

Acidos grasos de la leche materna madura de mujeres venezolanas de estratos socioeconómicos bajos: Influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento

Virgilio Bosch, Iván Golfetto, Hilda Alonso, Zuly Laurentin, Mercedes Materan y Ninoska García.

Instituto de Medicina Experimental. Sección de Lipidología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.
Centro de Análisis Especiales "Dr Jacobo Domínguez Rochil" Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela

RESUMEN. La leche materna (LM) es el alimento por excelencia en los niños desde el nacimiento hasta los seis meses de edad. Es importante saber si las condiciones de vida precaria podrían limitar algunos nutrientes en la LM. El objetivo de este estudio fue evaluar el contenido de grasa total (GT) y de ácidos grasos esenciales de cadena larga (LC-PUFA), en leches maternas maduras de mujeres venezolanas de estratos socioeconómicos bajos. Los valores de GT (3.56 ± 1.18 g/%) coinciden con los reportados en otras publicaciones. La suma de LC-PUFA n-3 fue $0,3 \pm 0.04\%$ lo cual se corresponde con una dieta materna baja en ácidos grasos serie n-3. Especialmente notorio es el hecho que al calcular la cantidad de 22:6 n-3 que podría aportar la leche materna promedio a un recién nacido de un mes (consumo de 750 ml/día de leche) está por debajo del requerimiento calculado (70 mg/día). La mayoría de estas muestras proveen la cantidad de DHA estimada como conveniente para mantener un adecuado crecimiento del recién nacido. También se exploró como el tiempo (8h y 24h) y la temperatura de almacenamiento ($+4^{\circ}\text{C}$, $+15^{\circ}\text{C}$ y $+25^{\circ}\text{C}$) pueden afectar su composición. Estos datos permitirán elegir las mejores condiciones de muestreo y almacenamiento de la leche materna para futuras investigaciones en diversas áreas de Venezuela. Si bien la mayor parte de los ácidos grasos de la leche materna pueden tolerar varias horas a temperatura de unos 25°C , los ácidos LC-PUFA son muy vulnerables. Se propone, en consecuencia, que las muestras, tomadas en recipientes estériles y en hielo seco deben ser transportadas en pocas horas al laboratorio para mantenerlas a -70°C hasta el momento del análisis.

Palabras clave: Leche materna, ácidos grasos n-3, estrato socioeconómico, temperatura, almacenamiento.

SUMMARY. Fatty acids in mature breast milk from low socioeconomic levels of Venezuelan women: influence of temperature and time of storage. Breast milk is the main food in infants from birth until six months old. It is important to know if precarious life conditions could limit some nutrients in mother's milk. The objective of this study is to evaluate the total fat and essential long chain fatty acids in mature breast milk from low socioeconomic levels in Venezuelan women. The values of total fat (3.56 ± 1.18 g/%) are similar that reported in the literature, however the sum of LC-PUFA n-3 was $0,3 \pm 0.04\%$ which is related with low n-3 fatty acid maternal diet. The sum LC-PUFA n-3 contained in this study is below most of the reviewed publications. The average amount of 22:6 n-3 in breast milk offered to newborn one month old (750 ml/day) is below estimated requirements (70mg/day). The majority of these samples provide to the infants, the amount of DHA estimated as convenient to sustain normal growth. Also it was explored how the time (8h to 24 h) and temperatura ($+4^{\circ}\text{C}$, $+15^{\circ}\text{C}$ y $+25^{\circ}\text{C}$) can affect its composition. This data will permit to select the best conditions of sampling and storage of mother's milk in future investigations in different regions of Venezuela. Most of the breast milk fatty acids tolerate some hours at room temperature (25°C) but essential long chain fatty acids are very vulnerable. We propose that, in consequence, that samples should be transported in sterile conditions in dry ice to the laboratory in a few hours and should be kept at -70°C until their analysis.

Key words: Breast milk, n-3 fatty acids, socioeconomic level, temperature, storage.

INTRODUCCION

Como resultado de varias y convincentes investigaciones se sabe que el rápido crecimiento del sistema nervioso humano que se observa después del nacimiento, requiere un sostenido aporte, de ácidos grasos esenciales de cadena larga (LC-PUFA) entre otros variados nutrientes (1). La síntesis de estos ácidos por las células del sistema nervioso central (SNC) a partir de precursores de cadena más corta y menos insaturados (18:2 n6 y 18:3 n3) se produce en muy pequeñas cantidades, como

ha sido demostrado en astrocitos y células del hipocampo de la rata. Esta síntesis adquiere importancia solo cuando hay deficiencia en la dieta de los LCPUFA (2,3). En diversas investigaciones sobre el contenido de LC-PUFA en muestras de leche materna se ha podido constatar que hay una gran variabilidad en las distintas poblaciones y que existe un cierto grado de dependencia de la cantidad de LC-PUFA de la leche y la dieta materna. Como consecuencia de esto es predecible que en poblaciones con bajo contenido dietético de los ácidos grasos esenciales en general y en particular de los LC-PUFA,

puedan darse situaciones críticas en la composición de la leche materna que afecte adversamente el crecimiento y desarrollo del SNC (4,5,6). Por tanto, es necesario que en cada población se tenga una idea de la composición en ácidos grasos de la leche materna o de cualquier leche que intente usarse como sustituto cuando es absolutamente imposible el uso de la leche materna.

El objetivo de este trabajo fue analizar muestras de leche materna madura de un grupo de mujeres de estratos socio económicos bajos, e investigar si existen diferencias analíticas al variar las condiciones de almacenaje a distintas temperaturas y tiempos hasta la llegada de las muestras al laboratorio.

MATERIALES Y METODOS

En este estudio participaron previo consentimiento 20 madres, que tenían cerca de 8 semanas amantando a sus hijos nacidos de un parto normal a término y peso al nacer normal (Tabla 1). Las madres se sometieron a un examen clínico y a un interrogatorio para asegurarse que ninguna tenía alguna enfermedad (diabetes mellitus, afección tiroidea, obesidad, hipertensión, síndrome metabólico, trastornos hepáticos o renales), o que estuviera bajo control terapéutico alguno.

TABLA 1
Datos de las madres y de los recién nacidos

Edad (años)	Madres		n	TL (meses)	Recién nacidos	
	Paridad	ES			Talla (cm.)	PN (kg)
26,8 ± 0,9	2,15 ± 0,3	V	2	1,9 ± 0,2	51,05±0,8	3,343±100,7
		IV	17			
		III	1			

PN = Peso al nacer

ES = Estrato Socioeconómico TL = Tiempo de lactancia

Estas madres provenían de una clínica de control de embarazadas normales que asiste a madres de escasos recursos económicos. El estrato socioeconómico de las madres se determinó aplicando el método de Grafar-Méndez Castellano (8), el cual establece una escala del I al V, en base a la profesión del jefe de familia, la instrucción de la madre, la fuente de ingreso y el tipo de alojamiento. Las escalas I y II corresponden a los estratos de mejor condición socioeconómica, las escalas IV y V incluyen a los estratos de menores recursos y la escala III a una condición económica intermedia.

Las muestras de leche para el estudio fueron extraídas durante las mañanas, al mes de amamantamiento al final de una de las succiones del recién nacido (RN). Las muestras recibidas en envases estériles se colocaron inmediatamente a -70°C hasta el momento de realizar los estudios correspondientes.

Una vez descongeladas las muestras, de cada una de ellas se tomó una alícuota para el análisis inmediato, sin tiempo de

espera, a esta determinación se le denominó “Tiempo 0” (T0); otras porciones de la muestra descongelada se colocaron en baño de agua a tres temperaturas: +4°C, +15°C y +25°C, cada una con dos tiempos de exposición: 8 horas y 24 horas. Es decir, un total de 7 condiciones distintas incluyendo T0. Después de transcurrido el tiempo establecido las muestras se analizaron igual a la muestra T0.

Las muestras de leche se dividieron en dos partes, una para la determinación cuantitativa de lípidos totales y la otra para determinar el perfil de ácidos grasos. Los lípidos de cada una de las muestras de leche se extrajeron por el método de Folch y col (8). Los lípidos extraídos fueron evaporados en un roto-evaporador en tres pasos sucesivos con metanol con el fin de eliminar cualquier residuo de agua. Finalmente los lípidos se redisolieron en cloroformo, tanto para su análisis por gravimetría como para la determinación del perfil de ácidos grasos por cromatografía en fase gas líquido. Para la determinación de los lípidos totales de cada una de las leches por gravimetría, el cloroformo se evaporó completamente en atmósfera de nitrógeno.

Los ácidos grasos contenidos en los lípidos evaporados, se transesterificaron en una mezcla de metanol anhidro y cloruro de acetilo en proporción 100:15 v/v respectivamente, en baño de arena a una temperatura de 70 °C, durante tres horas de acuerdo al método de Ghebremeskel y col modificado 1995 (9). La reacción se detuvo con una solución de cloruro de sodio al 5% en agua, se neutralizó con una solución acuosa de bicarbonato de potasio al 2%, y se realizó la extracción de los metil ésteres de ácidos grasos (MAG) con éter de petróleo (40-60°C) que contenía tolueno beta hidroxibutirato (BHT) al 0,01%.

Los MAG obtenidos, fueron separados mediante cromatografía en fase gas líquido, usando un cromatógrafo Hewlett Packard, modelo HP 6890 Plus GC, versión A.03.07, con una columna capilar de 30 m x 0.32 mm d.i., 0.25 µm de película interna. Se usó helio como gas transportador, las temperaturas del inyector, horno y del detector fueron 250, 200 y 280°C respectivamente. Los MAG fueron identificados por comparación con los tiempos de retención de un estándar Sigma (Cat: 189-19, St. Louis, USA). El área de los picos fueron cuantificados electrónicamente.

Se calculó la ingestión equivalente de DHA de un lactante que consuma 750ml de leche materna/día, de acuerdo a lo propuesto por Uauy y colaboradores (10).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los datos de las madres incluidas en nuestra muestra así como la clasificación en la escala de Grafar-Méndez Castellano, también se muestran los datos de los RN.

En la Tabla 2 se observa el valor en porcentaje del área total de cada uno de los ácidos grasos considerados en nuestro

análisis en T0. En esta Tabla 2, se puede notar que cerca del 80% de los ácidos grasos de la leche está representado por la suma de los ácidos grasos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1, n-9) y linoleico (LN) (18:2, n-6). En cuanto a los ácidos grasos de cadena larga, de 20 ó más carbonos, es importante destacar el muy bajo contenido del ácido docosahexaenoico (DHA), de la serie n-3 (Tabla 2). En la Tabla 3 se muestran las desviaciones absolutas después de la exposición de las muestras a 4°C y 15°C durante 8 horas. Para simplificar se omiten los datos de 15°C y 25°C y 24 horas que mostraron mucho más variación. Sólo indicamos los valores correspondientes a los ácidos araquidónico (AA), eicosapentaenoico (EPA) y DHA, porque todos los otros ácidos grasos mostraron variaciones bajas (<5%). Para la elaboración de esta tabla se toma como 100% el dato correspondiente al ácido graso de la muestra inmediatamente congelada a -70°C (T0).

Tabla 2
Porcentaje de los ácidos grasos en las leches maternas maduras en tiempo cero (T0)

Acidos grasos	%
6:0	0,2 ± 0,3
8:0	0,3 ± 0,3
10:0	1,2 ± 0,6
11:0	0,06 ± 0,05
12:0	5,8 ± 2,4
14:0	6,01 ± 2,5
14:1n-5	0,2 ± 0,09
15:0	0,3 ± 0,08
16:0	22 ± 1,4
16:1n-7	3 ± 0,8
17:0	0,33 ± 0,07
17:1n-7	0,23 ± 0,06
18:0	6 ± 1,6
18:1n-9	30,7 ± 4,4
18:2 n-6	18,7 ± 3,4
18:3 n-6	0,2 ± 0,08
18:3 n-3	1,03 ± 0,4
20:0	0,15 ± 0,04
20:1n-6	0,28 ± 0,13
20:2 n-6	0,4 ± 0,117
20:3 n-6	0,44 ± 0,12
20:4 n-6	0,44 ± 0,14
20:5 n-3	0,14 ± 0,16
22:6 n-3	0,17 ± 0,09
Σ n-6	21,2 ± 0,8
Σ n-3	1,5 ± 0,08
LC-PUFA n-6	1,6 ± 0,074
LC-PUFA n-3	0,3 ± 0,041
AA/DHA	2,8 ± 0,2
LN / ARA	49 ± 3,8

Promedio ± EE N = 20 LC: larga cadena
PUFA: ácidos grasos poliinsaturados LN: linoleico
ARA: araquidónico

Tabla 3

Desviaciones absolutas desde el valor “Tiempo 0” de los ácidos grasos C20:4 n6, C20:5n3 y C22:6n3, después de la exposición de las muestras a 4°C y 15°C durante 8 horas

Te/T	% C20:4 n6	% C20:5 n3	% C22:6 n3
4°C/ 8hs	6.3 (2.5)	16 (5)	17 (7)
15°C/ 8hs	9.7 (4)	12 (5)	11 (5)

Te/ T = Temperatura de exposición/ Tiempo

Los restantes ácidos grasos tuvieron desviaciones absolutas de < 5%

DISCUSION

Las madres venezolanas estudiadas muestran que la leche madura que segregan tiene un contenido bajo de ácidos grasos esenciales de cadena larga de la serie n-3, si se compara con los datos publicados de madres de países occidentales desarrollados. Notoriamente bajo es el porcentaje de DHA con un promedio de 0,17%, ninguna de las muestras supera el valor de 0,4%. Comparado con poblaciones asiáticas el valor de 0,17±0,09 % es notoriamente bajo en relación al 0,8±0,1% reportado en las mujeres tailandesas (11). Contrasta esto con el contenido de los ácidos de la serie n-6 que muestran valores de los más altos encontrados en la literatura médica.

Esta situación se parece a las publicadas para poblaciones con dietas pobres en grasas y ricas en carbohidratos como los que se han encontrado en China, Chile y Brasil (12,13,14) Esta característica de la serie n-3 se destaca más claramente cuando observamos que al hacer el cálculo de la cantidad de DHA que la leche de cada madre puede entregar a un niño que ingiera unos 750 mL/día de leche, que se presenta en la Tabla 4, no alcanza en promedio a los 70 mg que se han considerado necesarios para sostener el crecimiento de las estructuras del sistema nervioso y la retina. Un 30% de las madres está por debajo de 50mg cuando se calcula el aporte de DHA proveniente del ácido αlinolénico (LNA) en 1%. La situación mejora muy poco considerando una tasa de conversión del 10%. De modo que para poder suministrar 70 mg/día o más de DHA, sin contar con la conversión de otros ácidos grasos de la serie n-3, tendríamos que tener una concentración de DHA en la leche cerca de 0,4%, valor éste muy por encima de los escasos 0,17% que hemos encontrado como promedio de nuestra muestra. La suma de todos los LC-PUFA n-3 (Tabla 2), sólo alcanza a 0,3%.

TABLE 4
Consumo estimado de C22:6 n3 por los lactantes con una ingesta de 750mL/día de leche materna. (Calculada según Uauy y col (10))

LM Grasa total (g/ml)	LM % C18:3 n3	LM % C22:6	Cantidad de grasa de LM ingerida por el lactante (g/día)	Consumo de C22:6 n3 por el lactante (mg/día)
0,03 ± 0,01	1,24 ± 0,41	0,17 ± 0,07	22,4 ± 8,2	66,37 ± 30,97

LM= leche materna (n = 20)

Por el contrario, la serie n-6 se encuentra bien representada debido al alto contenido de LN y a una cantidad de AA parecida a las encontradas en poblaciones con una alimentación más adecuada. El alto valor de LN en comparación con los datos de poblaciones de países industrializados de occidente, seguramente deriva del uso muy frecuente de aceites vegetales ricos en este ácido graso (soja, girasol, maíz, ajonjolí, maní) en la preparación de los alimentos (15). En este contexto es importante notar en la Tabla 2, que las relaciones LN/AA > 20 y AA/DHA > 3 difieren bastante de las recomendadas, 0.5-1 y 1 a 2 respectivamente. Todos estos datos nos permiten afirmar que la mayoría de estas madres producen una leche que escasamente puede suministrar la cantidad de DHA necesaria para garantizar el crecimiento de las importantes estructuras que lo necesitan. Este problema es de gran importancia si consideramos que en caso de tener el neonato un bajo peso al nacer, la demanda que debe sostener la leche es mayor y más prolongada y la inmadurez del niño no permite una tasa de conversión alfa linolénico (18:3 n-3, LNL) hacia AA ni siquiera de 1%. Es muy probable que los tejidos del neonato (hígado, piel, músculos) puedan servir de reservorio para sostener el crecimiento más crítico del SNC y la retina. En nuestro laboratorio recientemente hemos mostrado evidencias de que en la rata ese rol puede asumirlo el tejido adiposo marrón ya que el tejido adiposo blanco no contiene DHA en cantidades apreciables (16).

Por todos estos argumentos consideramos de importancia que se defina con más amplitud estas peculiaridades de la composición de la leche materna, sobre todo si se toman en cuenta las diferencias regionales que existen en Venezuela en el consumo de alimentos de origen marino y las debidas al marcado gradiente socioeconómico.

En este trabajo además, mostramos que si bien la mayor parte de los ácidos grasos de la leche materna pueden tolerar varias horas a temperatura de unos 25°C, los ácidos LC-PUFA son muy vulnerables. En La Tabla 3 sólo damos los datos de la variación de AA y DHA en muestras de leche dejadas 8 horas a dos temperaturas (4°C y 15°C). Se ve que el porcentaje de variación con respecto al valor T0, es inaceptablemente

alto. Se propone, en consecuencia, que las muestras, pocos minutos después de tomadas en recipientes estériles, deban ser llevadas bajo hielo seco al laboratorio en pocas horas y luego mantenerlas a -70 °C hasta el momento del análisis.

REFERENCIAS

- Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH and Michaelsen KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progress in Lipid Res* 2001; 40:1-94.
- Willard DE, Harmon SD, Kaduce TL, Preuss M, Moore SA, Robbins MEC and Spector AA. Docosahexaenoic acid Synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocyte. *J Lipid Res* 2001 ; 42: 1368-1376.
- Kaduce TL, Chen Y, Hell JW and Spector AA. Docosahexaenoic acids synthesis from n-3 fatty acids precursors in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 2008; 105 (4): 1525-1535.
- Jorgensen MH, Hernell O, Hughes E and Michaelsen KF. Is there a relation between docosahexaenoic acid concentration in mothers' milk and visual development in term infants? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32: 293-296.
- Crawford MA, Doyle W, Drury P, Lenon A, Costeloe K and Leighfield M. N-6 and n-3 fatty acids during early human development. *J Intern Med* 1989; 225 suppl1: S159-169.
- Innis SM. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Adv Exp Med Biol*. 2004; 554: 27-43.
- Folch J, Lees M and Slone-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 1957; 54:497-507.
- Méndez CH, Méndez MC. Sociedad y Estratificación. Método Graffar-Méndez Castellano. Caracas: Fundacredesa; 1994.
- Ghebremeskel K, Leighfield M, Leaf A, Costeloe K and Crawford M. Fatty acid composition of plasma and red cell phospholipids of preterm babies fed on breast milk and formulae. *Eur J Pediatr* 1995; 154:46-52.
- Uauy R, Hoffman DR, Mena P, Llanos A, Birch EE. Term infant studies of DHA and ARA supplementation on neurodevelopment: results of randomized controlled trials. *J Pediatr* 2003; 143 Suppl4: S17-25.
- Golfetto I, McGready R, Ghebremeskel K, Min Y, Dubowitz L, Nosten F, Drury P, Simpson JA, Arunjerja R, Crawford MA. Fatty acid composition of milk of refugee Karen and urban Korean mothers. Is the level of DHA in breast milk of Western women compromised by high intake of saturated fat and linoleic acid? *Nutr Health* 2007; 18(4): 319-332.
- Ruan C, Liu X, Hongsheng M, Xiulan M, Guizheng L, Gianhong D, De Franchesco CA and Connor WE. Milk composition of women from five different regions of China: the great diversity of milk fatty acids. *J Nutr* 1995; 125: 2993-2998.
- Milad M, Mena P, Nieto S and Uauy R. Fatty acid composition of human milk lipids in Chilean women. *Acta Pediatr* 2004; 93(6): 855-860.

14. Cunha J, Macedo da Costa TH, Ito MK. Influences of maternal dietary intake and suckling on breast milk lipid and fatty acid composition in low-income women from Brasilia, Brazil. *Early Hum Dev.* 2005; 81(3): 303-11.
15. Dubnov G, Berry EM. Omega-6/omega-3 fatty acid ratio: the Israeli paradox world. *Rev Nutr Diet* 2003; 92: 81-91.
16. Venezuela A, Cuevas C y Bosch V. ¿Funciona el tejido adiposo marrón como un depósito de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga durante el desarrollo postnatal del cerebro?. *Arch Latinoamer Nutr* 2007; 57(1): 5-9

Recibido: 06-08-2008

Aceptado: 09-02-2009