(es) identificada(s) supra como punto(s):	VI-1

Anexo II:

Premio Internacional Hipócrates 2009



*Real Academia de Medicina
del Principado de Asturias*



Jurado del Premio Internacional Hipócrates 2009

Dr. D. Jesús Moreno de Orbe

Dr. D. Rafael Sariego García (Secretario del Jurado)

Dra. Dña. Carmen Rodríguez Menéndez (Presidenta del Jurado)

Dr. D. Manuel Álvarez-Uría Rico-Villademoros

D. José Aza González

D. Rafael Loredó Coste (Director de la Fundación)

Dr. D. Carlos Madera González

Dr. D. Manuel Crespo Hernández

Dr. D. José Luis Mediavilla Ruiz

Dr. D. Juan Junceda Moreno.



**ACTA DEL JURADO DEL PREMIO INTERNACIONAL
HIPOCRATES DE INVESTIGACIÓN MÉDICA SOBRE
NUTRICIÓN HUMANA CORRESPONDIENTE A LA
CONVOCATORIA 2009**

En Oviedo, siendo las 11:15 horas del jueves día 16 de julio de 2009, y con arreglo a las bases establecidas en el Premio Internacional Hipócrates de Investigación Médica sobre Nutrición Humana, se reúne el Jurado del mismo con el fin de examinar las candidaturas presentadas y tras el correspondiente debate, el Jurado decide por unanimidad otorgar el Premio al trabajo titulado:

**"MEJORA NUTRICIONAL DEL PERFIL EN ÁCIDOS GRASOS DE
LECHE Y QUESOS DE OVEJA MEDIANTE LA SUPLEMENTACIÓN
DE LA DIETA CON SEMILLA DE LINO EXTRUSIONADA"**

Por la estructura del trabajo, rigurosa y conforme a método, y porque plantea una mejora del queso a partir de la dieta de los animales en la que sin cambiar la apariencia, aroma, sabor, textura y consecuentemente la aceptabilidad general, modifica la composición de los ácidos grasos hacia formas más saludables.

La autoría del trabajo, corresponde al equipo dirigido por:

LA PROFESORA DÑA. MANUELA JUÁREZ

Profesora de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y
Exvicepresidenta del mismo.

