

*Universidad de Buenos Aires*  
*Facultad de Farmacia y Bioquímica*

Diferenciación de leche y productos lácteos  
enriquecidos naturalmente en compuestos  
antioxidantes

Licenciada en Tecnología de Alimentos Luciana Rossetti

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Directora de Tesis: Dra. Adriana María Descalzo

Consejera de Estudio: Prof. Dra. Nora Haydee Slobodianik

Lugar de trabajo

Área Estabilidad Oxidativa y Compuestos Funcionales, Instituto Tecnología de  
Alimentos, INTA

Buenos Aires, Octubre 2015

## RESUMEN IN EXTENSO

Existe una creciente necesidad de agregar valor a la leche mediante su transformación en productos lácteos de calidad integral, diferenciados por atributos valorados comercialmente tanto en el ámbito del consumo local como mundial.

Las modificaciones tendientes a aumentar la concentración de los compuestos beneficiosos como vitaminas, carotenoides y ácidos grasos, o disminuir la predisposición a la oxidación en los productos lácteos, pueden ser efectuadas a través de la dieta de los animales. Esto tiene la ventaja que de esta forma, la leche es enriquecida a través de un proceso natural. En el caso de las vitaminas por ejemplo, sus formas activas se incorporan en el seno de la matriz láctea, a diferencia de un agregado exógeno. Además, las dietas a base de pasturas generan una imagen positiva de producción ecológicamente sustentable que puede ser objetivamente confirmada y calificada. Por lo tanto, este sistema de producción puede ser beneficioso para obtener un producto con características diferenciales.

Las vitaminas y sus precursores tienen funciones biológicas esenciales. Actúan como antioxidantes inhibiendo la oxidación lipídica tanto en la leche como en el organismo. Además colaboran en mantener la calidad óptima de la materia prima y de los productos elaborados. En la leche, la vitamina A y los carotenoides quedan casi en su totalidad en el seno y membranas del glóbulo de grasa. La vitamina E en cambio se aloja principalmente en la membrana y no en el seno del glóbulo de grasa. Por lo tanto, la capacidad de estos compuestos bioactivos para actuar está relacionada con la presencia de grasa. Además el hecho de que estén incorporados a las membranas y glóbulos tiene implicancias en la biodisponibilidad de estos compuestos, resultando este medio un elemento de gran valor como sistema de entrega de nutrientes.

Para poder lograr leche y productos diferenciados, fue necesario conocer el estado general en cuanto a la concentración de micronutrientes y el

balance antioxidante de leches en nuestro país. Por otro lado, para poder modular la oferta de estos compuestos en la dieta, también se debía conocer la composición en micronutrientes de la misma. Para esto se realizaron ensayos de cuantificación de leche de tambos comerciales de la cuenca Santafesina y de los alimentos utilizados. Se encontró una correlación entre la alimentación del ganado lechero con la concentración de estos compuestos de interés, además de una relación estacional, que podrían servir para diferenciar la calidad de la leche.

Al realizar ensayos de cinética de incorporación de compuestos antioxidantes provenientes de pastura fresca -en este caso con un 70% de alfalfa- en la leche, se determinó que en 20 días su composición se modificaba, lográndose una leche con características diferenciales, mayores niveles de vitaminas antioxidantes y precursores y con una mayor capacidad antioxidante, por lo que sería menos susceptible a la oxidación. Además se diferenciaron las leches provenientes de alimentación con altos niveles de pastura comparadas con los tratamientos control en cuanto a la expresión de genes asociados a la incorporación de vitaminas y aspectos sensoriales como color y aroma.

Dado que la condiciones productivas no siempre permiten altas asignaciones de pastura en la dieta, se realizaron ensayos con un nivel intermedio de alfalfa, más parecido a los sistemas de producción utilizados en el país. Y ya que se había observado un efecto estacional en la calidad y composición de la leche y los alimentos, se ensayaron dos épocas del año. Fue importante también determinar que los compuestos incorporados se conservaran en los productos lácteos. Para ello, se eligió ensayar con dos productos con características muy distintas en cuanto a su elaboración y consumo, leche entera en polvo y un queso duro con seis meses de maduración.

Con los resultados obtenidos, se estimó que un nivel óptimo de 50% de pastura de alfalfa lograba la modificación diferencial de las leches. También se observó que la estación influye sobre la incorporación de estos compuestos, no sólo por la calidad de las pasturas sino también por

otros efectos ambientales o fisiológicos de las vacas lecheras que influirían sobre el consumo de antioxidantes y la oxidación en la leche. Resultó importante corroborar que las características de la leche cruda se transfirieron a los productos lácteos elegidos de modo que el planteo del manejo de la dieta para la obtención de productos diferenciales y potencialmente funcionales fue demostrado.

Por último, para continuar con el estudio de las combinaciones anti y prooxidantes resultó importante estudiar si los cambios producidos a partir de la materia prima que se vieron reflejados en el producto, por ejemplo en la leche en polvo, tienen implicancias sobre su vida útil (bioquímica y sensorial), la presencia de compuestos bioactivos y la funcionalidad en el producto. Para ello, se realizó el seguimiento de la vida útil de la leche en polvo elaborada, observando que el aumento de los antioxidantes liposolubles, especialmente alfa tocoferol, beta caroteno y retinol, sirvió para preservarla de los efectos de la oxidación. Además la degradación de los antioxidantes resultó inversamente proporcional al incremento de la oxidación proteica y lipídica en las leches elaboradas. Este efecto pudo ser seguido a través de parámetros no destructivos como la determinación de olor por medio de sensores y de fluorescencia a través de indicadores de deterioro protéico y lipídico. De este modo podría proponerse la metodología basada en estos ensayos para la detección rápida de deterioro oxidativo de leche en polvo (y otros productos asociados como fórmulas) a nivel de la industria.

## RESUMEN

Para agregar valor a la leche se realizaron ensayos para mejorar la capacidad antioxidante a través de la dieta de los animales.

Para obtener datos basales se ensayaron leches de tambos comerciales y de los alimentos utilizados encontrándose una correlación entre ellos, además de una relación estacional.

Ensayos de cinética de incorporación de compuestos antioxidantes de pastura fresca en la leche, determinaron que en 20 días su composición se modificaba, lográndose una leche con mayor capacidad antioxidante. Dado que las condiciones productivas no permiten altas asignaciones de pastura en la dieta, se ensayaron dos niveles de alfalfa y dos épocas del año. Para determinar la transferencia de los compuestos incorporados a productos lácteos, se estudiaron en leche entera en polvo y en queso duro. Se vio que un nivel de 50% de pastura lograba la modificación diferencial de las leches y que la estación influye sobre la incorporación de estos compuestos. Las características de la leche cruda se transfirieron a los productos lácteos. Al realizar el seguimiento de la leche en polvo para ver la implicancia en la vida útil, se observó que el aumento de los antioxidantes liposolubles sirvió para preservarla de los efectos de la oxidación.

## **ABSTRACT**

In order to add value to milk, assays were performed to improve antioxidant capacity through the diet of animals.

For basal data, milk from dairy farms and the diets used were assayed giving a correlation between them as well as a seasonal correlation. Incorporation kinetics of fresh pasture antioxidants into milk, showed that in 20 days the composition of milk was modified yielding a product with higher antioxidant capacity. Since production conditions do not always allow high pasture levels in the diet of dairy cows, two alfalfa concentrations during two different seasons were assayed. To determine the transfer of incorporated compounds into milk products, powdered milk and mature cheese were studied. It was estimated that pastures with approximately 50% alfalfa would be able to modify the quality of milk and that the season influences the incorporation of these compounds. The characteristics of raw milk were transferred to milk products. The study of the shelf life of powdered milk showed that increased concentrations of liposoluble antioxidants were able to preserve it from oxidation effects.

## DEDICATORIA

*A mi familia....*

*A mis viejos, incondicionales, siempre dispuestos, no me alcanzan las palabras*

*A Diego, también incondicional, por bancarme, apoyarme siempre y hacerme reír*

*Y los más importantes, a mis tres hijos, Andy, Agus y Mati, son los motores que me  
mueven*

*Los amo y les agradezco eternamente a todos.*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mi directora Adri Descalzo que me ha dado todas las oportunidades, la ayuda y el empuje. Siempre buscando más para el grupo y el instituto. Por las horas de trabajo pero más aún por las charlas y buenos momentos.

A los directivos del ITA, por haberme permitido realizar este trabajo.

Un agradecimiento especial a Sergio, mi amigo, por las charlas, los mates y el trabajo. A Caro siempre dispuesta para ayudar y participar, por el apoyo y el aliento. A los dos por hacerse cargo de todo estos últimos meses.

A Gaby también, ayuda invaluable, especialmente con los papeles y las charlas y más mate.

A Ana, por no matarme con la estadística y por haberme regalado mucho de su tiempo.

A Adri chiquita, por la ayuda, especialmente en esta última etapa.

A los que todos los días comparten la alegría, las tristezas, las charlas y un poco de trabajo. Seba, Silvi (los viajes), Andrea y todos los del área.

A todos los compañeros del instituto con los que compartimos el trabajo diario.

A la gente de Rafaela, Roxy, Luciana, Miguel, por el trabajo en conjunto.

A todos los que no nombro pero que considero igual.

A todos, muchas gracias.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS .....	xix
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Definición de Leche.....	1
1.2 Situación actual.....	1
1.3 Principales cuencas lecheras y razas. ....	2
1.4 Sistemas de producción.....	3
1.5 Composición de la leche.....	4
1.5.1 Grasa.....	5
1.5.2 Proteínas.....	6
1.5.3 Lactosa.....	8
1.5.4 Minerales y sales.....	8
1.5.5 Vitaminas.....	9
1.6 Factores que afectan la composición de la leche.....	10
1.7 Dietas pastoriles y calidad de pasturas.....	10
1.7.1 Antioxidantes de los alimentos: vitaminas liposolubles. ....	10
1.7.2 Antioxidantes en los alimentos: polifenoles.....	13
1.7.3 Compuestos volátiles de los alimentos como potenciales trazadores de la dieta animal. ....	13
1.7.4 Ácidos grasos en los alimentos. ....	14
1.7.5 Efecto de la dieta sobre la composición de la leche cruda. ....	15
1.8 Capacidad antioxidante en leche.....	16
1.8.1 Mecanismos de oxidación en leche.....	20
1.9 Leche en Polvo. ....	24
1.9.1 Elaboración de leche en polvo. ....	26

1.9.2	Oxidación de LEP y sus consecuencias sobre la vida útil. ....	27
1.10	Queso con maduración.....	28
1.11	Metodología específica utilizada.....	29
2.	MATERIALES Y MÉTODOS. ....	32
2.1	Diseño de ensayos de campo.....	32
2.1.1	Determinación de niveles de antioxidantes y oxidación basal en leche cruda de tambos comerciales de la cuenca central argentina. ....	32
2.1.2	Descripción química de los alimentos usados en las dietas de vacas lecheras. ....	33
2.1.3	Efecto de la dieta a través de la inclusión de alfalfa en los niveles de antioxidantes y oxidación en leche cruda.....	34
2.1.4	Efecto de la dieta y la estación en los niveles de antioxidantes y oxidación en leche y productos lácteos.....	38
2.1.5	Vida útil LEP.....	43
2.2	Análisis comunes a los distintos ensayos .....	45
2.2.1	Tratamiento de muestras de alimentos .....	45
2.2.2	Tratamiento de muestras de leche cruda. ....	45
2.2.3	Tratamiento de muestras de leche en polvo.....	45
2.2.4	Tratamiento de muestras de queso para todos los análisis.....	46
2.2.5	Determinación de vitaminas antioxidantes (alfa y gama tocoferol, beta caroteno, retinol y colecalciferol). ....	46
2.2.6	Determinación de lactoferrina.....	48
2.2.7	Determinación de oxidación lipídica: Compuestos Reactivos al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). ....	49
2.2.8	Determinación de la actividad antioxidante total: Método de Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). ....	49
2.2.9	Determinación de Fluorescencia.....	50

2.2.10	Análisis de Color. ....	50
2.2.11	Parámetros lactológicos de calidad de leche. ....	51
2.2.12	Perfil de olor mediante nariz electrónica (NE-MS) ....	51
2.2.13	Determinación de ácidos grasos. ....	52
2.2.14	Determinación de compuestos volátiles. ....	53
2.2.15	Extracción de RNA. ....	53
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	57
3.1	Determinación de niveles de antioxidantes y oxidación basal en leche cruda de tambos comerciales de la cuenca central argentina. ....	57
3.1.1	Concentración de alfa tocoferol a lo largo de 12 meses. ....	58
3.1.2	Concentración de gama tocoferol a lo largo de 12 meses. ....	59
3.1.3	Concentración de retinol y beta caroteno a lo largo de 12 meses. ....	60
3.1.4	Oxidación lipídica a lo largo de 12 meses. ....	63
3.1.5	Poder antioxidante total a lo largo de 12 meses. ....	63
3.1.6	Conclusiones del ensayo. ....	67
3.2	Descripción química de los alimentos usados en las dietas de vacas lecheras. ....	68
3.2.1	Antioxidantes naturales: vitaminas liposolubles. ....	68
3.2.2	Antioxidantes naturales: polifenoles. ....	72
3.2.3	Compuestos volátiles. ....	72
3.2.4	Ácidos grasos. ....	74
3.2.5	Conclusiones del ensayo. ....	76
3.3	Modificación en la concentración de antioxidantes naturales en leche mediante la inclusión de alfalfa en la dieta de vacas lecheras. ....	77
3.3.1	Composición general y contenido de antioxidantes en la leche. ....	77

3.3.2	Perfil de ácidos grasos e inducción de oxidación. ....	88
3.3.3	Parámetros de calidad sensorial instrumental. ....	91
3.3.4	Análisis de datos quimiométricos. ....	94
3.3.5	Expresión de genes asociados a la actividad antioxidante en leche. 97	
3.3.6	Conclusiones del ensayo.....	103
3.4	Relación entre compuestos bioactivos de origen vegetal y calidad de la leche cruda y productos lácteos. Efecto de la dieta y la estación. ....	104
3.4.1	Calidad de la dieta.....	104
3.4.2	Calidad de leche cruda.....	107
3.4.3	Micronutrientes y balance oxidativo en leche cruda. ....	109
3.4.4	Tratamiento quimiométrico de datos. ....	126
3.4.5	Productos Lácteos. Leche Entera en Polvo.....	129
3.4.6	Productos Lácteos. Queso de pasta dura madurado. ....	141
3.4.7	Conclusiones del ensayo.....	144
3.5	Efecto de la dieta en la vida útil de leche entera en polvo. ....	145
3.5.1	Vitamina E. ....	145
3.5.2	Beta caroteno. ....	147
3.5.3	Retinol. ....	147
3.5.4	Vitamina D <sub>3</sub> . ....	149
3.5.5	Capacidad antioxidante.....	150
3.5.6	Oxidación. ....	150
3.5.7	Hexanal. ....	152
3.5.8	Color.....	152
3.5.9	Uso de Fluorescencia de fase frontal para la determinación de calidad de leche en polvo.....	155

3.5.10	Balance antioxidante.....	158
3.5.11	Factores de discriminación de leches en polvo según la dieta de las vacas lecheras.....	161
3.5.12	Ensayo de discriminación de muestras.....	163
3.5.13	Conclusiones del ensayo. ....	170
4.	CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS .....	172
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	175

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Producción nacional de leche, año 2012 .....	2
Figura 1-2 Producción por provincia agosto 2015.....	3
Figura 1-3 Estructura química del retinol .....	16
Figura 1-4 Estructura química del beta caroteno .....	17
Figura 1-5 Estructura química del tocoferol y sus isómeros.....	17
Figura 1-6 Mecanismo de oxidación lipídica, etapas de iniciación y propagación ...	22
Figura 1-7 Exportación de leche en polvo .....	25
Figura 2-1 Esquema general del ensayo efecto de la inclusión de alfalfa en la dieta .....	36
Figura 2-2 Esquema general de ensayo de efectos de dieta y estaciones.....	40
Figura 2-3 Esquema general de elaboración de leche entera en polvo (LEP) .....	41
Figura 2-4 Esquema general de elaboración de queso reggianito .....	42
Figura 3-1 Porcentaje de forraje en la dieta por tambo durante 1 año .....	57
Figura 3-2 Concentración promedio y desvío de alfa tocoferol ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ leche) en leche de todos los tambos evaluados.....	58
Figura 3-3 Concentración de alfa tocoferol ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ leche) en leche de dos tambos seleccionados .....	59
Figura 3-4 Concentración promedio y desvío de gama tocoferol ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ leche) en leche de todos los tambos evaluados .....	60
Figura 3-5 Concentración promedio y desvío de beta caroteno en leche de todos los tambos evaluados ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ leche). .....	61
Figura 3-6 Concentración de beta caroteno en leche de dos tambos seleccionados ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ leche).....	61
Figura 3-7 Concentración promedio y desvío de retinol ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ leche) en la leche de todos los tambos evaluados.....	62
Figura 3-8 Concentración de retinol ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ leche) en leche de dos tambos seleccionados.....	62

Figura 3-9 Valores promedio y desvío de TBARS (meq MDA/ kg leche) en leche de todos los tambos evaluados.....	63
Figura 3-10 Valores de FRAP (eq FeSO <sub>4</sub> ) en leche de todos los tambos evaluados. ....	64
Figura 3-11 Dinámica de incorporación de alfa tocoferol a la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación. ....	80
Figura 3-12 Dinámica de incorporación de gama tocoferol a la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días.....	81
Figura 3-13 Cromatograma de tocoferoles y carotenos por detección EQ.....	82
Figura 3-14 Dinámica de incorporación de beta caroteno a la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación. ....	83
Figura 3-15 Dinámica de incorporación de retinol a la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación.....	84
Figura 3-16 Dinámica de incorporación de vitamina D <sub>3</sub> a la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación. ....	85
Figura 3-17 Capacidad antioxidante total medida por la técnica de FRAP de la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación .....	86
Figura 3-18 Dinámica de incorporación de vitamina C a la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación .....	87
Figura 3-19 Concentración de lactoferrina de la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación.....	88
Figura 3-20 Concentración de TBARS y Hexanal de leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación.....	91

Figura 3-21 Análisis factorial discriminante del perfil de aroma analizado por NE-MS .....	92
Figura 3-22 Evolución del parámetro L* en leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación .....	93
Figura 3-23 Evolución del parámetro a* en leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación .....	93
Figura 3-24 Evolución del parámetro b* en leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación .....	94
Figura 3-25 Análisis discriminante de todas las variables del ensayo por la metodología de PLS. ....	96
Figura 3-26 Beta Lactoglobulina (396 bp) 5 µl 1 kb marcador PM (línea 1) y 19 µl de producto de PCR de Tejido graso (línea 2), Hígado (línea 3), Músculo (línea 4), Gl. mamaria (línea 5), Leche (células somáticas) (línea 6), T Sanguíneo (línea 7). ....	99
Figura 3-27 Esquema de incorporación de vitaminas antioxidantes en el organismo .....	100
Figura 3-28 Expresión de células somáticas. ....	101
Figura 3-29 Expresión de gen αTAP y AoxP en relación a la concentración de alfa tocoferol.....	102
Figura 3-30 Expresión de gen αTTP en relación a la concentración de alfa tocoferol .....	103
Figura 3-31 Relación de alfa y gama tocoferol y beta caroteno según el porcentaje de pastura en la dieta para cada estación.....	107
Figura 3-32 Relación entre ingesta diaria de alfa tocoferol y su concentración en la leche.....	110
Figura 3-33 Relación entre ingesta diaria de gama tocoferol y su concentración en la leche .....	111
Figura 3-34 Relación entre ingesta diaria de beta caroteno y su concentración en la leche.....	112



Figura 3-35 Relación entre la concentración de retinol y beta caroteno en leche cruda de primavera y otoño .....	113
Figura 3-36 FRAP hidro y liposoluble .....	115
Figura 3-37 Conglomerado jerárquico por método de Ward .....	120
Figura 3-38 Análisis discriminante de las variables seleccionadas .....	121
Figura 3-39 Relación entre ácidos grasos n-6 y n-3 de leche cruda en primavera y otoño .....	126
Figura 3-40 AD de los compuestos volátiles y sensores de nariz electrónica en las muestras de leche cruda para Primavera y Otoño en los tratamientos 0, 35 y 70% de alfalfa .....	127
Figura 3-41 AD de los compuestos volátiles y ácidos grasos en las muestras de leche cruda para Primavera y Otoño en los tratamientos 0, 35 y 70% de alfalfa .....	128
Figura 3-42 Comparación de vitaminas antioxidantes: alfa tocoferol, beta caroteno y retinol en leche en polvo (expresado por ml) y cruda para los tratamientos en primavera y otoño .....	132
Figura 3-43 LEP de primavera de los tratamientos A0, A35 y A70 .....	136
Figura 3-44 Relación entre ácidos grasos n-6 y n-3 de LEP en primavera y otoño .....	139
Figura 3-45 AD de los compuestos volátiles y sensores de nariz electrónica en las muestras de LEP para Primavera y Otoño en los tratamientos 0, 35 y 70% alfalfa ...	140
Figura 3-46 AD de los compuestos volátiles y ácidos grasos en las muestras de LEP para Primavera y Otoño en los tratamientos 0, 35 y 70% alfalfa.....	141
Figura 3-47 Quesos madurados de primavera de los tratamientos A0, A35 y A70	143
Figura 3-48 Concentración de alfa tocoferol en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).....	146
Figura 3-49 Concentración de gama tocoferol en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).....	146
Figura 3-50 Concentración de beta caroteno en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).....	147

Figura 3-51 Concentración de retinol en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).....	148
Figura 3-52 Relación entre la concentración de beta caroteno y retinol en la leche en polvo.....	148
Figura 3-53 Concentración de D <sub>3</sub> en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).....	149
Figura 3-54 Valor de FRAP en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).....	150
Figura 3-55 Valor de TBARS en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).....	151
Figura 3-56 Valor de Hexanal en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).....	152
Figura 3-57 Evolución de L* (I), a* (II) y b* (III) durante la vida útil de LEP para los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).....	154
Figura 3-58 Fluorescencia por fase frontal para variables de oxidación en LEP. I: Peróxidos lipídicos a 420nm, II: Ditirosina, III: Oxidación de Proteínas.....	156
Figura 3-59 Fluorescencia por fase frontal para Triptofano.....	157
Figura 3-60 Fluorescencia por fase frontal para Riboflavina.....	158
Figura 3-61 Modelos de regresión cuadrática para I: alfa tocoferol; II: beta caroteno; III: FRAP; IV: TBARS; V: Hexanal y VI: Ditirosina.....	159
Figura 3-62 AD de todas las variables consideradas en este ensayo por PLS. ....	161
Figura 3-63 AD de las muestras de leche en polvo evaluadas de 0 a 12 meses para los tratamientos A0, A35 y A70.....	164
Figura 3-64 AD de las muestras de leche en polvo evaluadas de 13 a 18 meses para los tratamientos A0, A35 y A70.....	166
Figura 3-65 AD de las muestras de leche en polvo evaluadas en el tiempo de 13 a 18 meses. Gráfico de las dos funciones de mayor peso (FD1 y FD2).....	167
Figura 3-66 AD de las muestras de leche en polvo evaluadas de 13 a 18 meses con las variables de fluorescencia. Gráfico de las dos funciones de mayor peso (FD1 y FD2).....	170

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Composición promedio de la leche entera .....	5
Tabla 3-1 Valores promedio de vitaminas, antioxidantes, oxidación lipídica y capacidad antioxidante para todos los tambos evaluados.....	64
Tabla 3-2 Concentración de antioxidantes liposolubles en componentes dietarios usados en los distintos experimentos.....	71
Tabla 3-3 Concentración de polifenoles en componentes dietarios usados en los experimentos realizados en INTA con vacas lecheras .....	72
Tabla 3-4 Terpenoides volátiles presentes en componentes dietarios usados en los ensayos de INTA con vacas lecheras .....	73
Tabla 3-5 Aldehídos volátiles presentes en los componentes dietarios usados en los ensayos de INTA con vacas lecheras .....	74
Tabla 3-6 Composición de ácidos grasos (%), extracto etéreo (EE) y mg/g EE de C18:2 y C18:3 de cultivos de alfalfa en distintas estaciones del año.....	75
Tabla 3-7 . Ácidos grasos en componentes dietarios usados en los ensayos en INTA .....	75
Tabla 3-8 Composición de la dieta para vacas con tratamiento 70% Alfalfa (A70) y 0% Alfalfa (A0).....	78
Tabla 3-9 Composición de la leche cruda.....	78
Tabla 3-10 Consumo diario (mg/v/d) de vitaminas en cada tratamiento .....	79
Tabla 3-11 Perfil de ácidos grasos de la leche A0 y A70 .....	89
Tabla 3-12 Cebadores usados para ensayo de expresión génica .....	98
Tabla 3-13 Interpretación de expresión de genes de células somáticas de leche .	101
Tabla 3-14 Composición de dietas por tipo de alimento. ....	105
Tabla 3-15 Cálculo del aporte en vitaminas antioxidantes liposolubles de las diferentes dietas según la estación del año .....	105
Tabla 3-16 Composición química y producción de la leche obtenida.....	108
Tabla 3-17 Medias y nivel de significancia obtenidos en primavera y otoño para las variables analizadas mediante ANOVA en leche cruda .....	109

Tabla 3-18 Porcentaje de pastura de alfalfa necesaria para lograr los máximos valores de alfa tocoferol y beta caroteno en leche cruda .....	112
Tabla 3-19 Medias y nivel de significancia obtenidos en primavera para las variables analizadas mediante ANOVA en leche cruda.....	118
Tabla 3-20 Medias y nivel de significancia obtenidos en otoño para las variables analizadas mediante ANOVA en leche cruda.....	119
Tabla 3-21 Aldehídos volátiles para leche cruda proveniente de las distintas alimentaciones con alfalfa para primavera .....	123
Tabla 3-22 Aldehídos volátiles para leche proveniente de las distintas alimentaciones con alfalfa para otoño .....	123
Tabla 3-23 Composición de ácidos grasos de leche cruda obtenida a partir de vacas alimentadas con diferentes proporciones de alfalfa en la dieta en primavera y otoño	124
Tabla 3-24 Composición química de la leche en polvo obtenida .....	130
Tabla 3-25 Medias y nivel de significancia obtenidos en primavera y otoño para las vitaminas y capacidad antioxidante mediante ANOVA en LEP .....	131
Tabla 3-26 Medias y nivel de significancia obtenidos en primavera para las variables de color y aroma analizadas mediante ANOVA en LEP .....	134
Tabla 3-27 Medias y nivel de significancia obtenidos en otoño para las variables de color y aroma analizadas mediante ANOVA en LEP .....	135
Tabla 3-28 Aldehídos volátiles para LEP proveniente de las distintas alimentaciones con alfalfa para primavera y otoño .....	137
Tabla 3-29 Composición de ácidos grasos de leche en polvo obtenida a partir de vacas alimentadas con diferentes proporciones de alfalfa en la dieta en primavera y otoño .....	138
Tabla 3-30 Composición química del queso elaborado .....	142
Tabla 3-31 Medias y nivel de significancia obtenidos en primavera y otoño para las vitaminas y color analizadas mediante ANOVA en queso reggianito .....	143
Tabla 3-32 Ecuaciones de modelización de la oxidación para las leches A0, A35 y A70 .....	160
Tabla 3-33 Funciones discriminantes lineales de Fisher evaluadas por tratamiento entre 0 y 12 meses. ....	164

Tabla 3-34 Funciones discriminantes lineales de Fisher evaluadas por tratamiento entre 13 y 18 meses. ....	165
Tabla 3-35 Funciones discriminantes lineales de Fisher evaluadas por tiempo entre 13 y 18 meses. ....	167
Tabla 3-36 Funciones discriminantes lineales de Fisher con las variables de fluorescencia y evaluadas por tiempo entre 13 y 18 meses. ....	169
Tabla 3-37 Funciones discriminantes lineales de Fisher con las variables de fluorescencia y evaluadas por tiempo entre 13 y 18 meses. ....	170

## **HIPOTESIS DE TRABAJO**

Es posible aumentar los microconstituyentes antioxidantes (tocoferoles, carotenoides, retinol) en la leche a través de la introducción de pastura de alfalfa en la dieta de las vacas lecheras. Esto tendrá efecto sobre la calidad integral de la leche y de los productos lácteos derivados como leche en polvo y quesos.

Se puede establecer un modelo de alimentación de las vacas lecheras basado en pasturas, en el cual se preservarán los compuestos bioactivos naturales a través de su procesamiento y almacenamiento y que a su vez permitirá la diferenciación y trazabilidad de los lácteos enriquecidos naturalmente en estos compuestos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Generar conocimiento acerca del efecto de la alimentación de las vacas lecheras con diferentes concentraciones de pastura de alfalfa sobre la calidad de la leche cruda, su posibilidad de diferenciación y el efecto de los antioxidantes liposolubles de la materia prima sobre productos procesados modelo, como leche en polvo y quesos.

### **Objetivos particulares**

Conocer el estado de arte en cuanto a la concentración de micronutrientes y el balance antioxidante de leches de tambos comerciales de la República Argentina.

Determinar si el efecto de la alimentación de las vacas lecheras con pastura de alfalfa permite el enriquecimiento de las leches crudas con vitaminas antioxidantes, protege retardando a la oxidación, modula su mecanismo de incorporación a la leche y si dicho efecto persiste en el tiempo.

Establecer el efecto de la “dosis alfalfa” sobre los cambios producidos en la leche cruda y conocer su efecto estacional.

Conocer si las características de la leche cruda diferenciada persisten en productos modelo elaborados a escala piloto, leche entera en polvo y quesos de pasta cocida tipo Reggianito Argentino.

Modelar el efecto de los antioxidantes incorporados en la leche entera en polvo y la progresión de la oxidación durante la vida útil en el transcurso del almacenamiento de la leche en condiciones de comercialización.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Definición de Leche.**

Según el Codex Alimentarius (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011), la leche como alimento destinado al consumo o elaboración ulterior, en su codex standard 206-199 indica que: "Leche es la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenida mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior".

En nuestro país, el texto que regula las disposiciones higiénico-sanitarias, bromatológicas y de identificación comercial es el Código Alimentario Argentino. Se refiere a la leche en su Artículo 554 - (Res 22, 30.01.95) y la define como: "Con la denominación de Leche sin calificativo alguno, se entiende el producto obtenido por el ordeño total e ininterrumpido, en condiciones de higiene, de la vaca lechera en buen estado de salud y alimentación, proveniente de tambos inscriptos y habilitados por la Autoridad Sanitaria Bromatológica Jurisdiccional y sin aditivos de ninguna especie. La leche proveniente de otros animales, deberá denominarse con el nombre de la especie productora".

### **1.2 Situación actual.**

La cadena bovina constituye uno de los complejos agroalimentarios más importantes y dinámicos del país, con proyección internacional, responsable del desarrollo económico y social de numerosas economías zonales y regionales. El valor de esta actividad se ubica en el cuarto lugar de importancia nacional después de la soja, el trigo y la carne, con una producción de más de 11.300 millones de litros de leche producidos anualmente, de acuerdo a los últimos datos publicados por el Ministerio de Agricultura (Figura 1-1),

[http://www.minagri.gob.ar/site/\\_subsecretaria\\_de\\_lecheria/lecheria/07\\_Estad%C3%ADsticas/2012estadisticas.jpg](http://www.minagri.gob.ar/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07_Estad%C3%ADsticas/2012estadisticas.jpg)).



RESULTADOS RECIENTES DE LA LECHERÍA ARGENTINA	
Producción	11.338 millones de lts.
Consumo Local	8.918 millones de lts.
Exportaciones	2.492 millones de lts.

**Figura 1-1 Producción nacional de leche, año 2012**

La cadena genera unos 65- 67 mil empleos directos y otros 63 mil indirectos. Es por ello que la valorización de la leche y productos lácteos impacta sobre un sector productivo muy importante del país.

### 1.3 Principales cuencas lecheras y razas.

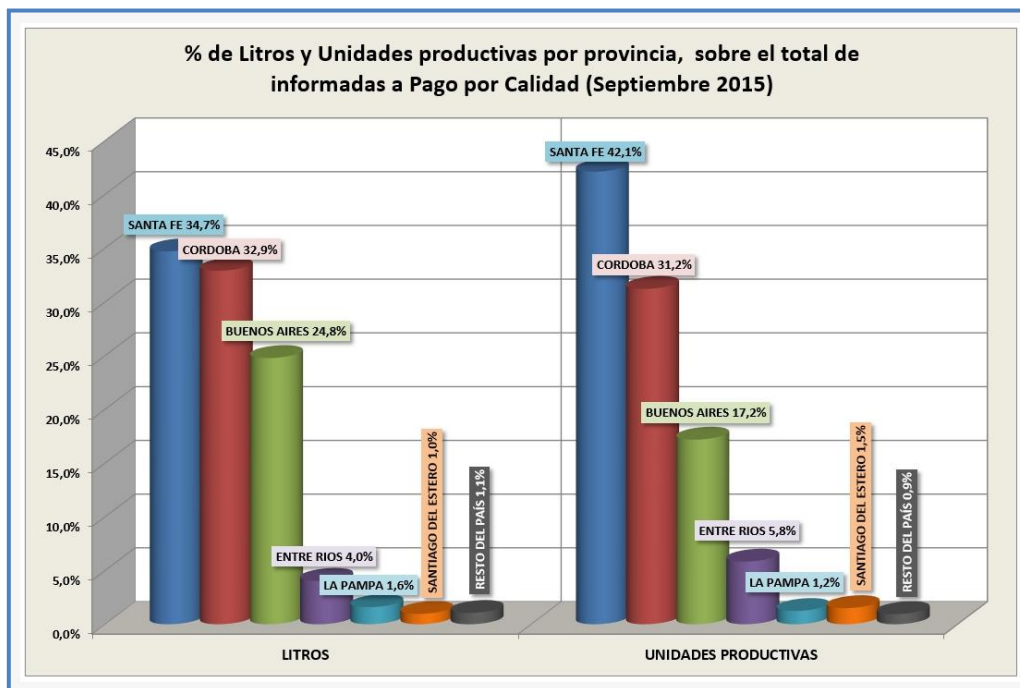
La producción lechera de nuestro país se puede dividir en cuencas lecheras tradicionales y cuencas lecheras no tradicionales.

Las tradicionales son las que están ubicadas en la región pampeana (zona central de Argentina) conformada por las provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires, Entre Ríos y La Pampa. Son caracterizadas por poseer un "clima templado" con temperaturas medias entre los 16 y 18 °C y precipitaciones entre los 720 y 900 mm anuales. La inmensa mayoría de la producción proviene de esta cuenca con un 94% de la producción total. Además, la mayor cantidad de industrias procesadoras también se encuentran concentradas en estas provincias con porcentajes de participación similares a los de la producción (Figura 1-2), [http://www.minagri.gov.ar/site/subsecretaria\\_de\\_lecheria/lecheria/04=Pago\\_por\\_Calidad/07\\_Estadisticas/19.jpg?20151001112427](http://www.minagri.gov.ar/site/subsecretaria_de_lecheria/lecheria/04=Pago_por_Calidad/07_Estadisticas/19.jpg?20151001112427)). La raza lechera mayoritaria es la Holando Argentino, con una producción promedio de 3.876 litros de leche/vaca/año.

Las cuencas no tradicionales comprenden la de Cuyo, integrada por las provincias de Mendoza, San Juan y San Luis; la del NOA, integrada por Salta, Jujuy, Catamarca, Tucumán y Santiago del Estero y la del NEA, integrada por Corrientes, Chaco, Misiones y Formosa. Son caracterizadas por poseer un "clima subtropical húmedo" con temperaturas medias entre los 21 y 23 °C y precipitaciones entre los 1.200 y 1.700 mm anuales. Las razas

lecheras bovinas en estas áreas son variadas, Holando Argentino, Cruza de Holando Argentino con Jersey, Tropicana, Jersey, Gir Lechero, Pardo Suizo y Criolla.

El desafío en estas cuencas incipientes puede ser el de producir lácteos diferenciados, transformados localmente ya que las cuencas tradicionales producen los volúmenes mayores y por lo tanto fijan los precios de las commodities.



**Figura 1-2 Producción por provincia agosto 2015**

#### 1.4 Sistemas de producción.

Tradicionalmente los sistemas de producción en nuestro país se pueden identificar como extensivos ya que involucran un alto grado de participación de pasturas en la alimentación. Sin embargo, el costo de la tierra y el avance de la agricultura, fundamentalmente el cultivo de soja, ha sido el gran incentivo para aumentar la carga animal por hectárea y el uso de forrajes conservados y concentrados. Por otro lado, lograr un aumento en la producción y de esta manera aprovechar el mérito genético de los animales no es posible sin cierto grado de intensificación.

Por lo tanto, actualmente muchos tambos se han volcado hacia los sistemas mixtos o intensivos. Sin embargo, la viabilidad de estos proyectos y su sustentabilidad productiva y económica no siempre es muy clara. Algunos de los factores que se deben tener en cuenta cuando se intensifican los tambos son el impacto sobre el bienestar animal, niveles óptimos de carga animal/hs, impactos ambientales, salud de los animales, etc. También hay que tener en cuenta que la intensificación de los tambos trae aparejado un aumento en los gastos del tambo, como por ejemplo el costo de alimentos, mano de obra, etc. (Bretschneider and Salado, 2010).

Esta tendencia a reducir la superficie destinada a producir leche es observada mundialmente en otros países productores (Hemme, 2009) y es una oportunidad para proponer estrategias de alimentación y suplementación que aseguren la calidad de la leche al mismo tiempo que se optimiza el uso de los recursos.

### **1.5 Composición de la leche.**

La leche es un líquido opaco, de color blanco a blanco amarillento debido a los fenómenos de reflexión y dispersión de la luz que provocan las partículas en suspensión coloidal, glóbulos de grasa y micelas de caseína. Su sabor es ligeramente dulce debido a la presencia de lactosa y el olor es característico e inespecífico.

Desde el punto de vista físico, la leche es un triple sistema disperso, ya que coexisten en ella varios estados: emulsión, suspensión coloidal y solución verdadera. La materia grasa se acumula en estructuras relativamente complejas de forma globular formando una emulsión grasa/agua. Las proteínas en forma de micelas y ligadas al fosfato cálcico y otras sales forman la suspensión coloidal y la solución verdadera está formada por la lactosa y sales minerales solubles.

Naturalmente el balance de nutrientes que se encuentra en la leche tiene como objetivo biológico el de cubrir las necesidades de las crías, sin embargo se ha adoptado como alimento esencial y básico con gran

consumo prácticamente en todas las culturas del mundo (Baró Rodríguez et al., 2010)

Dentro de las moléculas que la conforman, se puede hacer una división entre dos grandes grupos que comprenden a los componentes principales y los componentes menores (Tabla 1-1 Composición promedio de la leche entera Tabla 1-1).

**Tabla 1-1 Composición promedio de la leche entera**

Componentes Principales	%
Agua	87,0- 88,0
Grasa	2,8- 4,0
Proteínas totales	3,1- 3,5
Proteínas verdaderas	3,0- 3,1
Nitrógeno No Proteico (NNP)	0,15- 0,2
Caseína	2,3- 2,5
Albúmina	0,50
Globulina	0,05
Lactosa	4,5- 5,0
Minerales (calcio, magnesio, fósforo, sodio, potasio, cloro, azufre)	0,7- 1,0
Extracto Seco Total	12,1- 13,0
Extracto Seco No Graso	8,5- 9,0
<hr/>	
Componentes Menores	
Fosfolípidos y esteroides	
Vitaminas lipo e hidrosolubles	
Sustancias nitrogenadas no proteicas	
Gases	
Pigmentos	
Enzimas	
Ácidos	

### 1.5.1 Grasa.

La grasa de la leche está constituida en su mayor parte por triglicéridos (98%). Éstos están acompañados de pequeñas cantidades de mono y diglicéridos, colesterol libre y ésteres de colesterol, ácidos grasos libres, vitaminas A, D, E, carotenoides, xantófilas y fosfolípidos. Estos últimos constituidos principalmente por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, esfingomiélinea, etc., que representan aproximadamente el 1% de la grasa.

Como se mencionó, la grasa se encuentra en forma de glóbulos esféricos en emulsión en el suero. En la leche sin homogeneizar, el tamaño de estos glóbulos varía entre 2- 10  $\mu\text{m}$ . En el centro del glóbulo se encuentran básicamente el colesterol, las vitaminas y los triglicéridos de bajo punto de fusión. Rodeando a éstos se encuentran los triglicéridos de mayor punto de fusión junto con fosfolípidos, formando una membrana en forma de bicapa que tiene asociada una gran cantidad de proteínas (entre ellas enzimas), metales, etc. Estos glóbulos están cargados negativamente, con lo cual se repelen favoreciendo la emulsión. Sin embargo la presencia en la membrana de globulinas con propiedades aglutinantes hace que los glóbulos tiendan a formar grandes agregados de glóbulos grasos y se separe la fase grasa cuando se deja la leche en reposo. La homogenización de la leche hace que esto no ocurra ya que el tamaño de los glóbulos disminuye y se producen cambios en la superficie de los mismos, haciendo que se incorporen proteínas del suero que presentan menor tendencia a la aglutinación.

Respecto a los ácidos grasos presentes en la grasa láctea, se encuentran aquellos de cadena corta y media, como el butírico (que es específico de la leche de rumiantes), cáprico y láurico. Tiene alta concentración de ácidos grasos saturados y poca cantidad relativa de insaturados, sin embargo el contenido y composición de éstos puede variar por factores tales como especie, estadio de lactancia, raza, dieta, etc.

Un comentario especial merece el color de la leche. El color blanco puede estar influenciado por la presencia de mayores o menores concentraciones de carotenos, ya que se disuelven en la materia grasa y su presencia depende de la alimentación del animal. Cuando las vacas son alimentadas con pasturas frescas, la grasa se enriquece en estas sustancias y adquiere un tono más amarillo.

### 1.5.2 Proteínas.

Hay dos tipos de compuestos nitrogenados en la leche, las proteínas y las sustancias no proteicas, conocidas como nitrógeno no proteico (NNP). Se diferencian por el tamaño de sus moléculas, en donde las proteínas están

compuestas por uniones complejas de aminoácidos que forman estructuras de pesos moleculares desde los 12000 hasta los 380 kD.

Dentro del grupo de las proteínas se puede distinguir entre las caseínas y las proteínas del lactosuero. Las caseínas constituyen el 80% de las proteínas totales de la leche, tienen un gran número de aminoácidos de importancia y se dividen en cuatro subgrupos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  y  $\gamma$ -caseína). Se agrupan en polímeros constituidos por centenares o miles de moléculas individuales y como se dijo antes, se encuentran en suspensión coloidal formando micelas esféricas de caseína. Dentro de las micelas también hay presencia de calcio, fosfato, citratos y magnesio que ayudan a mantener esta suspensión, siendo la carga de las micelas negativas. Estas proteínas son de gran importancia en la industria láctea para la elaboración de quesos y productos fermentados.

Por otro lado, las proteínas del lactosuero suponen el 20% del total y presentan una gran afinidad por el agua, estando solubilizadas en ella. Están conformadas por  $\alpha$ - lactoalbúmina,  $\beta$ - lactoglobulina, albúmina sérica, proteasas-peptonas, inmunoglobulinas, lactoferrina, transferrina, etc. Suelen quedar en el suero de la leche en la elaboración del queso, especialmente en los quesos maduros y se pueden separar del suero por procesos de ultrafiltración, siendo en las últimas décadas de gran importancia para la industria de los alimentos dado que tienen un alto valor nutritivo (Bhat and Bhat, 2011; Özer and Kirmaci, 2010).

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína de 80 KDa, producida por las células epiteliales de las mucosas de los mamíferos. Pertenece a la familia de las proteínas transportadoras de hierro, denominadas transferrinas. La Lf presenta una alta homología entre especies, localizándose en secreciones mucosas como lagrimas, saliva, fluidos seminales y vaginales. Sin embargo, es en la leche y particularmente en su calostro, donde se encuentra en mayor concentración. La leche de vaca contiene como término medio 0,1 g/L de lactoferrina (Fox, 2003).

Actúa como transportador de metales esenciales en el recién nacido y es un componente importante del sistema inmune innato, que exhibe propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, antibacterianas y antivirales, entre otras.

Por último, cabe destacar la presencia en la leche de numerosas enzimas, entre ellas las lipasas, fosfatasas y proteasas. Algunas de ellas sirven como indicadores de la presencia de enfermedades tales como mastitis o del tratamiento térmico efectuado en la leche.

### 1.5.3 Lactosa.

Es el principal hidrato de carbono de la leche, seguido de pequeñas cantidades de otros azúcares (como glucosa y galactosa), glucolípidos, glucoproteínas y oligosacáridos.

La concentración de este compuesto varía a lo largo del ciclo de lactancia y es el componente mayoritario del extracto seco de la leche. Es el compuesto que le da el sabor dulce, a pesar de tener menor poder edulcorante que la sacarosa. Es sensible al calor, pudiendo reaccionar a raíz de los tratamientos térmicos, formando compuestos pardos en las reacciones de Maillard o a partir de la caramelización de sus moléculas (Boelrijk et al., 2003; Fox, 2003). Además su presencia es importante para la elaboración de leches fermentadas y quesos frescos ya que puede ser fermentada por bacterias (Bhat and Bhat, 2011).

### 1.5.4 Minerales y sales.

La leche contiene sales inorgánicas como los fosfatos y orgánicas como los citratos y están constituidas por cationes metálicos y aniones orgánicos e inorgánicos. Los minerales más importantes en cuanto a su concentración son el calcio, potasio, fósforo, cloro, sodio y magnesio y sulfatos y en concentraciones más bajas pero no por eso menos importante en su función, se encuentran el zinc, cobre, iodo y hierro (Baró Rodríguez et al., 2010).

Los principales componentes salinos de la leche como el calcio, magnesio, fosfatos y citratos se encuentran, una parte en la fase coloidal de

la leche, asociados a las micelas y otra en disolución. Este efecto se conoce como “equilibrio iónico de la leche” y es de suma importancia para mantener la estabilidad de la misma. Este equilibrio es frágil, de manera que numerosos factores como temperatura, pH, etc. pueden alterarlo. Esta propiedad es utilizada en numerosos procesos en la industria elaboradora de productos lácteos, por ejemplo para lograr la correcta coagulación en el caso de los quesos, o para mantener la estabilidad en el caso de la leche esterilizada.

#### 1.5.5 Vitaminas.

La leche contiene una variedad de vitaminas, aunque algunas de ellas estén presentes naturalmente en pequeñas cantidades. Podemos encontrar en la fase grasa, vitaminas A, D y E y en la fase hidrosoluble tiamina, riboflavina, vitamina C, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, niacina y folato (Baró Rodríguez et al., 2010; Fox, 2003). Además puede contener en mayor o menor medida, carotenoides precursores de la vitamina A (Calderón et al., 2007b).

Algunos de estos compuestos tienen actividad antioxidante y se pueden agrupar por su modo de acción como antioxidantes preventivos o de ruptura de reacciones en cadena. Los preventivos actúan buscando oxígeno singulete y fotosensibilizantes excitados que pueden iniciar la oxidación. Algunos de los preventivos también están involucrados en la quelación de metales. Los de ruptura de reacciones en cadena participan directamente deteniendo las reacciones que se han iniciado, actuando en la etapa de propagación (Laguerre et al., 2007).

La concentración de estas vitaminas y sus precursores depende en gran medida de la alimentación del ganado y su estado de salud (Lerch et al., 2015; Nozière et al., 2006b). Debe tenerse en cuenta que en los productos procesados, en algunos casos como leche descremada, debe ser adicionada con los compuestos liposolubles (vitaminas A, D, E y carotenos) ya que se retiran con la fase grasa.

Algunos de estos compuestos se discutirán en mayor detalle en el punto 1.8.



## **1.6 Factores que afectan la composición de la leche.**

Son diversos los factores que afectan la composición y producción de la leche, los cuales se dividen en dos grandes grupos, el primero es el que abarca los factores inherentes exclusivamente al animal. De éstos, los más importantes son el grado de desarrollo de la ubre (número de células excretoras), la etapa de la lactación, el número de lactancias, la edad, el tamaño del animal, peso corporal y gestación, todos estos factores están controlados por la genética animal.

El segundo grupo abarca todos los factores de manejo que se les proporciona a las vacas, como temperatura, humedad, disponibilidad de agua, adecuada higiene en el ordeño, eficiente retiro de la leche, número de ordeños, cuidado de la salud de los animales y la nutrición. La nutrición y por ende la dieta suministrada a las vacas es uno de los instrumentos más importantes de aplicación a nivel de productores para modificar los componentes y mejorar la producción de leche (Calderón et al., 2006; Nozière et al., 2006a).

## **1.7 Dietas pastoriles y calidad de pasturas.**

La dieta del animal es cada vez más considerada por los consumidores como un criterio importante al juzgar la calidad del producto. En particular, las dietas a base de pasturas, generan una imagen positiva, de producción ecológicamente sustentable o natural que puede ser objetivamente confirmada y calificada. Los ácidos grasos, los carotenoides y las vitaminas liposolubles de la leche y los productos lácteos pueden ser reconocidos como potenciales compuestos trazadores de la alimentación (Martin et al., 2005b).

### **1.7.1 Antioxidantes de los alimentos: vitaminas liposolubles.**

Los metabolitos secundarios de origen vegetal son incorporados a los tejidos a través de la dieta. Entre ellos, el alfa tocoferol es la principal forma activa de la vitamina E en los tejidos animales. Este isómero se incorpora mayoritariamente entre los ocho posibles (alfa, beta, gama y delta tocoferol y

los respectivos tocotrienoles) que se encuentran naturalmente en las plantas. La vitamina E es el principal antioxidante liposoluble incorporado a las membranas de las células que regula importantes funciones celulares (Baldi and Pinotti, 2008).

Los niveles de alfa tocoferol en los alimentos son influenciados por la especie utilizada y dependen principalmente del grado de madurez de la planta, además del método de conservación de la misma (Hidiroglou and Batra, 1996; Müller et al., 2007). Pagan et al. (2005) demostraron que la vitamina E proveniente de fuentes naturales como la pastura era más efectiva para aumentar los niveles de tocoferol en plasma de caballos que la vitamina E sintética. De esta manera se demuestra que es rentable esforzarse por mantener los niveles de vitaminas en los forrajes conservados similares a los niveles originales de las pasturas frescas, tanto desde un punto de vista fisiológico como económico.

En general, el proceso de ensilado suele conservar mejor estos compuestos que el de preparación de heno, siempre y cuando el silo esté correctamente preservado (Müller et al., 2007). Esto se consigue, entre otros factores, evitando la oxidación que se ve aumentada por el calor y la radiación ultravioleta. Las hojas contienen mayores niveles de alfa tocoferol que los tallos y a medida que envejece la planta la relación hojas-tallo disminuye, por lo tanto disminuye también el nivel de alfa tocoferol.

Otro grupo importante de compuestos antioxidantes en los alimentos son los carotenoides. Son productos secundarios de los vegetales que contienen ocho unidades isoprénicas (C40) y por su naturaleza química son pigmentos naturales. Hay alrededor de 800 carotenoides conocidos, sin embargo aproximadamente 10 han sido encontrados en los forrajes, mayormente las xantófilas que contienen oxígeno (luteína, epiluteína, anteraxantina, neoxantina, violaxantina y zeaxantina) y los carotenos de naturaleza hidrocarbonada.

El beta caroteno es el pigmento mayormente responsable de la coloración amarilla de los productos lácteos. Su origen es exclusivamente del forraje y

su concentración también depende principalmente de las especies de plantas, el estadio de desarrollo y la forma de conservación de ese forraje. La mayor concentración de carotenos se encuentra en las hojas de los forrajes, entre 5 a 10 veces más que en los tallos y se degradan fácilmente. Esto es debido a la presencia de numerosos dobles enlaces en estos compuestos que cuando se corta el forraje para la alimentación animal sufre oxidación e isomerización (formación de isómeros cis- partiendo de su forma trans), principalmente por la acción del oxígeno atmosférico, el calor y la luz (Müller et al., 2007). Las concentraciones de luteína y beta caroteno pueden ser 2 a 3 veces mayores en climas húmedos que en climas secos (Nozière et al., 2006a).

La pastura y el silaje de pastura tienen mayor concentración de carotenos que el maíz o los cereales. Todos éstos contienen mayores proporciones que el heno ya que, como se mencionó, estos compuestos son degradados por la luz durante el secado y su posterior preservación. Las proporciones de carotenos entre los forrajes cultivados como alfalfa, avena, pasto ovido, raigrás y trébol entre otros, no varían demasiado entre especies.(Martin et al., 2005b).

El beta caroteno en la pastura fresca (verde) es la principal fuente de vitamina A para animales que pastorean, aunque otros carotenoides también tienen importancia nutricional (Baldi and Pinotti, 2008; Nozière et al., 2006a). El beta caroteno y la luteína pueden ser utilizados como marcadores de la alimentación de los animales con pasturas frescas. Dado que los animales no sintetizan estas moléculas, una vez absorbidas son depositadas en la grasa y se las encuentra en leche y carne (Prache et al., 2005). En los bovinos, el beta caroteno es el que se encuentra en mayor proporción. La persistencia de estos carotenoides en la sangre cuando los animales son llevados a alimentación en corral es corta, por esto las concentraciones de estos compuestos podrían servir como buen indicador de alimentación con pasturas.

Entonces, como regla general, se puede concluir que las pasturas aportan mayor concentración de alfa tocoferol, beta caroteno, luteína que otros

componentes de la dieta, mientras que los componentes con cereal y oleaginosas aportan mayores concentraciones de gama tocoferol. El heno de alfalfa contiene aproximadamente la décima parte de los compuestos que aporta la pastura fresca (Müller et al., 2007).

#### 1.7.2 Antioxidantes en los alimentos: polifenoles.

Otro grupo de compuestos de interés presente en los alimentos para el ganado son los polifenoles. Estos compuestos tienen función antioxidante. Las moléculas bioactivas en estos compuestos son las isoflavonas que en las plantas se encuentran unidos a carbohidratos. Entre los forrajes, algunas leguminosas (ciertos tréboles y alfalfa) contienen niveles altos de isoflavonas. Pueden constituir hasta 2% de la materia seca en algunas especies de tréboles (*Trifolium purpureum*) y se conservan bien con el ensilado. En el rumen, las formas activas daidzeína y formononetina son transformadas en equol. Por otra parte, Besle et al. (2010) encontraron distintos compuestos fenólicos que pueden ser usados como marcadores de las dietas del ganado lechero. Los polifenoles y los antocianos en general se encuentran polimerizados y de esa forma no son absorbidos en el intestino.

#### 1.7.3 Compuestos volátiles de los alimentos como potenciales trazadores de la dieta animal.

Los terpenos son marcadores directos del tipo de dieta ingerida porque no son modificados por el metabolismo animal. Además, la transferencia de estos compuestos a la grasa láctea es muy rápida y aparentemente no habría efecto memoria (Viallon et al., 2000). Este tipo de análisis sería un indicador del tipo de alimentación reciente de los animales. Por esta razón, la presencia de estos compuestos en leche y productos lácteos podría ser usada para discriminar condiciones de alimentación contrastantes (Prache et al., 2005).

El trans-2-hexenal, originado en las flores, parecería tener un rol en la polinización de las plantas y podría indicar el estado fenológico de las pasturas en el momento de recolección de la leche (Pecetti et al., 2002).

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las pasturas genera aldehídos volátiles. Elevados niveles de estos ácidos grasos en las pasturas frescas pueden relacionarse entonces con una mayor concentración de hexanal, como producto final de la degradación del ácido linoleico y de trans-2-hexenal como resultado de la degradación de los ácidos grasos n-3, especialmente el linolénico. Estos ácidos grasos se pueden oxidar cuando se corta la pastura fresca, produciendo los correspondientes aldehídos. Tanto los aldehídos como los terpenos son responsables de los aromas típicos de las distintas especies de plantas y pueden encontrarse posteriormente en leche y productos lácteos.

#### 1.7.4 Ácidos grasos en los alimentos.

Los ácidos grasos insaturados, especialmente los poliinsaturados (PUFA n-3) y el ácido linoléico conjugado (CLA) podrían ser beneficiosos contra las enfermedades coronarias (Adler et al., 2013a; Prandini et al., 2007). La leche y la carne son las únicas fuentes sustanciales de CLA en la dieta humana y esto parecería estar relacionado al consumo de pasturas frescas por parte de los rumiantes. Hay escasa información acerca de la composición de los ácidos grasos en los lípidos de las pasturas. El pasto fresco contiene una alta proporción (50-75%) del total de ácidos grasos en la forma de n-3 ácido linolénico. Los perfiles de ácidos grasos son característicos a las especies, dato que confirma que la composición de los ácidos grasos de las pasturas tiene un considerable control genético (Dewhurst et al., 2001). Esto posibilita la elección de pasturas con altas concentraciones o perfiles de ácidos grasos favorables.

Los factores que influyen en la variación del perfil de grasas vegetales son la especie, el estado madurativo, la temperatura y la intensidad de la luz. Además, el intervalo de corte y los factores de manejo tienen una gran influencia en los niveles de ácidos grasos. Las pasturas frescas son mejor fuente de PUFA que los ensilados ya que la fermentación y el marchitado puede hacer disminuir los valores de ácidos grasos, en especial el del ácido linoléico (Elgersma et al., 2003).

#### 1.7.5 Efecto de la dieta sobre la composición de la leche cruda.

Los tocoferoles y carotenoides provenientes de las plantas son transferidos a los productos animales tales como yema de huevo, lácteos, grasa, etc. en mayor o menor medida. Estos compuestos, en la leche de vaca y productos lácteos son importantes para la nutrición y salud humana como antioxidantes y precursores de la vitamina A, (siendo el all-trans-beta caroteno la provitamina más importante).

Se debe destacar que los carotenoides son pigmentos, por lo tanto su presencia es la responsable de modificar el color amarillo de la grasa animal y de la leche y productos lácteos, en lo que atañe al presente trabajo.

Los consumidores son influenciados por el color de los productos y por ejemplo para los europeos, el color amarillo de los mismos está asociado a las pasturas y por ende se asocia a un sistema de producción en donde los animales han pastoreado, o sea, lleva una connotación “natural” (Prache et al., 2003).

El perfil beneficioso de ácidos grasos que puede proveer una dieta rica en pasturas, se transfiere rápidamente a la leche y productos lácteos (Chilliard et al., 2001; Chinnadurai and Tyagi, 2011; Dewhurst et al., 2006; Elgersma et al., 2004).

Esto llevaría como contrapartida un aumento en la susceptibilidad a la oxidación. Sin embargo, este fenómeno está modulado por la presencia de antioxidantes que al mismo tiempo se incorporan a través de la dieta. Entre los antioxidantes liposolubles más abundantes en el glóbulo de grasa se encuentra el alfa-tocoferol, proveniente de los forrajes o de suplementos (Al-Mabruk et al., 2004). El beta caroteno capta los radicales en la parte interna de las membranas lipídicas, cooperando de esta manera con los tocoferoles (Tsuchihashi et al., 1995). Por lo tanto, la presencia de ambas moléculas antioxidantes contribuye a la protección de la grasa láctea de la oxidación.

## 1.8 Capacidad antioxidante en leche.

Dado que el área de alimentos funcionales hace varios años que está en auge, los consumidores aspiran a tener productos con valor agregado pero sin un aumento sustancial en el costo. Por lo tanto, usar métodos tales como la alimentación con pasturas en los sistemas mixtos de producción en vez del uso de raciones totalmente mezcladas que suelen demandar mayor costo puede ser un beneficio, tanto desde el punto de vista de menor costo de producción, como desde el punto de vista de obtener un producto con características diferenciales.

Así como el contenido y la absorción de macro y micronutrientes en las dietas varía, entre otros factores con el estado fenológico de las plantas o su forma de conservación, en la leche también varía por factores como por ejemplo raza, cantidad de pariciones, estadio de lactancia, estado de salud, etc. (Baldi and Pinotti, 2008; Nozière et al., 2006a).

La vitamina A se encuentra en forma esterificada. La glándula mamaria absorbe el retinol proveniente del hígado, lo esterifica y de esta manera pasa a la leche (Figura 1-3). Como se mencionó, otra fuente de vitamina A en la leche son los carotenos de la dieta, especialmente el beta caroteno que es el precursor que tiene mayor tasa de conversión a vitamina A (6 µg beta caroteno se convierte en 1 µg de retinol) (Baldi and Pinotti, 2008)

La vitamina A tiene funciones biológicas esenciales en la visión, crecimiento y desarrollo, inmunidad y reproducción (FAO/WHO, 2002).

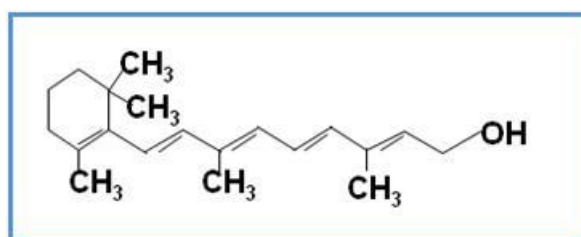
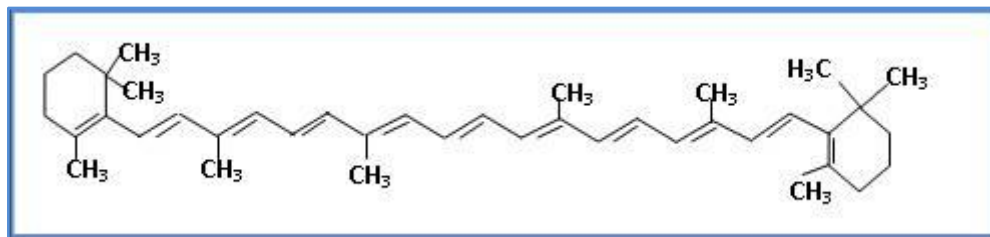


Figura 1-3 Estructura química del retinol

Sin embargo el principal efecto protector del retinol puede estar dado en el ambiente intracelular por los efectos regulatorios en el crecimiento de células normales, mediado por el control de la expresión de genes de

factores de crecimiento, ya sea a través de la regulación de la transcripción de genes que responden al retinol o a sus derivados retinaldehído y ácido retinoico (Baldi and Pinotti, 2008).

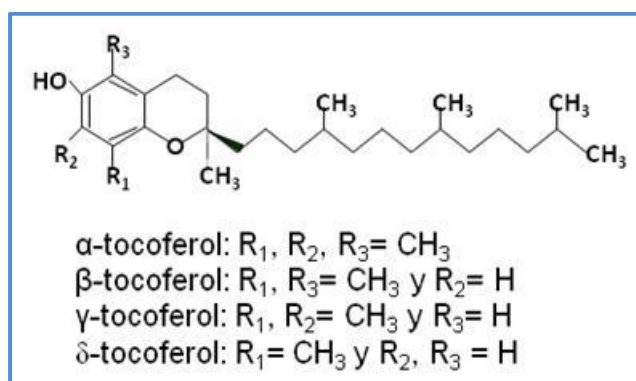
Los carotenoides presentes en la leche son, en mayor medida el all-trans-beta caroteno (entre 75- 90% de los carotenoides totales, Figura 1-4), luteína, zeaxantina y beta criptoxantina (Nozière et al., 2006a).



**Figura 1-4 Estructura química del beta caroteno**

Tienen funciones a nivel de comunicación celular, en la función inmune y en la fertilidad. Su función como antioxidante es preventiva desactivando el oxígeno singulete y además actúa de forma sinérgica a la vitamina E (Nozière et al., 2006b). Además, la absorción del beta caroteno de la leche es especialmente eficiente, en donde 2 µg de beta caroteno rinde 1 µg de equivalentes de retinol (Baldi and Pinotti, 2008; Schwartz et al., 2008).

La vitamina E se encuentra principalmente en su forma de isómero alfa, siendo éste entre el 84- 92% del total (Figura 1-5), mientras que el gama tocoferol y el alfa tocotrienol participan con aproximadamente 5% cada uno (Kaushik et al., 2001).



**Figura 1-5 Estructura química del tocoferol y sus isómeros**



Es uno de los antioxidantes más importantes dado que se localiza en las membranas de los glóbulos de grasa. Actúa tanto como antioxidante preventivo como deteniendo las reacciones en cadena de los radicales libres, por lo tanto evita o retarda el desarrollo de condiciones inflamatorias y degenerativas y está involucrado en el correcto funcionamiento del sistema inmune (Baldi, 2005). En la leche ayuda a mantener la integridad de membrana de los glóbulos de grasa.

Los tocotrienoles han cobrado más interés en los últimos años ya que se ha demostrado que también tienen propiedades como antioxidantes, neuroprotectores y anticancerígenos, más potentes que el alfa tocoferol (Baldi and Pinotti, 2008).

La leche no es una buena fuente de vitaminas D y K y su concentración no está influenciada por la dieta. Sí varía a causa de la exposición de los animales al sol, además de otros factores como el estado funcional del rumen y cantidad de forraje secado al sol (McDowell, 2006).

En cuanto a las vitaminas hidrosolubles, el ácido ascórbico puede actuar con los radicales libres como el anión radical superóxido y oxígeno singulete, entre otros. Sin embargo concentraciones bajas pueden promover la oxidación lipídica al reducir los metales de transición o formar complejos que promueven la formación de oxígeno singulete (Barrefors et al., 1995).

Se ha descrito un sinergismo entre el alfa tocoferol y el ácido ascórbico, al reducir los radicales tocoferilos generados durante la oxidación (Laguerre et al., 2007).

La vitamina A y los carotenoides quedan casi en su totalidad en el seno y membranas del glóbulo de grasa, con cantidades despreciables en el suero. La vitamina E en cambio se aloja principalmente en la membrana y no en el seno del glóbulo. Por lo tanto, la capacidad de estos compuestos bioactivos para actuar está relacionada con la presencia de grasa. Además el hecho de que estén incorporados a las membranas y glóbulos tiene implicancias en la biodisponibilidad de estos compuestos, resultando entonces este medio un elemento de gran valor como sistema de entrega de nutrientes (Baró

Rodríguez et al., 2010). Sin embargo, Hayes et al. (2001) encontraron que la absorción de vitamina E está también ligada a factores inherentes a la bioquímica de la leche, ya que la incorporación de esta vitamina aumenta cuando es suministrada con leche, descremada o no, cosa que no ocurre cuando es suministrada con jugo de naranja o en forma de cápsulas. También indicaron que hay mecanismos de control que regulan la incorporación del alfa tocoferol en las lipoproteínas y tejidos y que este mecanismo es saturable y puede ser modificado. Este sistema involucra la modulación de la proteína de transporte del alfa tocoferol “tocopherol transport protein” ( $\alpha$ -TTP) sintetizada en el hígado y que tiene preferencia por el isómero RRR- alfa tocoferol. Este sistema podría estar exacerbado por algunos factores además de la grasa, como por ejemplo la presencia de proteínas o péptidos producidos durante la digestión y absorción de la leche.

Como las vitaminas E y A son incorporadas a través de la dieta, es importante de estudiar los mecanismos mediante los cuales dichas vitaminas son incorporadas a los tejidos, estudiar la modulación de estos mecanismos por efecto de factores genéticos, nutricionales y ambientales, dado que conociendo los mismos se podrán proponer estrategias con base científica para enriquecer a los alimentos de origen animal en dichos compuestos.

La expresión de genes asociados con el transporte de las vitaminas hacia los tejidos animales, y el estudio de los factores que modulan la misma constituyen un punto de partida para el estudio de posibles marcadores de calidad de vitaminas antioxidantes en carne y leche.

Hasta el momento se han descrito dos proteínas asociadas al transporte de vitamina E a las células ( $\alpha$ -TTP y  $\alpha$ -TAP) (Stocker, 2004), mientras que se han descrito al menos 9 proteínas involucradas en el transporte de vitamina A en sus formas de retinol, retinaldehído y ácido retinóico en plasma y tejidos. Kono and Arai (2015) han publicado una revisión de estos mecanismos.

Ambas vitaminas ingresan al organismo por medio de la dieta, ya que los animales no las sintetizan.

Tanto la vitamina E (existen ocho isómeros naturales-forma RRR-, el alfa, beta, gama y delta tocoferol y los respectivos tocotrienoles) como la vitamina A (en forma de retinil esteres o carotenoides) son absorbidas en el intestino e incorporadas junto a otros lípidos como esteres de colesterol, fosfolípidos, etc. a los quilomicrones sintetizados por los enterocitos, y liberados al sistema linfático, y de allí son incorporados al hígado. Respecto de los tocoferoles, el hígado se selecciona el isomero RRR-alfa tocoferol sobre las demás formas de esta vitamina. El RRR- alfa tocoferol es incorporado luego a las VLDL y sale de los hepatocitos a la circulación sanguínea, en donde alcanzará los órganos blanco. Las formas no incorporadas a VLDL, y los metabolitos del alfa tocoferol, son excretados como CEHCs (Stocker, 2004; Traber and Arai, 1999).

#### 1.8.1 Mecanismos de oxidación en leche.

Uno de los roles de la vitamina E y del beta caroteno en la grasa de la leche es el efecto que ejercen inhibiendo la oxidación lipídica. Bajas concentraciones de vitamina E en la leche la hacen susceptible a la autooxidación, generando sabor a oxidado. Estos cambios pueden desarrollarse poco después del ordeño o con el tiempo en el almacenamiento, especialmente si éste no ocurre en las condiciones adecuadas. Este efecto protector se ha demostrado efectivo cuando se suministran suplementos tendientes a aumentar los ácidos grasos poliinsaturados ya que la leche se hace más vulnerable a la oxidación. En estos casos, se observó un aumento en la vitamina E del plasma. En cambio es menos marcado cuando la manipulación de la dieta consiste en pasar de silajes a pasturas. Sin embargo colaboran en mantener la calidad óptima de la materia prima y esto es muy importante para los productos elaborados.

La estabilidad oxidativa de la leche puede estar influenciada negativamente por factores tales como la presencia de metales de transición, cantidad de insaturaciones en los ácidos grasos y exposición a la luz, que luego dan lugar a la oxidación inducida por luz, la oxidación lipídica y la oxidación proteica. Estos procesos pueden llevar a la aparición de off-

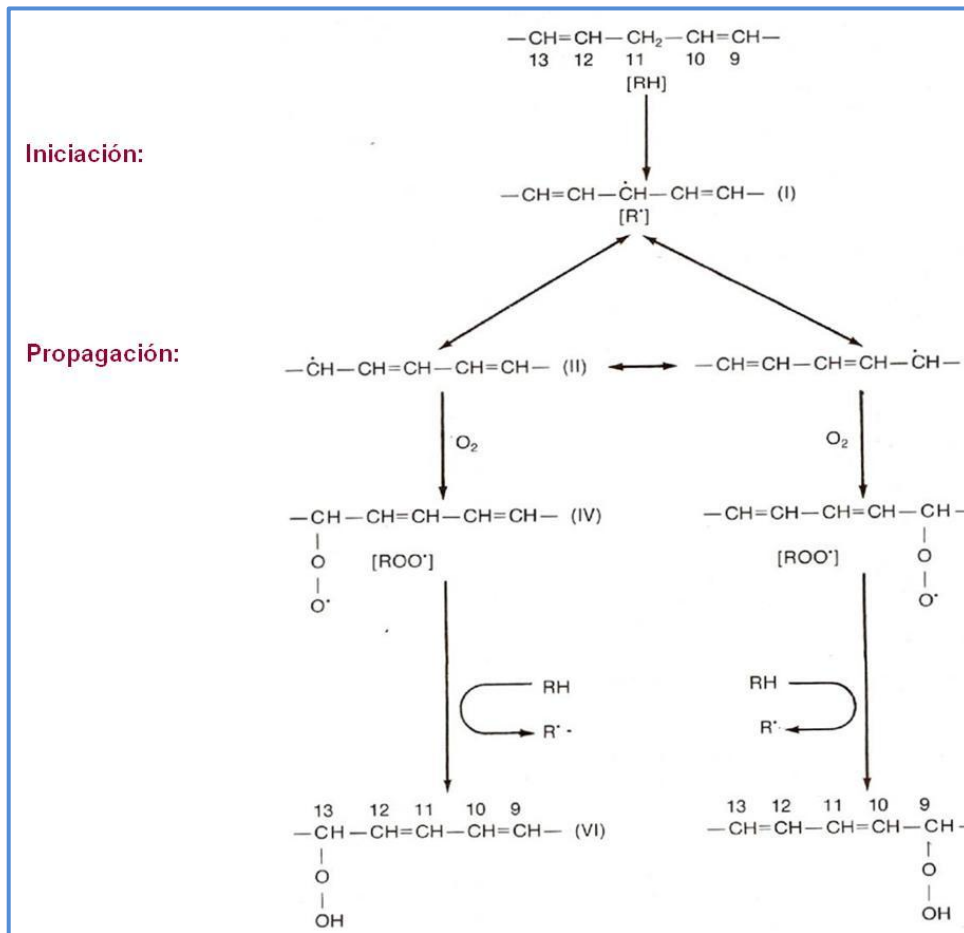
flavors (sabores extraños) y deteriorar la calidad nutricional de la leche (Havemose et al., 2004).

La oxidación inducida por luz se desarrolla en presencia de luz y un fotosensibilizante como la riboflavina, que en este caso actúa como prooxidante. Estas reacciones ocurren en la fase acuosa de la leche y se forman productos como hexanal, pentanal y dimetilsulfóxido (van Aardt et al., 2005). En nuestro país la leche fluida se comercializa en envases de polietileno laminado, en botella PET o HDPE o tetra brik, todos ellos resistentes al paso de la luz. En otros países como Estados Unidos, aproximadamente la mitad de los envases comercializados son HDPE transparentes, por lo que el tiempo de exposición a la luz puede ser de por lo menos 8 horas (Chapman et al., 2002). En estos casos, la posibilidad de que ocurran estas reacciones es mucho más marcada.

La oxidación lipídica es una reacción que se divide en tres etapas, la iniciación, propagación y terminación. En la iniciación se forman radicales libres mediante la sustracción de un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados (o de los peróxidos lipídicos, llamados también hidroperóxidos). Como se mencionó previamente, algunos de los iniciadores que dan lugar a la formación de radicales libres son el oxígeno, el calor, la luz, los metales de transición y algunas enzimas como la xantina oxidasa y la lactoperoxidasa.

La segunda etapa es la de propagación. Se caracteriza por una cierta acumulación de peróxidos lipídicos en donde se crean tantos radicales libres como los que se consumen. Es en esta etapa donde sucede la oxidación de los ácidos grasos insaturados como el ácido linoléico y se forman los productos primarios de la oxidación (Figura 1-6). Estos compuestos no tienen color, olor ni sabor. Finalmente en la etapa de terminación, los radicales libres provenientes de la descomposición de hidroperóxidos, se asocian para formar los productos secundarios de la oxidación que ya no son radicales libres (aldehídos, cetonas de bajo peso molecular, etc.). Estos compuestos son muy estables y son los volátiles responsables de los olores y sabores característicos e indeseables de la rancidez.

Un efecto adverso de este tipo de reacción es la pérdida de antioxidantes como el alfa tocoferol (Havemose et al., 2004).



**Figura 1-6 Mecanismo de oxidación lipídica, etapas de iniciación y propagación**

Hay muchos factores que intervienen en la oxidación lipídica y debido a esto hay muchas maneras de medir estos cambios. Podemos agruparlos según se determine la pérdida de ácidos grasos insaturados, la concentración de productos primarios de la oxidación o la concentración de los productos secundarios. Una forma de medir los productos primarios es a través del valor peróxido. La desventaja de este método se debe a la inestabilidad de estos compuestos.

Respecto a la medición de los productos secundarios, uno de los métodos más usados es el del TBARS (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico). Al ser productos secundarios estables, este método es un poco más preciso y es uno de los más usados.

Este ensayo se basa en la capacidad del ácido tiobarbitúrico (TBA) en reaccionar con el malonaldehído (MDA) formado por la descomposición de los lipoperóxidos, formando un cromóforo rojo con máximo de absorción a 532 nm. Este complejo coloreado está formado por la condensación de dos moles de TBA y uno de MDA en condiciones ácidas. Las unidades en que se expresa este ensayo es la cantidad de MDA (en mg) presentes en un kilo de muestra. Esta prueba se usa para la determinación de ácidos grasos libres, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y fluidos (orina y suero) a partir de células o tejidos.

Sin embargo, este método no siempre es el más adecuado ya que tiene ciertas desventajas. En las reacciones con cadenas de ácidos grasos, solamente reacciona con aquellos que contienen por lo menos tres dobles enlaces, como el ácido linolénico, i.e. en el resultado se excluyen los lipoperóxidos de descomposición del ácido linoléico y oléico. Otra desventaja es que el TBA no reacciona específicamente con el MDA sino que reacciona también con otros aldehídos, productos de la degradación de proteínas y azúcares, amino ácidos y ácidos nucleicos. Por último, en muchos lípidos la formación del MDA puede ser baja o incluso nula, por lo tanto se vería comprometida la eficiencia (Laguerre et al., 2007).

Otro enfoque complementario es medir la capacidad antioxidante de los alimentos. Estos métodos son útiles en la medida que evalúen la actividad antioxidante global del alimento, ya que generalmente son matrices complejas. Se pueden dividir en los ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno o la transferencia de electrones. Un ejemplo del primer grupo es el método ORAC (capacidad de absorbancia del radical del oxígeno), en donde se mediría la capacidad antioxidante de los aminoácidos de la leche para actuar donando hidrógeno (Huang et al., 2005).

Otro ensayo usado de transferencia de electrones es el FRAP (poder de reducir el  $Fe^{3+}$ ). Se basa en que los compuestos antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol, trolox, vitamina C, ácido úrico y la bilirrubina, entre otros, son capaces de reducir el hierro. Éste, a valores de pH bajos, forma un complejo férrico con tripiridiltiazina ( $Fe^{3+}$ -TPTZ) que se reduce a  $Fe^{2+}$ -TPTZ por

acción de los compuestos reductores (antioxidantes) y desarrolla coloración azul proporcional a la cantidad de hierro reducido, que puede monitorearse por espectrofotometría, con un máximo de absorción a 593 nm (Benzie and Strain, 1996).

Los off-flavors inducidos por luz están relacionados con la oxidación proteica y son detectados en una etapa temprana, antes que la oxidación lipídica. Uno de los métodos utilizados para determinar la oxidación proteica es mediante la formación de ditirosina, en donde se supone que la riboflavina activada reacciona con la tirosina, formando ditirosina. En sistemas con distinto tipo de alimentos, el inicio de la oxidación proteica resultó retardada por la presencia de elevadas concentraciones de antioxidantes liposolubles incorporados a través de la alimentación (Havemose et al., 2004).

Los mecanismos de deterioro de la leche y los productos lácteos están entonces altamente influenciados por la calidad de la materia prima ya que la oxidación es un fenómeno que en cierto grado puede prevenirse o detenerse temporalmente por medio de los mecanismos antioxidantes pero sus efectos no se revierten. Estos fenómenos químicos complejos que llevan al deterioro de los productos lácteos afectan directamente la calidad de los mismos, como por ejemplo la leche en polvo y los quesos.

## **1.9 Leche en Polvo.**

De los 11.300 millones de litros de leche producidos en el país, aproximadamente 2300 millones de litros se destinan a la elaboración de leche en polvo y este producto ocupa el 57% (Figura 1-7) de los lácteos exportados,

([http://www.minagri.gob.ar/site/subsecretaria\\_de\\_lecheria/lecheria/07 Estadisticas/2012estadisticas.jpg](http://www.minagri.gob.ar/site/subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07_Estadisticas/2012estadisticas.jpg))



**Figura 1-7 Exportación de leche en polvo**

Además de su utilización como tal, mundialmente es usada en la industria de los alimentos en una amplia variedad de productos. La elaboración de leche en polvo obedece principalmente dos objetivos, aumentar la vida útil y disminuir el costo de transporte de la leche. Además, la leche en polvo posee propiedades físicas y funcionales atractivas para la industria (Rimpiläinen et al., 2015).

La conservación de la leche y productos lácteos de corta vida útil depende principalmente de la inactivación de los microorganismos por distintos medios. A diferencia de esto, en la leche en polvo, por su baja cantidad de agua, tiene un tiempo de vida útil largo y los métodos de conservación se basan principalmente en evitar el deterioro enzimático o de procesos químicos. Sumado a esto, en todos los casos, la calidad de la materia prima es fundamental para la estabilidad de los productos elaborados (Muir, 2011).

En los productos lácteos, cuando se aborda el tema de vida útil, no hay un criterio general definido ni una o varias mediciones objetivas que determinen la finalización de la misma. En estos casos, los cambios que ocurren, fisicoquímicos, químicos o bioquímicos, son los que indican el final de la vida útil.



### 1.9.1 Elaboración de leche en polvo.

La elaboración de leche en polvo puede resumirse principalmente en tres pasos, tratamiento térmico, evaporación y atomización.

El primero es un tratamiento térmico con tres objetivos. El primero es destruir la totalidad de las bacterias patógenas y la mayoría de las no-patógenas, el segundo, inactivar las enzimas que pueden provocar lipólisis durante el almacenamiento como las lipasas, y el último, activar los grupos sulfhidrilos de la  $\beta$ -lactoglobulina al producirse un desdoblamiento parcial de las proteínas, para favorecer la capacidad antioxidante. Estos grupos tiol actúan como dadores de H y de esta manera inactivan los radicales lipoperóxidos libres, formándose a su vez radicales tiol ( $RS^{\cdot}$ ) que actúan como productos de terminación de la lipoperoxidación (Stapelfeldt et al., 1997). De esta manera, el tratamiento térmico de la leche antes de la evaporación es uno de los principales factores para controlar la estabilidad oxidativa del producto. Hay tres tipos de tratamientos térmicos que se aplican, que se distinguen por las temperaturas aplicadas y los usos posteriores. El polvo obtenido de tratamientos de bajas temperaturas se elabora sometiendo la leche a entre 70- 75 °C durante 10 seg. Se caracteriza por tener poca desnaturalización de las proteínas y por este motivo se usa para la elaboración de polvos instantáneos, quesos tipo crema y leches cultivadas. El de tratamiento medio se elabora calentando entre 76,5- 85 °C durante 15 a 30 min. Se caracteriza por tener mayor grado de desnaturalización proteica y se usa generalmente para leche condensada endulzada, leche evaporada, etc. ya que se considera que tiene una buena estabilidad térmica. Por último los polvos elaborados de tratamientos térmicos altos son los sometidos a entre 90 a 120 °C durante 2 min. Éstos tienen mayor grado de desnaturalización que los de menores temperaturas. Al ser corto el tiempo en que la leche esta a alta temperatura, el polvo resulta ser más soluble y de mejor sabor, además se utiliza en los panificados.

Luego hay una etapa de evaporación en donde se concentran los sólidos hasta aproximadamente 45-50%, eliminando aproximadamente el 80% del

agua. Esta etapa es imprescindible por varias razones. Económicamente sería inviable el secado de leche fluida sin concentrar ya que aumentaría mucho el consumo de energía por los tiempos prolongados de secado. Además el polvo resultante, a partir de leche concentrada, tiene mayor vida útil y partículas más grandes con menos aire ocluido, siendo las condiciones óptimas para el secado.

Se ha reportado que altas temperaturas de evaporación durante tiempos largos y valores elevados de sólidos totales aumentan la cantidad de sedimento sin disolver cuando se reconstituye, característica en general indeseada en la leche en polvo (Oldfield et al., 2000).

Por último hay una etapa de atomización que es clave para determinar las propiedades de las partículas como el tamaño y la densidad. El líquido es atomizado y expuesto a una corriente de aire caliente en una cámara seca que elimina el agua restante. El sólido recuperado es un polvo fino de partículas esféricas con algo de aire ocluido y luego es separado por filtros o aire. En esta última etapa el objetivo es que no haya daño en la funcionalidad de los componentes constituyentes de la leche o sus propiedades sensoriales.

#### 1.9.2 Oxidación de LEP y sus consecuencias sobre la vida útil.

Los factores que determinan la vida útil de la LEP obtenida son la calidad de materia prima, el proceso de obtención propiamente dicho, en especial las temperaturas de precalentamiento y evaporación y las condiciones de almacenamiento. Respecto a esto último y especialmente para el caso de la leche entera, uno de los factores más importantes a tener en cuenta es la capacidad para mantener valores bajos de humedad para evitar el deterioro enzimático. Otras formas de mantener la calidad del producto son el uso de atmósfera modificada para desplazar el oxígeno, temperaturas de almacenamiento bajas y envases que no permitan el paso de la luz para no iniciar la autooxidación (Muir, 2011).

Un factor de importancia en la calidad de la leche entera en polvo es la calidad sensorial, que podría definirse a través del color y olor del polvo.

Estas propiedades son dependientes de la composición del polvo, la calidad de la materia prima y el efecto del procesamiento (tratamiento térmico y almacenamiento). En la LEP, la oxidación lipídica es la mayor causa de deterioro de los lípidos con el consiguiente efecto sobre las propiedades sensoriales (Romeu-Nadal et al., 2007). El análisis sensorial con panel entrenado es buen detector de la rancidez, obteniendo valores umbrales muy bajos.

Por este motivo, la concentración inicial de vitaminas antioxidantes podría tener una influencia importante en la calidad de la LEP durante el almacenamiento, especialmente cuando son incorporadas naturalmente en la leche a través de la alimentación (Havemose et al., 2004).

La oxidación en la LEP se puede cuantificar a través de distintos métodos como la determinación de hidroperóxidos para evaluar productos de oxidación primarios, determinación de aldehídos de bajo peso molecular (compuestos volátiles) o determinación de TBARS para los productos de oxidación secundarios, además del análisis sensorial.

#### **1.10 Queso con maduración.**

El queso representa una parte del total de los lácteos consumidos. Por lo tanto, es de interés conocer la composición nutricional del mismo. Mientras que se conocen bien las propiedades nutricionales por su composición de macronutrientes, los micronutrientes como ácidos grasos, vitaminas, compuestos antioxidantes, minerales y elementos traza está menos documentado.

Como se vio, la composición de la leche con la cual se elabora el queso puede variar según un gran número de factores. Acorde a esto, va a verse reflejada la composición del queso. Dependiendo del proceso de manufactura, puede modificarse la composición original de la leche. En general las variaciones que se observaron en leche son parecidas a las que se transfieren al queso. Hay una correlación lineal entre los niveles de beta caroteno, vitamina A y E en el queso y la grasa de la leche. En el caso del

beta caroteno, casi el total presente en la leche se recupera en el queso, sin embargo para las vitaminas A y E los porcentajes de recuperación son menores (Hulshof et al., 2006; Lucas et al., 2006).

Los cambios en la elaboración y maduración del queso dan lugar a variaciones sensoriales como color y olor. El color amarillo del queso se debe principalmente a la transferencia de beta caroteno y otros pigmentos de la pastura. Algunos de los responsables de los aromas son los terpenos, que son compuestos con propiedades aromáticas que se transfieren al queso, que junto con otras reacciones en la elaboración y maduración, son los responsables de su aroma y pueden ser marcadores de tipo de dieta (Descalzo et al., 2012).

El queso puede quedar expuesto a la luz durante el procesado, empaclado y distribución. Durante el madurado la luz puede inducir la degradación de lípidos, proteínas y vitaminas, formando off-flavors y produciéndose cambios en el color que pueden llevar a pérdidas nutricionales y la formación de óxidos (Karoui et al., 2007a).

En este contexto el rol de las vitaminas liposolubles y su concentración pueden jugar un papel importante en evitar o retardar la oxidación y preservar la calidad final del queso (Karoui et al., 2007a; Karoui et al., 2007b).

### **1.11 Metodología específica utilizada.**

En esta sección se introducen algunas de las posibles herramientas analíticas que pueden aplicarse a la determinación de calidad sensorial de la leche y productos derivados.

En los últimos años, se han desarrollado metodologías de diferentes características, en general no destructivas como la espectroscopía y las tecnologías que aplican sensores, que posibilitan la determinación sobre la muestra misma, a fin de preservar su estructura y relacionarla con las propiedades sensoriales como el color y el olor.

El color de la leche y en general, de los alimentos se puede determinar instrumentalmente mediante espectrocolorimetría en el rango de longitudes de onda correspondientes a la absorción de la luz, comprendido en el rango de los 400 hasta los 700 nm. Los valores de reflectancia así obtenidos se pueden medir a través de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . Este color en general puede resultar tanto de la pigmentación natural del mismo, como del procesamiento. En muchos casos la interacción del material en cuestión con la luz, resulta en cambios que se evidencian en el color. Por ejemplo en la leche, el color blanco es el resultado de su estructura física, en donde las micelas de caseína y los glóbulos grasos dispersan la luz incidente y como consecuencia exhibe un valor elevado del parámetro  $L^*$  (correspondiente a la luminosidad). El color amarillo o verde amarillento, se debe a los carotenoides de la fase grasa (sobre todo en la leche proveniente de los animales que consumen pasturas) y a la riboflavina presente en la fase acuosa.

El perfil de olor de la leche puede ser determinado por metodologías de análisis de espacio de cabeza del olor, a través de una nariz electrónica con diferentes tipos de sensores. Cada sensor da una señal específica de acuerdo a su naturaleza (pueden ser sensores químicos o de espectro de masa), de acuerdo al “estímulo” que recibe a partir del conjunto de volátiles en dicho material. Este tipo de análisis no indica cuál es el compuesto responsable de determinado olor, pero sí permite clasificar a las diferentes muestras en grupos similares y decir si una leche determinada pertenece o no al grupo con el cual se la compara. Por ejemplo es posible diferenciar leches en polvo de otoño o primavera según su perfil en nariz electrónica (Biolatto et al., 2007).

Para determinar cuáles son los compuestos responsables de un determinado tipo de aroma, se usan técnicas de separación de cromatografía gaseosa con diferentes tipos de detección (las detecciones más exactas son las que involucran metodología de masa) y también se pueden utilizar técnicas combinadas de olfactometría in vivo con

cromatografía para determinar compuestos responsables de olores típicos (Wardencki et al., 2013).

Como flavor se entiende la combinación de la estimulación oral y nasal (sentido humano del olfato); se han desarrollado también sensores para medir la estimulación análoga al sentido humano del gusto. La lengua electrónica es un equipo que discrimina muestras líquidas, por medio de sensores acústicos (SW-SAW). El mismo podría utilizarse en conjunto con la nariz electrónica para desarrollar metodologías de determinación de flavor artificial. Cole et al. (2011) lograron discriminar de este modo 100 de las muestras de agua, jugo y leche. Sin embargo aún no sería posible realizar estas mediciones en muestras sólidas. Para aplicarlo a leche en polvo debería realizarse el estudio sobre muestras reconstituidas.

Si bien la espectroscopía de fluorescencia no mide directamente la calidad sensorial puede utilizarse para determinar compuestos naturalmente fluorescentes en los alimentos, que puedan ser indicadores de factores que determinan su calidad.

La identificación de los distintos fluoróforos que componen la señal de fluorescencia es necesaria para que la espectroscopía de fluorescencia sea aceptada en la industria láctea. Puede haber compuestos que absorben luz pero no la emiten o compuestos que enmascaran la fluorescencia de otros. Además se debe tener en cuenta que varían las propiedades del compuesto según la interacción con otras moléculas del alimento, polaridad, etc. La espectroscopía de fluorescencia puede dar información importante sobre varios parámetros tales como oxidación inducida por luz, estructura de producto, origen geográfico, tratamiento térmico, homogenización, coagulación de leche y cambios durante el madurado. Es importante realizar estos estudios para optimizar los métodos y condiciones de medición y calibración para cada aplicación y producto individual (Andersen and Mortensen, 2008).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

Se describe en primer lugar el diseño de los ensayos realizados y luego la metodología general común a ellos.

### **2.1 Diseño de ensayos de campo.**

2.1.1 Determinación de niveles de antioxidantes y oxidación basal en leche cruda de tambos comerciales de la cuenca central argentina.

Este ensayo se inició con el análisis de la información retrospectiva de leche de empresas lácteas agrupadas por cuenca, representando aproximadamente el 70% de la producción nacional. La información obtenida fue el promedio mensual de concentración de materia grasa y proteína, desde el año 1995 hasta el 2001. Sobre estos datos se efectuó análisis estadístico univariado, en el tiempo y por región geográfica.

Relativo a estos datos, las empresas lácteas suministraron las listas de los tambos, a los que se les efectuaron encuestas para elaborar tipologías en relación a nivel productivo del mismo (litros de leche, porcentaje de grasa y proteínas), manejo alimenticio (uso de concentrados, silaje, henos: tiempo, cantidad y tipo), número promedio de vacas en ordeño, litros promedio por vaca/día, composición racial del rodeo, etc.

A partir de los datos retrospectivos y de las encuestas, se seleccionaron 45 tambos pertenecientes a las cuencas de Entre Ríos, Santa Fe, Buenos Aires y Córdoba. Estos tambos se estudiaron desde agosto de 2003 hasta diciembre de 2004 para relacionar la composición de la leche con variables de manejo, raciales y productivas y definir el comportamiento estacional de cada variable analizada.

El nivel de cobertura de los requerimientos nutricionales tiene alta incidencia no solo sobre el nivel de producción sino también sobre la composición química de la leche. Por lo tanto, los rodeos alimentados adecuadamente durante todo el año mostraron mayor producción de leche y mayores concentraciones de sólidos. Además se detectaron cambios en la composición química de la leche a lo largo del año, percibido como mayor

concentración de grasa y proteína durante el invierno y caída durante el verano.

Los estudios mencionados hasta aquí fueron realizados en la Estación Experimental Rafaela (EEA-Rafaela) de INTA, en el marco del Proyecto N° 520203: "Incremento de la concentración en la leche de sólidos útiles y de compuestos químicos con propiedades terapéuticas y/o sensoriales a través de estrategias de alimentación, de manejo y de la genética".

De los tambos seleccionados hasta ese punto, catorce fueron elegidos por similares características de alimentación, concentración de grasa y proteína en la leche, tamaño de rodeo, composición racial y rendimiento lechero. Se usaron muestras recolectadas a lo largo de los doce meses del año 2004. Las muestras de leche cruda tomadas mensualmente de tanques de frío, fueron de aproximadamente 200 ml cada una y correspondieron a dos ordeños. Fueron congeladas y mantenidas a -20 °C para los análisis de vitaminas y a -80 °C para los análisis de oxidación lipídica y actividad antioxidante total.

Para el análisis estadístico de este ensayo se utilizó el procedimiento GLM del SAS para el análisis de las variables alfa tocoferol, beta caroteno, gama tocoferol, capacidad antioxidante (FRAP) y oxidación lipídica (TBARS) a través del tiempo. Este análisis fue realizado como primera aproximación estadística para determinar si las variables estudiadas presentaron diferencias entre meses y entre los tambos.

#### 2.1.2 Descripción química de los alimentos usados en las dietas de vacas lecheras.

Los alimentos analizados fueron los usados habitualmente en la formulación de las raciones de los rodeos lecheros. El objetivo de este análisis fue determinar cuál fue la composición y cuál la oferta de vitaminas, ácidos grasos y compuestos volátiles ya que la alimentación constituye una vía rápida para modificar la composición y atributos de la leche y no existen datos en Argentina sobre este tipo de composición en alimentos para animales.



Los alimentos analizados fueron obtenidos de los distintos ensayos planteados, entre los años 2006 y 2008. Se analizaron individualmente o en algunos casos las raciones totalmente mezcladas.

Los alimentos analizados fueron alfalfa fresca, alimento balanceado, pellets de soja, expeler de girasol, pellets de girasol, silo de sorgo, silo de maíz, afrechillo de trigo, semilla de algodón, avena fresca y heno de alfalfa.

Se realizaron surtidos de cada alimento y se conservaron aproximadamente dos meses a -20 °C hasta su análisis.

### 2.1.3 Efecto de la dieta a través de la inclusión de alfalfa en los niveles de antioxidantes y oxidación en leche cruda.

Esta experiencia se llevó a cabo en el tambo experimental de INTA Rafaela (Santa Fe, 31°11´S; 61°30´W) durante la primavera del año 2006, diferenciándose dos períodos: uno pre-experimental de cuatro semanas (desde el 13/9 al 12/10) y otro experimental de 60 días (desde el 13/10 al 13/12). Bajo un diseño continuo con mediciones repetidas en el tiempo y análisis de covariancia se evaluaron dos dietas con las siguientes bases forrajeras: Pastoreo de alfalfa (A70) versus Silaje (A0). Las dietas se formularon de manera que fueran isoenergéticas (NRC, 2001). Para el caso de la dieta A70 se utilizó, bajo un sistema rotativo de franjas diarias, una pastura de alfalfa con niveles de asignación donde la participación en la dieta consumida fuese como mínimo del 70% en base seca. En la dieta A0, la base forrajera (silaje + heno) debía ser igual o algo superior al 50% de lo ingerido. En este tratamiento, los animales se mantuvieron en un corral contiguo a la sala de ordeño, donde se les ofreció el silaje a voluntad (10% de rechazo) y distribuido en dos comidas diarias (luego de cada turno de ordeño). Junto con el silaje se adicionaron expeler de soja y pellets de girasol (3,5 y 1,1 kg/vaca/día respectivamente) así como heno de pastura sin moler en una cantidad no inferior a 1,5 kg/vaca/día. En los dos tratamientos se ofreció un balanceado a razón de 9,5 y 6,0 kg/vaca/día para A70 y A0 respectivamente, repartido en partes iguales en los dos turnos de ordeño e incorporándose en el de la tarde un antiespumante (60 cc/vaca/día). Durante

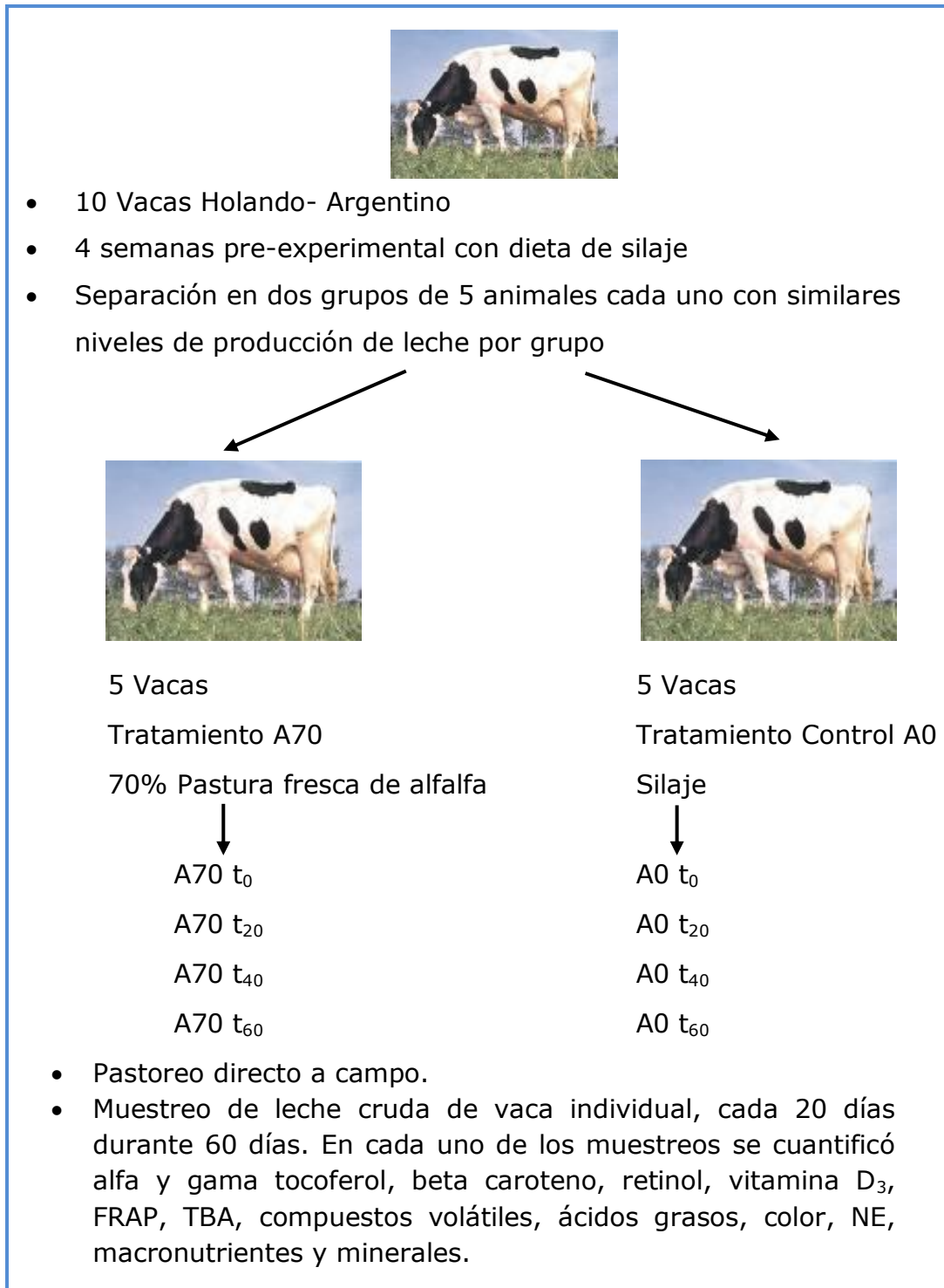
el período pre-experimental se utilizó una sola dieta para todas las vacas, la cual era idéntica a la indicada para el tratamiento A0 pero reemplazando el silaje de sorgo granífero por el de maíz. En todo momento, los animales tuvieron acceso libre a un sector de sombra natural y agua. Se utilizaron 10 vacas multíparas de raza Holando Argentino de parición otoñal (mayo de 2006) con  $576 \pm 74,0$  kg de peso y  $128 \pm 8,4$  días de lactancia al momento de inicio del ensayo. Al final del período pre-experimental, los animales fueron distribuidos de a pares y al azar en ambos tratamientos de acuerdo al nivel de producción de leche de los dos controles realizados en ese período (dos grupos de 5 vacas cada uno). En forma periódica se realizaron estimaciones de la oferta y rechazo de los alimentos. En el caso de la pastura, las mediciones se hicieron con cuadros de  $1 \text{ m}^2$  y cortando a 4- 5 cm del nivel del suelo. Las dietas analizadas fueron isoenergéticas (2,46 y 2,47 Mcal/kg MS para A70 y A0, respectivamente), con mayor contenido ( $p < 0,05$ ) de proteína en las A70 (16,3 vs 14,3% MS) y mayor fibra en la de A0 (35,7 vs 33,9% MS para fibra por detergente neutral y 19,3 vs. 16,7% MS para fibra por detergente ácido).

El período pre-experimental fue usado como covariable. En el período experimental, se distribuyeron los animales en los distintos tratamientos dietarios (A70 y A0) y se recolectaron muestras individuales de leche a los 0, 20, 40 y 60 días. En la Figura 2-1 se presenta un esquema del ensayo.

Se tomaron muestras de leche de vaca individual en cada período de muestreo para todos los análisis efectuados. El contenido de proteína, grasa, sólidos totales (ST) y sólidos totales no grasos (SNG) se midieron semanalmente.

Las muestras de leche para determinación de color no se congelaron sino que se mantuvieron a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su determinación. Las muestras para alfa tocoferol, beta caroteno, retinol, vitamina  $\text{D}_3$  y ácidos grasos fueron conservadas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  y las muestras correspondientes a las determinaciones de TBARS, FRAP, compuestos volátiles y olor por nariz electrónica (NE) fueron alicuotadas y conservadas a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las muestras

congeladas se analizaron en el término de aproximadamente 1 mes después de cada muestreo.



**Figura 2-1 Esquema general del ensayo efecto de la inclusión de alfalfa en la dieta**

Los datos de este ensayo se analizaron estadísticamente como mediciones repetidas en el tiempo usando el procedimiento MIXED del programa SAS (v8e) con los grupos (A70 y A0), el tiempo (día 0 a 60) y sus interacciones como efecto fijo y los animales como variables. Luego del período pre-experimental, en el día 0, el efecto de la dieta no fue significativo y por lo tanto se incluyó en el modelo. La separación de medias se llevó a cabo usando la opción PDIFF del LSMEANS. La unidad experimental usada para ingesta, producción, contenido de grasa y proteína fue la media por animal por semana. La unidad experimental usada para la concentración de vitaminas, FRAP, FRAPC, TBARS, compuestos volátiles y perfil de olor en leche fueron los datos de los animales individuales por cada tiempo de muestreo (t0, t20, t40 y t60). En todas las muestras la relación entre las mediciones bioquímicas y los sensores de la nariz electrónica (NE) fue evaluado usando el análisis de regresión PLS (Partial Least Squares, XLSTAT, 2015) para determinar las correlaciones entre diferentes variables y su correlación de Pearson.

La regresión de mínimos cuadrados parciales se utilizó para encontrar las relaciones fundamentales entre dos matrices (X e Y), es decir, un enfoque de variable latente para modelar la estructura de covarianza en dos espacios. El modelo de PLS trata de encontrar el sentido multidimensional en el espacio de X que explica la dirección de la máxima varianza multidimensional en el espacio Y, y es especialmente pertinente cuando la matriz de predictores tiene más variables que observaciones, o sea que es adecuado para el análisis quimiométrico de los datos (Wold et al., 2001). Las correlaciones entre parámetros individuales se realizaron por la metodología de Pearson.

Por otro lado, el agrupamiento de los datos se analizó mediante el uso de conglomerados jerárquicos (método de Ward) para describir la relación entre las muestras correspondientes a cada tratamiento como resultado de la combinación de las variables con correlación significativa ( $p < 0,05$ ).

Por último se aplicó un análisis discriminante como procedimiento de clasificación; este método maximiza la varianza entre y dentro de

tratamientos. Para la selección de variables, se utilizó la selección del método por pasos de Lambda de Wilks. El criterio que usa el método es un F de significancia con un máximo de 0,05 para entrar y un mínimo de 0,10 para salir. Primero las variables  $x_i$  fueron transformadas en valores estandarizados  $z_i$  donde:  $z_i = \frac{x_i - \bar{x}}{\sigma}$ . Se usó SPSS® Advanced Statistics 12 software (SPSS Inc., Chicago, IL).

#### 2.1.4 Efecto de la dieta y la estación en los niveles de antioxidantes y oxidación en leche y productos lácteos.

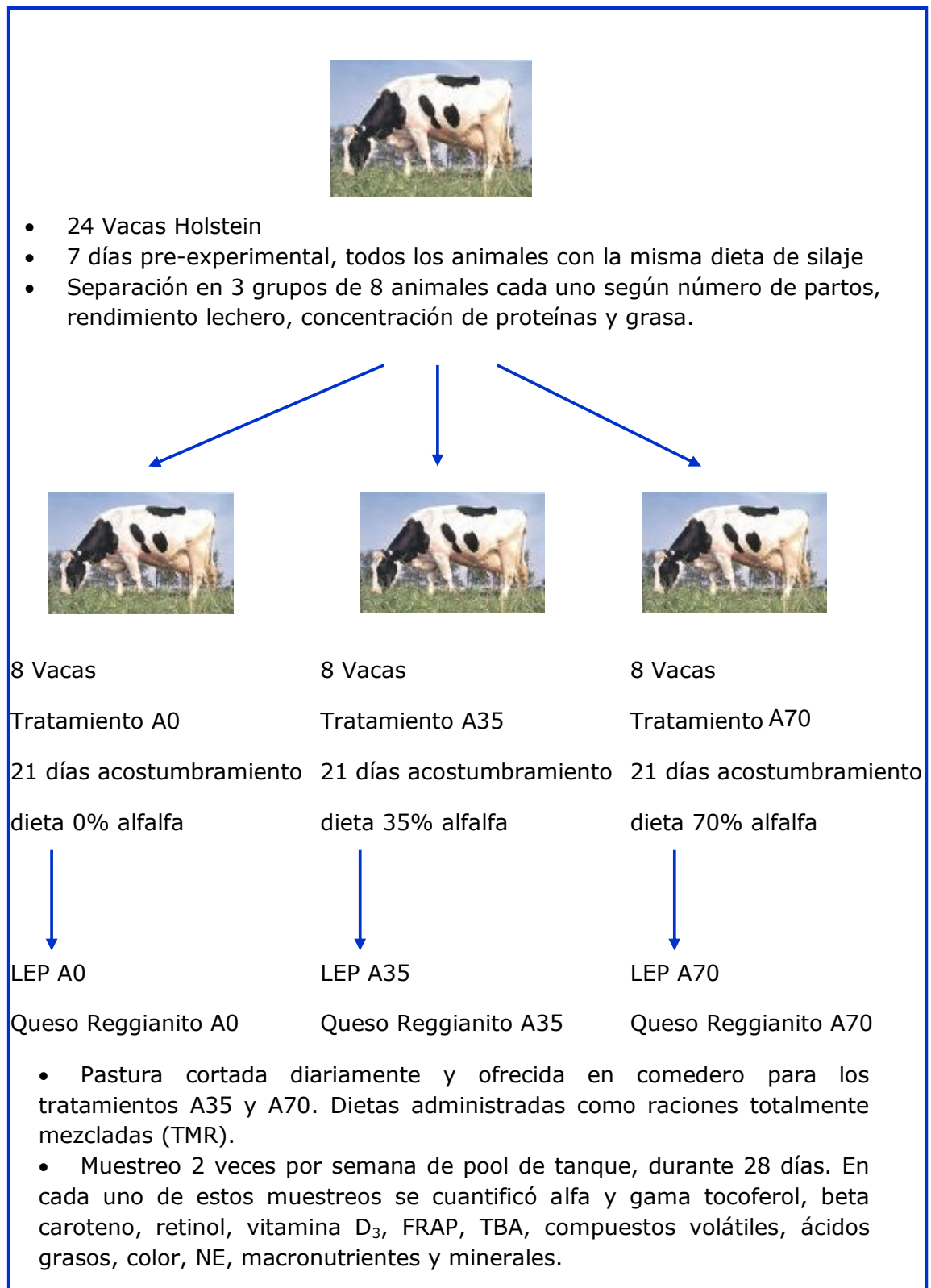
El estudio comprendió dos ensayos iguales realizados en primavera (P) y otoño (O) en la EEA Rafaela de INTA (31°11'S; 61°30'W). Se utilizaron 24 vacas lecheras raza Holando Argentino del rodeo experimental (6 primíparas y 18 multíparas) en estadio medio de lactancia, libres de infecciones intramamarias (confirmado por análisis bacteriológico al inicio del ensayo). Se dividieron en tres grupos de 8 vacas cada uno, según número de partos, rendimiento de leche (L/vaca/día), concentración de proteína y grasa. Cada grupo se distribuyó al azar entre los tres tratamientos. Inicialmente se realizó un período pre-experimental de 7 días, considerado como covariable durante el cual todos los animales se alimentaron con la misma dieta.

En el segundo período de 21 días de acostumbramiento a las dietas, se dividieron en los tres grupos asignados y se les alimentó con la dieta correspondiente a 0, 35 y 70% de alfalfa (A0, A35 y A70 respectivamente). Por último hubo un período experimental de 28 días en donde se tomaron 2 muestras semanales de la producción de leche diaria. Sobre estas muestras se realizó la cuantificación de alfa y gama tocoferol, beta caroteno, retinol, vitamina D<sub>3</sub>, FRAP, TBARS, compuestos volátiles, ácidos grasos, color, NE, macronutrientes y minerales (Figura 2-2).

Los animales se mantuvieron en corrales con sombra y acceso a agua y alimento. Las dietas fueron formuladas para respetar las diferencias correspondientes a la alimentación con alfalfa y fueron isoenergéticas e

isoprotéicas (NRC, 2001). Se formularon de acuerdo a los datos de energía y proteína de cada ingrediente individual.

Se cortó y ofreció diariamente pastura de alfalfa a los animales. Las raciones se administraron como raciones totalmente mezcladas (TMR) (20,34 kg MS/vaca/día) y los remanentes determinados individualmente.



**Figura 2-2 Esquema general de ensayo de efectos de dieta y estaciones**

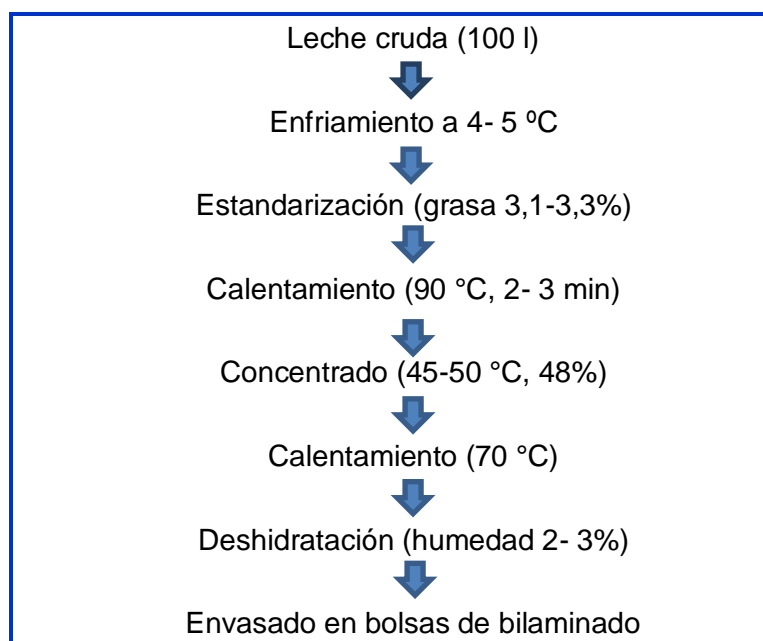
La leche de cada uno de los tratamientos (total producido por 8 vacas) fue destinada a la elaboración de leche entera en polvo (LEP) a escala piloto

(100 l) utilizando tecnología estandarizada en una planta piloto a baja escala de la empresa Sancor en la provincia de Santa Fe, cercana al tambo experimental, de modo de utilizar las leches luego de obtenidas.

Cada elaboración constó de cuatro lotes que fueron analizados en forma individual.

El inconveniente de la escala piloto utilizada fue un tiempo prolongado de concentración de las muestras, con la consiguiente exposición de las leches a temperaturas elevadas y por lo tanto mayor posibilidad de aceleración de deterioro por temperatura previo al secado spray, pero la etapa de concentración, si bien no fue óptima, afectó por igual a todas las leches.

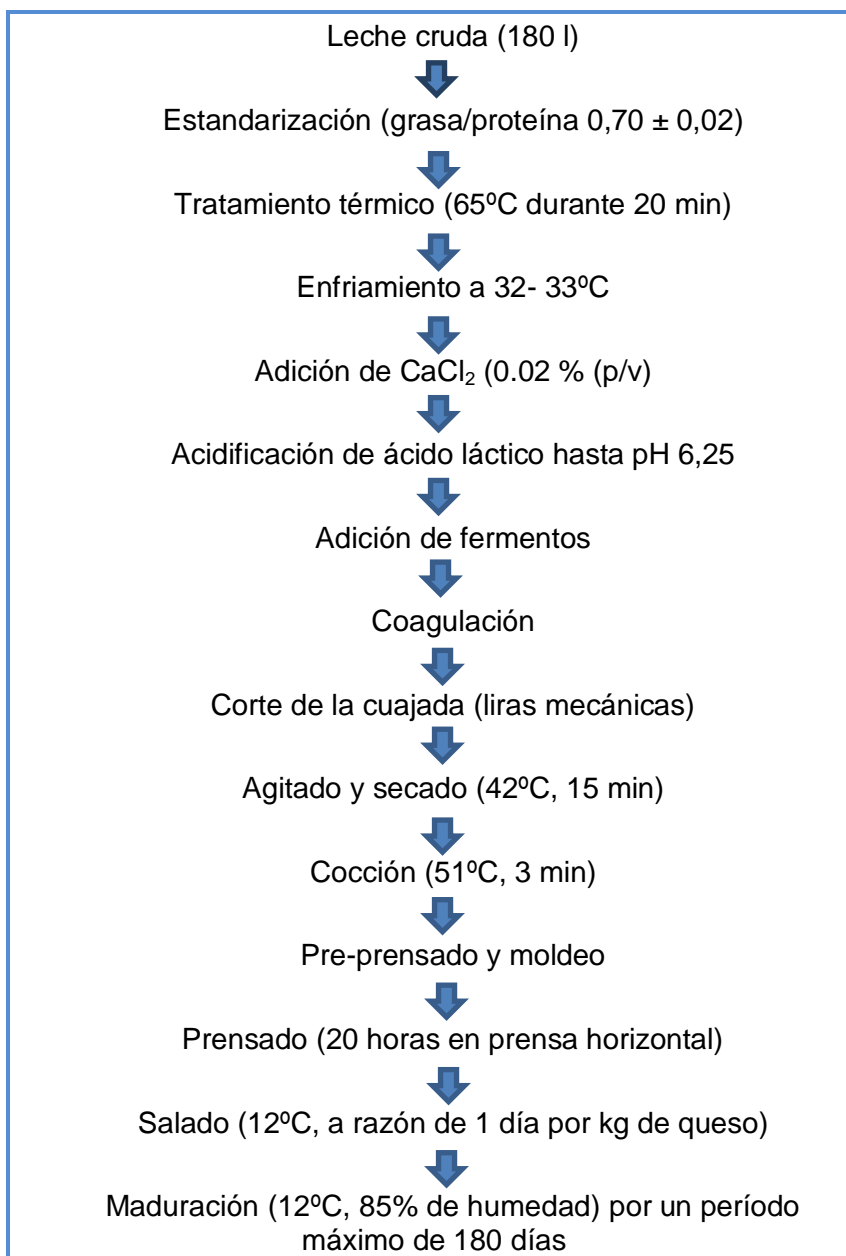
Las LEP recién elaboradas fueron envasadas en bolsas de film de polietileno bilaminado y guardadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis, o en el caso del ensayo de vida útil, se almacenaron como se indica en el punto 2.1.5. En la Figura 2-3 se muestra un esquema general de la elaboración de la leche entera en polvo.



**Figura 2-3 Esquema general de elaboración de leche entera en polvo (LEP)**

También se elaboró queso duro de pasta cocida con 180 días de maduración. En la Figura 2-4 se muestra un esquema general de la elaboración del queso reggianito.





**Figura 2-4 Esquema general de elaboración de queso reggiano**

Las muestras de leche cruda, LEP y queso para determinación de alfa y gama tocoferol, beta caroteno, retinol, vitamina D<sub>3</sub>, compuestos volátiles, ácidos grasos, color y olor por NE fueron conservadas a -20 °C y las muestras correspondientes a las determinaciones de TBARS y FRAP fueron conservadas a -80 °C. En todos los casos, se analizaron aproximadamente 1 mes después de obtenidas.

El análisis estadístico de las mediciones de composición se realizaron a 4 conjuntos de leche de tanque para cada tratamiento (A0, A35 and A70). Se

analizó por análisis de varianza para un diseño completamente aleatorizado y la comparación de medias fue realizada por el test de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), (SAS, 2004).

La producción individual de las vacas fue registrada diariamente durante 1 semana para la covariable al inicio del experimento y durante los 28 días del ensayo.

Los datos de muestras individuales fueron analizados usando análisis de conglomerados jerárquicos (método de Ward) y aplicando un análisis discriminante (AD) como procedimiento de clasificación, este método maximiza la varianza entre y dentro de tratamientos. Para la selección de variables, se utilizó la selección del método por pasos de Lambda de Wilks. El criterio que usa el método es un F de significancia con un máximo de 0,05 para entrar y un mínimo de 0,10 para salir. Primero las variables  $x_i$  fueron transformadas en valores estandarizados  $z_i$  donde:  $z_i = \frac{x_i - \bar{x}}{\sigma^2}$ . Se usó SPSS® Advanced Statistics 12 software (SPSS Inc., Chicago, IL).

#### 2.1.5 Vida útil LEP

La leche entera en polvo (LEP) elaborada en el ensayo anterior se envasó en bolsas de 100 g individuales de film de polietileno bilaminado con atmósfera modificada de  $N_2$  para imitar las condiciones de comercialización.

Las bolsas individuales fueron conservadas en cámara a una temperatura de 20° durante el tiempo de análisis de vida útil (18 meses). Mensualmente se sacaron al azar, 4 bolsas de las distintas elaboraciones de cada tratamiento y se analizaron las muestras para cuantificar alfa y gama tocoferol, beta caroteno, retinol, vitamina D<sub>3</sub>, FRAP, TBARS, compuestos volátiles, ácidos grasos, color, NE y fluorescencia de fase frontal. Para todas las determinaciones excepto las de fluorescencia, las muestras fueron reconstituidas para el análisis.

Para el análisis estadístico se realizó análisis de varianza de dos factores para el tratamiento (A0, A35 y A70) y tiempo (t0 a t18). El análisis aplicado

para evaluar las distintas determinaciones en este ensayo se realizó mediante el paquete estadístico SPSS® versión 12 (SPSS Inc., Illinois).

Las variables fueron analizadas mediante un diseño factorial balanceado con dos factores, tratamiento y tiempo.

El modelo utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + t_j + (Tt)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \text{ donde:}$$

$\mu$  = media general

$T_i$  = efectos fijo del tratamiento

$t_j$  = efecto fijo del tiempo

$(Tt)_{ij}$  = efecto fijo de la interacción

$\varepsilon_{ijk}$  = término del error con que se distribuye  $N(0,1)$ .

Para  $i = 1 \dots a, j = 1 \dots b, k = 1 \dots n$

Las comparaciones múltiples se realizaron mediante el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Se realizaron dos análisis, el primero donde se tomaban los resultados obtenidos mensualmente en dos etapas, entre 0 (tiempo inicial) y 12 meses y entre 13 y 18 meses. En este caso,  $n = 4$ ;  $T = 3$ , donde los niveles fueron: A0, A35 y A70 y  $t = 13$ , donde los niveles fueron de 0 a 12 para la primer etapa de análisis y  $t = 6$ , donde los niveles fueron de 13 a 18 para la segunda.

En el segundo, se analizaron las mismas variables que en el primer caso pero agregando los resultados obtenidos de los análisis de fluorescencia de fase frontal. El análisis fue realizado también en dos etapas. En este caso  $n$  y  $T$  fueron iguales y  $t = 8$ , donde los niveles fueron 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10 y 12 y en la segunda etapa,  $t = 4$ , donde los niveles fueron 13, 15, 16 y 18.

Se eligieron las variables que fueron estadísticamente significativas en el efecto evaluado para analizar aplicando Análisis Discriminante (AD) mediante el método de selección por pasos Lambda de Wilks (stepwise). El criterio utilizado fue de 0,05 para la significancia máxima de F de entrada y

0,10 para la significancia mínima de F de salida. El AD maximiza la varianza entre categorías y minimiza la varianza dentro de las mismas, permitiendo obtener una ecuación por la cual las muestras son clasificadas en sus respectivos tratamientos.

Previo a aplicar el AD, los datos de las variables se transformaron en sus valores estandarizados, donde  $z_i$  es la variable estandarizada  $z_i = \frac{x_i - \bar{x}}{\sigma^2}$ . Esta transformación permitió homogeneizar las magnitudes (peso) entre las variables (Hair et al., 1999).

## **2.2 Análisis comunes a los distintos ensayos**

### **2.2.1 Tratamiento de muestras de alimentos**

Se molieron muestras representativas de los distintos alimentos para realizar los análisis.

A las muestras de alfalfa fresca, silo de maíz y avena fresca se les determinó la humedad. Para ello, se pesaron con exactitud entre 30 y 50 g del alimento y se secó en estufa a  $100 \pm 2$  °C hasta alcanzar peso constante.

### **2.2.2 Tratamiento de muestras de leche cruda.**

Para las muestras de leche cruda congeladas a -20 °C, se homogeneizaron las mismas en un baño de agua a 38-42 °C (Vicking, modelo Dubnoff) con agitación suave. Se sacaron del baño y agitaron por rotación en el momento de tomar la alícuota correspondiente para evitar la separación de las fases grasa y acuosa.

Para el caso de color de leche fluida, la determinación se realizó en muestras de leche conservadas a  $4 \pm 1$  °C desde la recolección hasta el momento de la medición (24 h post muestreo).

### **2.2.3 Tratamiento de muestras de leche en polvo.**

Para las muestras de LEP, se reconstituyó la leche tomando  $13,0 \pm 0,1$  gr y agregando agua bidestilada a 42 °C, agitando 5 min para homogeneizar.

Se llevó a 20 °C y se completó hasta llegar a un volumen de 100 ml. Luego de este paso se realizaron los análisis correspondientes.

#### 2.2.4 Tratamiento de muestras de queso para todos los análisis.

Para las muestras de queso se tomó una porción representativa de la horma, se picó con Moulinex (Philips) y se sacó la alícuota correspondiente a los distintos análisis.

#### 2.2.5 Determinación de vitaminas antioxidantes (alfa y gama tocoferol, beta caroteno, retinol y colestiferol).

##### ➤ Extracción de vitaminas de leche cruda y en polvo.

Para la determinación de las vitaminas antioxidantes se tomaron alícuotas de 3 ml de la leche homogeneizada, agregando 1 ml de pirogallol (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA) 1% en etanol e incubando durante 2 min a 70 °C en baño de agua (Vicking, modelo Dubnoff) con agitación suave. Luego se saponificaron las muestras con 300 µl de KOH (s) (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA) durante 30 min en baño de agua también a 70 °C con agitación. Se enfriaron en baño de agua con hielo hasta temperatura ambiente y se agregaron 2 ml de agua bidestilada para mejor separación de las fases. Se agregaron 12 ml de hexano calidad HPLC y agitando con vortex durante 2 min. Luego, se procedió a separar la fase hexano, repitiendo la operación con 5 ml de hexano y juntando la segunda extracción con la primera. Por último se evaporó el solvente bajo corriente de nitrógeno para evitar deterioro, se resuspendió el extracto en un volumen pequeño (500 µl) de etanol calidad HPLC y se filtró por membrana de 0,45 µm de porosidad (Buttriss and Diplock, 1984).

##### ➤ Extracción de vitaminas de queso.

Para la determinación de las vitaminas se tomaron alícuotas de 0,5 g de queso picado y se mezclaron con 10 ml buffer PK 0,05 M pH 7,7 con homogeneizadora durante 2 min. Luego se pesaron porciones de 1gr del homogenato de queso, a las que se agregaron 3 ml pirogallol 1% en etanol y

se incubaron durante 2 min a 70 °C en baño de agua (Vicking, modelo Dubnoff) con agitación suave. A partir de este punto se continuó con la saponificación y la extracción como con la leche.

➤ Extracción de vitaminas de alimentos.

Para la extracción de las vitaminas se pesaron muestras de 5 g del alimento, se agregaron 25 ml de buffer PK 0,05 M pH 7,7 y se homogeneizaron durante 2 min con ultraturrax. Se pesaron alícuotas de 1 g de esos homogenatos, agregando 2 ml de pirogalol (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA) 1% en etanol e incubando durante 2 min a 70 °C en baño de agua (Vicking, modelo Dubnoff) con agitación suave. Luego se saponificaron las muestras con 300 µl de KOH (s) (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA) durante 30 min en baño de agua también a 70 °C con agitación (Buttriss and Diplock, 1984). Se enfriaron en baño de agua con hielo hasta temperatura ambiente y agregando 1 ml de agua bidestilada para mejor separación de las fases. Se agregaron 5 ml de hexano calidad HPLC y agitando con vortex durante 2 min. Luego, se procedió a separar la fase hexano, repitiendo la operación con 5 ml de hexano y juntando la segunda extracción con la primera. Por último se evaporó el solvente, se resuspendió el extracto en un volumen pequeño (500 µl) de etanol calidad HPLC y se filtró por membrana de 0,45 µm de porosidad.

Para el heno de alfalfa en vez de 5 g del alimento se pesaron 2,5 g ya que con mayor cantidad de muestra no se forma correctamente el homogenato.

Una vez obtenidos los extractos, para la detección y cuantificación de vitaminas se procedió de igual manera que en el caso de las leches.

➤ Detección de vitaminas.

Las vitaminas se detectaron y cuantificaron por HPLC. Se usaron dos sistemas con diferentes detectores. Cada uno contó con un desgasificador de membrana SCM1000 (TSP), una bomba cuaternaria (SpectraSYSTEM P4000, TSP), columna Alltima C18 (250 mm x 4,6 mm, partícula 5 µ), una

interfase (SN4000, TSP) y software Chromquest versión 4.0 (ThermoFinnigan).

Para el caso del alfa y gama tocoferol y beta caroteno se realizó una dilución de los extractos resuspendidos, se inyectaron en forma manual en un loop de 20  $\mu$ l y se cuantificaron con detector electroquímico (DECADE, ANTEC LEYDEN) equipado con una celda FLOWCELL con un electrodo de referencia de Ag/AgCl y uno de trabajo de fibra de carbono. El potencial aplicado fue de 700 mV. La corrida cromatográfica se llevó a cabo de manera isocrática con una fase móvil de etanol/metanol/isopropanol 42:50:8 y NaClO<sub>4</sub> 20 mM a un flujo de 1 ml/min (todos los solventes calidad HPLC) de acuerdo a la técnica de de Rijke et al. (1997). En el caso del retinol y colecalciferol, se inyectaron al sistema HPLC 50  $\mu$ l de los extractos sin diluir en un loop de 100  $\mu$ l en forma automática mediante un autosampler (AS3000, TSP) y se cuantificaron con un detector de arreglo de diodos (UV6000LP, TSP) y de fluorescencia (FL3000, TSP), ambos dispuestos en serie, de acuerdo a la técnica de Rossetti et al. (2010). La detección se llevó a cabo a 325 nm para el retinol y 265 nm para la vitamina D<sub>3</sub>.

➤ Cuantificación de vitaminas.

La cuantificación de vitaminas se efectuó utilizando estándar externo mediante curvas de calibración de concentración conocida (DL-alfa tocoferol, Merck-Darmstadt, Alemania; (+)- gama- tocoferol, beta caroteno y retinol, todos Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA y colecalciferol, Sigma-Aldrich o Fluka, St. Lois, MO, USA).

#### 2.2.6 Determinación de lactoferrina.

Se utilizó un kit comercial y se realizaron las determinaciones de acuerdo al protocolo suministrado por el laboratorio productor. Kit ELISA para cuantificación de lactoferrina bovina (BETHYL Laboratories, Inc.)

### 2.2.7 Determinación de oxidación lipídica: Compuestos Reactivos al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

La oxidación lipídica se determinó por medio del método espectrofotométrico de TBARS según Fenaille et al. (2001). Se tomaron por duplicado alícuotas de 3 ml de leche homogeneizada, se agregaron 2,4 ml de butilhidroxitolueno (BHT, Biochem) 0,8% en etanol como antioxidante y 2,4 ml de ácido tiobarbitúrico 0,25% (TBA, Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina) en ácido tricloroacético (TCA, Merck, Darmstadt, Germany) 10%. Se efectuó también un blanco de reactivos en donde se agregó a la alícuota de leche 2,4 ml de TCA 10% (sin TBA) y se trató igual que a las muestras con el reactivo de TBA. Se homogeneizaron en vortex durante 2 min y se centrifugaron durante 30 min a 6000 g y 4 °C. Se filtraron los sobrenadantes (filtros Watman nro. 2) y derivatizaron durante 1 h a 70 °C en baño de agua (Vicking, modelo Dubnoff). Se midió el máximo de absorción de las muestras y el blanco a 530 nm con un espectrofotómetro UV/Vis (Lambda Bio 20, Perkin-Elmer, Rotkreuz, Suiza). Se calculó la concentración usando como estándar 1,1,3,3 tetraetoxipropane (TEP, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo. USA) en un rango de concentraciones de 0 a 0,5 µM. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de malonaldehído (MDA)/ kg de leche fresca o mg equivalentes de malonaldehído (MDA)/ kg de LEP, según correspondió.

### 2.2.8 Determinación de la actividad antioxidante total: Método de Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).

Se utilizó un método colorimétrico en el cual se midió la actividad antioxidante por reducción de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , formando con tripiridyltriazina (TPTZ) un complejo color azul intenso a pH bajo (Benzie and Strain, 1996). Este ensayo fue adaptado (Descalzo et al., 2007) para controlar la presencia de hierro endógeno (en forma de  $Fe^{2+}$ ) en las muestras de leche que pudiera sobreestimar el valor de FRAP.

Se pesó 1 g de la muestra homogeneizada y se centrifugó a 10000 x g a 4 °C durante 30 min. Se tomaron alícuotas de 83 µl del sobrenadante y se



agregaron a 2500  $\mu\text{l}$  del reactivo de FRAP. Este reactivo está compuesto por buffer acetato 300 mM y que contiene 10 mM de TPTZ (Sigma Aldrich, Argentina, S. A.) en 40 mM HCl y 20 mM  $\text{FeCl}_3$  (Sigma Aldrich, Argentina, S. A.). Se incubaron las muestras durante 10 min a 37 °C para permitir el desarrollo completo de color, se enfriaron en hielo, se filtró por membrana de nylon de 45  $\mu\text{m}$  de poro y se midió la intensidad de color a 593 nm con un espectrofotómetro UV/Vis (Lambda Bio 20, Perkin-Elmer, Rotkreuz, Suiza). Para descontar el contenido de ácido ascórbico (FRAPC) se incubaron las alícuotas con ascorbato oxidasa 4 U/ml (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) durante 15 min a 30 °C antes de agregar al reactivo FRAP y luego se procedió como se describió anteriormente. Para descontar el contenido de  $\text{Fe}^{2+}$  endógeno (FRAP0), se preparó el reactivo de FRAP sin el agregado de  $\text{FeCl}_3$  (reemplazando por agua bidestilada) y se procedió de la misma manera que para las muestras.

Los valores obtenidos se compararon con una curva de calibración de sulfato ferroso ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich, Argentina, S.A.) en un rango de 100 a 1000  $\mu\text{M}$  y se expresaron los resultados como equivalentes de  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\mu\text{M}$ .

#### 2.2.9 Determinación de Fluorescencia.

Se utilizaron microplacas de 96 pozos con LEP hasta el borde con el accesorio lector de placas del espectrofotómetro de luminiscencia LS55 (Perkin Elmer, Rotkreuz, Suiza) con aberturas de 2,5 y 5 para excitación y emisión respectivamente, y valor de corte de 1% para las señales de emisión. Como base para la aplicación metodológica se tomaron los parámetros descritos por Andersen and Mortensen (2008) y Gatellier et al. (2007).

#### 2.2.10 Análisis de Color.

El análisis de color instrumental en la leche se llevó a cabo de acuerdo a las metodologías descritas por Celestino et al. (1997) y por Prache et al. (2005).

Las condiciones experimentales fueron: área grande de visión, observador 10° e iluminante D65. Se utilizó la escala de color CIELab, determinándose para cada muestra de leche, por triplicado, los siguientes parámetros:

L\* luminosidad, L\* = 0 para el negro y L\* = 100 para el blanco

a\*: coordenada verde (valores negativos)- rojo (valores positivos)

b\*: coordenada azul (valores negativos)- amarillo (valores positivos)

Para la calibración del espectrocolorímetro se utilizaron azulejos patrones blanco y negro (ByK Gardner ®, Inglaterra), los cuales poseen certificado de aptitud para la calibración dado por el fabricante. Para el análisis de las muestras, se utilizaron 30 ml de muestra de leche en cubeta para muestras líquidas de vidrio especial provista por el fabricante (ByK Gardner ®). Para evitar la posible interferencia de la luz del ambiente se utilizó un cubo opaco con fondo blanco, el cual cubre en su totalidad a la cubeta.

#### 2.2.11 Parámetros lactológicos de calidad de leche.

Se realizaron con un Milkoscan Minor (Milko Scan Ft 120, Foss Electric, Hillerød, Denmark, IDF, 1996). Se determinó grasa, proteína, lactosa, cenizas, urea, sólidos no grasos y sólidos totales.

#### 2.2.12 Perfil de olor mediante nariz electrónica (NE-MS)

Se utilizó un equipo NE-MS Alpha Prometheus (Alpha MOS®, Francia), el cual consta de tres compartimientos: automuestreador HS100 con capacidad para 72 viales, NE Alpha Fox 4000 con un arreglo de 18 sensores semiselectivos de óxido metálico (sensores MOS) y MS Alpha Kronos que trabaja con una fuente de iones por impacto electrónico a 70 eV y un analizador cuadrupolo.

El análisis del perfil de aroma se llevó a cabo mediante la metodología de espacio de cabeza estático. En la misma, una alícuota de 3,0 ml de leche fluida se colocó en un vial de 10 ml (Chromacol®, Inglaterra) y se selló con septa y tapa magnética (Laphapack®, Alemania). Para estabilizar el espacio

de cabeza se incubaron las muestras en el automuestreador a 50 °C durante 10 min con una agitación de 500 rpm. El análisis de las muestras se llevó a cabo por triplicado.

Para la adquisición de datos de la NE, se inyectó 1 ml de espacio de cabeza a razón de 1 ml/s. El tiempo de adquisición por muestra fue de 120 s, con una frecuencia de 0,5 s. El período de recuperación entre adquisición de muestras fue de 20 min. El gas de transporte utilizado fue aire cromatográfico N35 (Air Liquide®).

Para realizar la adquisición de datos del MS se inyectaron 4 ml de espacio de cabeza a una razón de 40 µl/s, realizando un promedio de los 90 registros obtenidos por cada adquisición, siendo el rango de relaciones m/z estudiados de 50 a 200 amu. El período de recuperación entre adquisición de muestras fue de 20 min. El gas de transporte utilizado fue nitrógeno N55, libre de oxígeno (Air Liquide®) (Irurueta et al., 2005).

#### 2.2.13 Determinación de ácidos grasos.

La determinación de ácidos grasos de los alimentos se realizó en el laboratorio de lípidos del Instituto Tecnología de Alimentos. Brevemente, se pesaron 250 mg de muestra seca y agregando 1 ml de estándar interno C19:0. Luego se agregaron 1 ml de tolueno y 3 ml de 4% HCL en metanol y se agitó a baja velocidad. Se dejó tapado 2 hs en baño de agua a 70 °C, se enfrió y neutralizó con 5 ml K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 6%. Se extrajo con 2 ml de hexano y se analizó por GLC (Alves et al., 2008). Los metil esterres de los ácidos grasos se prepararon de acuerdo a la técnica de (Pariza et al., 2001) y se midieron empleando un equipo Varian 3800 equipado con un detector de ionización. Los metil esterres se analizaron empleando una columna capilar CP-SIL88 de 100 m y 0,25 mm de diámetro interno. La temperatura del horno fue programada a 70 °C durante 4 min, de 70 a 170 °C a 13 °C/min y finalmente de 170 a 200 °C a 1 °C/min. Los ácidos grasos fueron identificados con estándar externo PUFA-2 Animal Source, Supelco.

El análisis de ácidos grasos de leche cruda, LEP y queso se realizó en el laboratorio de calidad de leche de la EEA Rafaela, INTA. Brevemente, se

extrajo la grasa de las muestras según Luna et al. (2005). Los metil ésteres se prepararon mediante una metanólisis básica y se midieron en un cromatógrafo (Perkin Elmer modelo Autosystem XL-R 3.5 con detector FID). Los metil ésteres se analizaron empleando una columna capilar CP-Sil88 de 60 m y 0,25 mm diámetro interno, usando N<sub>2</sub> como gas carrier. La temperatura del horno fue programada a 70 °C durante 4 min, de 70 a 170 °C a 13 °C/min y finalmente de 170 a 215 °C a 1 °C/min. Los ácidos grasos fueron identificados con estándar externo PUFA-2 Animal Source, Supelco.

#### 2.2.14 Determinación de compuestos volátiles.

Se utilizó una fibra CAR/PDMS/DVB 2cm-50/30mm para extraer y concentrar los compuestos volátiles de alimentos y leche mediante microextracción en fase sólida (SPME) seguido de cromatografía gaseosa (Shimadzu 14-B) con detección de llama (CG-FID). Se colocaron 2,0 ± 0,1 g de muestra de alimento o 5,00 ± 0,01 ml de leche en un vial color caramelo con tapa y septa. La fibra se expuso durante 10 min a 45 °C para equilibrar y 50 min para la adsorción. El inyector se utilizó en modo splitless a una temperatura de 260 °C y el detector a 280 °C. Se separaron los compuestos volátiles en una columna capilar ATM5 de 30 m x 0,32 mm di x 1 µm. Se usó el siguiente programa de temperatura, inicial 40 °C durante 4 min, luego a 105 °C a 2 °C/ min, se mantuvo 1 min, luego a 110 °C a 0,5 °C/ min y se mantuvo 1 min. Finalmente se elevó a 220 °C a 10 °C/ min y mantuvo por 2,5 min. Para la desorción, se dejó la fibra en el inyector durante 4 min. La identificación se realizó comparando tiempos de retención relativos y la cuantificación por estándar interno de 3-CH<sub>3</sub>ciclohexanona y estándares externos (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) (Irurueta et al., 2005).

#### 2.2.15 Extracción de RNA.

##### ➤ Tejidos animales.

Los tejidos fueron tomados en frigorífico, a minutos de la muerte de los animales para evitar los procesos degradativos. Se colocaron

inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

➤ Toma de muestras de leche.

Se limpió la ubre con alcohol 70%, y se ordeñó (descartando el primer chorro) hasta llenar un tubo estéril de plástico de 50 ml. Los tubos se colocaron en hielo y se llevaron al laboratorio para realizar inmediatamente la extracción.

➤ Toma de muestras de sangre.

Se realizó a partir de muestras tomadas en la EEA-Rafaela con EDTA potásico: Los tubos se colocaron en hielo y se transportaron al laboratorio para su procesamiento (24 hs en heladera).

➤ Extracción de RNA de muestras congeladas de tejido.

Se usó el método de TRIZOL (Invitrogen Cat. # 15596-018 contiene guanidina y fenol). Las muestras se colocaron en un mortero, previamente tratado con RNase AWAY®, se cortaron en trozos, se colocaron en Ultra-Turrax® (IKA, Alemania) con el agregado de Trizol® y se homogeneizaron, . Se tomó el líquido y se transfirió a un tubo de 2 ml. Para muestras de grasa se centrifugó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 min ( $13.000 \times g$ ) y se transfirió la fase acuosa que queda entre el precipitado y la capa superior grasosa. Se siguió el protocolo indicado por Invitrogen, se agregó 0,3 ml de cloroformo a cada tubo, se agitó vigorosamente 20 seg e incubó a temperatura ambiente por 2 min. Luego se centrifugó en frío durante 15 min a  $13.000 \times g$ , se colectó la fase acuosa en tubos de 1,5 ml, se agregaron 0,7 ml de isopropanol y se mezcló sin agitar (por inversión para embeber la preparación con el alcohol). Se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó durante 5 min. a  $13.000 \times g$  descartando cuidadosamente el alcohol. El pellet se lavó dos veces con etanol 70% (preparado con  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ®). En cada lavado el mRNA se precipitó por centrifugación durante 5 min a  $13.000 \times g$ . Se secó el precipitado al aire y se resuspendió en  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ®. Se colocaron 2  $\mu\text{l}$  en 198  $\mu\text{l}$  de buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 M para lectura en el espectrofotómetro. Se

tomaron alícuotas de aprox. 1 µg y se corrieron en gel de agarosa al 2% a fin de determinar la calidad del RNA obtenido.

➤ Extracción de RNA de células de leche.

50 ml de leche sin congelar se filtraron a través de una gasa estéril y se agregaron 50 µl de 0,5 M EDTA acuoso. La leche se centrifugó a baja velocidad (1800 x g) a 4 °C durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se limpió la grasa pegada a las paredes del tubo con una toalla de papel (Carilina ®) limpia. El residuo de células se lavó con 10 ml de PBS (Dulbecco) pH 7,2 con 10 µl de 0.5 M EDTA acuoso para resuspenderlas. Las células se centrifugaron a 1800 x g 10 min a 4 °C y se decantó el sobrenadante. Se procedió con la extracción de RNA mediante el agregado de 800 µl de TRIZOL y se resuspendió con la pipeta varias veces hasta lisar las células. Se transfirió a tubo de 1,5 ml y se dejaron 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 160 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 20 seg, se incubó 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13.000 x g durante 15 min a 4 °C para separar la fase acuosa, la cual se transfirió a un tubo limpio.

➤ Cebadores (primers).

Oligo			No Acceso
Nombre	Comentarios	Secuencia	O nombre clon
	Affymetrics No	Diseñado con Primer 3	NCBI
Antiox Prot 2F	Bt.5319.1.S1_AT	AGGCATGAGCAACATGACTG	NM_174643
Antiox Prot 2R	175 bp	AATATCTCCCTCCCCACTG	
α-TAP F	Bt.12989.1.S1_at	GCATCTATGTCCTGCGGTTT	AF_432353
α-TAP R	119bp	CCCCAACTGTTGCATCTTCT	
α-TTP F	Bt.13114.1.S1_at	CACACTGGGACCCAAAAGTT	XM_587081
α-TTP R	151 bp	TGAAAGGCATGACGAAACTG	
CRABP-1 F	BT.396.2.S1_A_AT	AGGACGGGGACCAGTTCTAC	NM_181028
CRABP-1 R	173 bp	CCCCTCCAGAAGAGTTTGTG	
CRBP-1 F	BT.17810.1.S1_A_AT	ATCATGGACTTCCAGGTTGG	NM_001025343/AF502256
CRBP-1 R	162 bp	CTCGTCACCCTCAATCCACT	
CRABP2 F	Bt.1151.1.S1_At	AATGGGAGAGCGAGAACAAA	NM_001008670
CRABP2 R	152 bp	CCGGATGTAGACCCTGGTG	
RAR resp F	Bt.24933.1.s1_at	GGCAGAAAGTCAACACCGTTT	XM_587202 (var 1) / XM_865132 (var3) Primers recognize 1 & 3
RAR resp R	223 bp	GAGGCCTCTTCTGGTGTCTG	
RBP4 F	Bt.5318.1.S1_at	ACGGACTACGAGACCTTTGC	XM_583037

RBP4 R	247 bp	AAGGACACCTTCCATGTTGC	
Blg F	396 bp	GTCCTTGTGCTGGACACCGAC TACA	Medrano, J.F. and E. Aguilar-Cordova. 1990. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. Bio/Technology 8:144-146.
BlgR		CAGGACACCGGCTCCCGGTA TATGA	

➤ Condiciones de PCR reversa.

Se utilizaron los kits de Invitrogen (Argentina).

Mezcla: para la síntesis de la primera cadena se usaron por cada tubo: ARN tratado con DNASA (10 µl), Oligo(dT) 20 (50 mM) 2 µl; 10 mM dNTP Mix 1 µl. Los ingredientes se mezclaron en un tubo, se centrifugó brevemente y se incubó a 70 °C durante 5 minutos. Luego se colocó el tubo en hielo y se agregaron: 5X RT Buffer 6 µl, RNaseOUT™ (40 U/µl) 1 µl, SuperScript™ III RT (200 U/µl)\* 1 µl, 0,1 M DTT 1 µl. Como control negativo se utilizó H<sub>2</sub>O MilliQ ® estéril. El contenido se mezcló con la pipeta, se colectó por centrifugación y se transfirió al ciclador térmico (Eppendorf, Alemania), precalentado a 50 °C. Se incubó durante 50 min y luego se inactivó por calentamiento a 85 °C por 5 min.

Los productos obtenidos se usaron directamente en la mezcla de PCR

10X PCR Buffer 5 µl, 1X 10 mM dNTP mezcla 1 µl (0,2 mM cada uno), 50 mM MgCl<sub>2</sub> 1,5 µl, 1,5 mM cebador (primer) directo (10 µM) 1 µl 0,2 µM, cebador inverso (10 µM) 1 µl, 0,2 µM cDNA y 2 µl Platinum® Taq DNA Pol 0,4 µl 2,0 unidades y agua estéril hasta 50 µl.

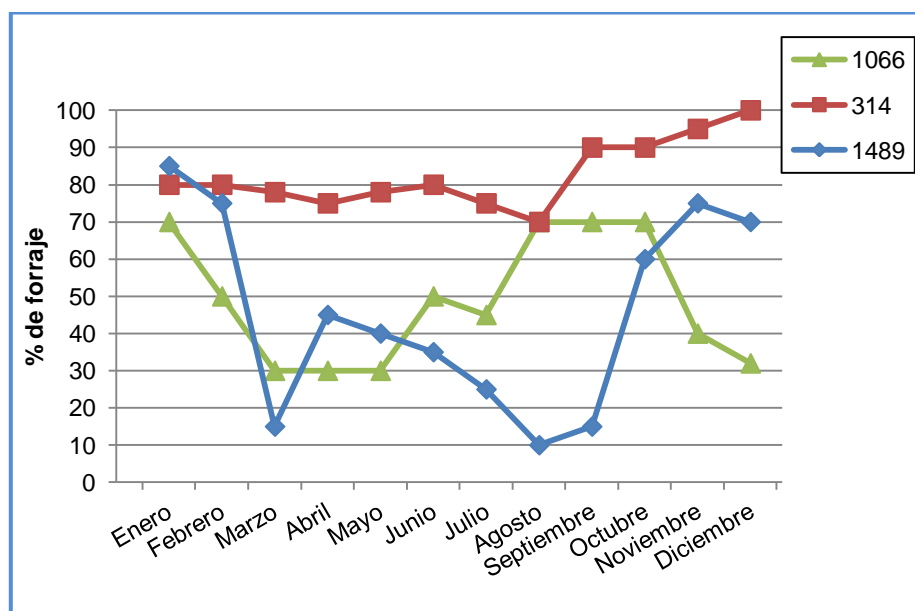
Paso	Temperatura °C	Minutos
1	95	02:00
2	95	00:30
3	55	00:30
4	72	00:30
5	Repetir 33 veces hacia 2	
6	72	10:00
7	Mantener a 16 °C	
8	Fin	

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### 3.1 Determinación de niveles de antioxidantes y oxidación basal en leche cruda de tambos comerciales de la cuenca central argentina.

El objetivo de este primer ensayo fue obtener información sobre la variabilidad de la composición antioxidante de la leche obtenida de diferentes tambos de la Argentina y determinar si existen variaciones estacionales en dicha composición a lo largo de un año. Para ello se analizaron mensualmente muestras de 8 tambos de la cuenca central de Argentina, en la zona de Santa Fe.

La disponibilidad y calidad de los alimentos de las vacas lecheras en las zonas de producción es altamente variable y presenta una elevada estacionalidad. De este modo la disponibilidad de forraje, con alfalfa como principal especie forrajera de la región, presentó variaciones en los tambos estudiados. Los datos de tres de ellos que se presentan en la Figura 3-1 del documento del Informe Final de Lechería (Taverna, 2005) ilustran la variabilidad citada.



**Figura 3-1 Porcentaje de forraje en la dieta por tambo durante 1 año**

Esta figura muestra claramente la falta de homogeneidad en la oferta pastoril a lo largo del año para los diferentes tambos muestreados. Mientras



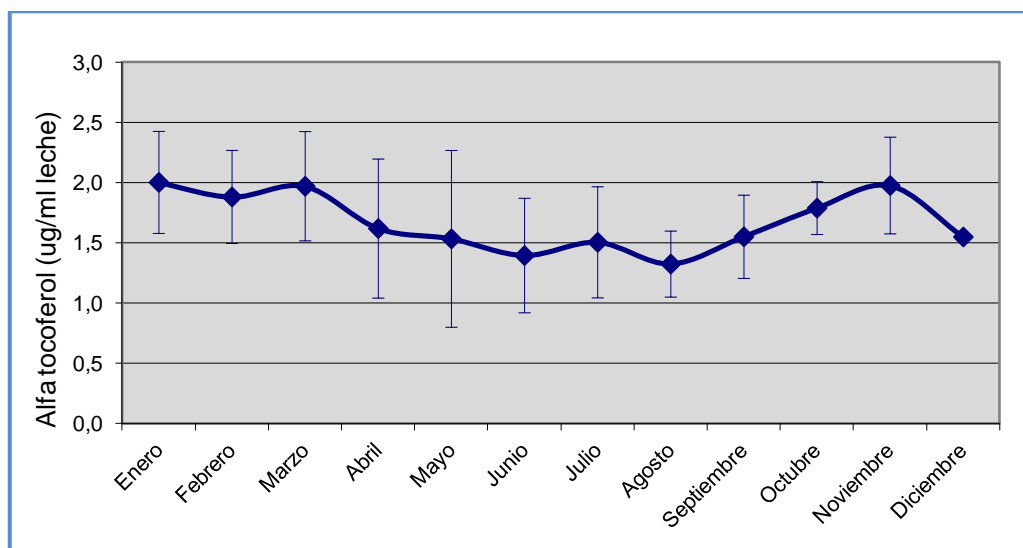
que algunos presentaron diferencias estacionales, con mayor oferta de pastura durante los meses de primavera y verano (tambo 1066), otros mostraron una distribución homogénea durante todo el año (tambo 314) y algunos una alta variabilidad de oferta independientemente de la estación (tambo 1489).

Es de esperar entonces una alta variabilidad de los parámetros medidos, ya que tocoferoles y carotenoides son incorporados a la leche a través de la dieta.

Este ensayo describe por primera vez la concentración de vitaminas liposolubles incorporadas naturalmente en leche cruda destinada a la producción comercial. Los valores de la literatura internacional son sumamente variables y no se contaba con valores medios o de referencia a nivel nacional.

### 3.1.1 Concentración de alfa tocoferol a lo largo de 12 meses.

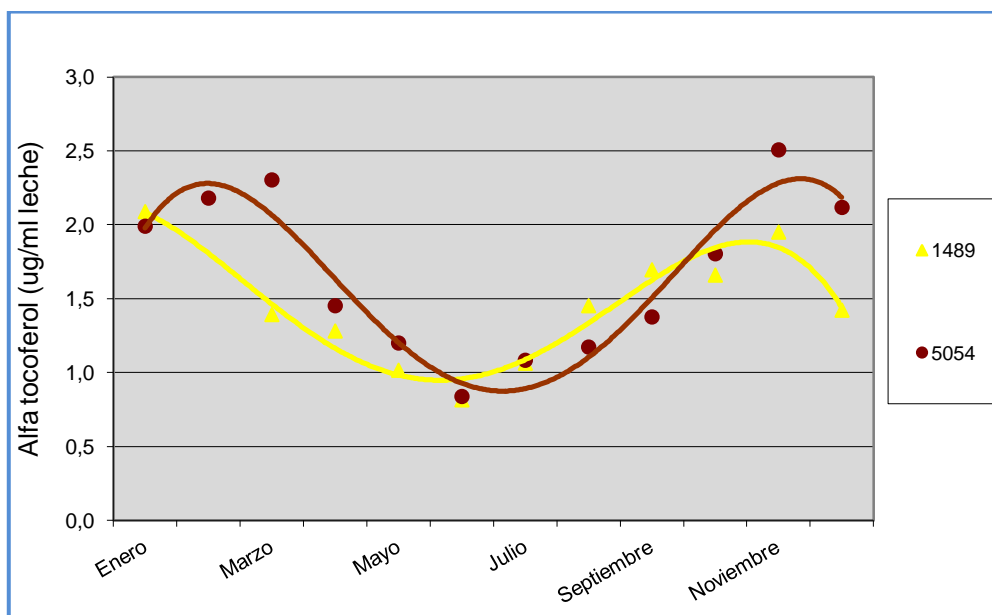
Como se observa en la Figura 3-2, el contenido de alfa tocoferol varió en forma estacional a lo largo de los 12 meses de muestreo, con valores superiores en el período enero-marzo, y noviembre-diciembre (ver Tabla 3-1, pág. 64).



**Figura 3-2 Concentración promedio y desvío de alfa tocoferol (µg/ml leche) en leche de todos los tambos evaluados**

Como era de esperar, los desvíos obtenidos al considerar tambos tan disímiles en cuanto a la dieta de las vacas lecheras, han sido muy altos.

En la Figura 3-3 se graficaron dos tambos que mostraron una fuerte estacionalidad para la concentración de esta vitamina. Estas diferencias estacionales resultaron significativas ( $p < 0,05$ ) al considerar las muestras trimestralmente, observándose una tendencia a presentar valores superiores en los meses de primavera-verano.



**Figura 3-3 Concentración de alfa tocoferol ( $\mu\text{g/ml}$  leche) en leche de dos tambos seleccionados**

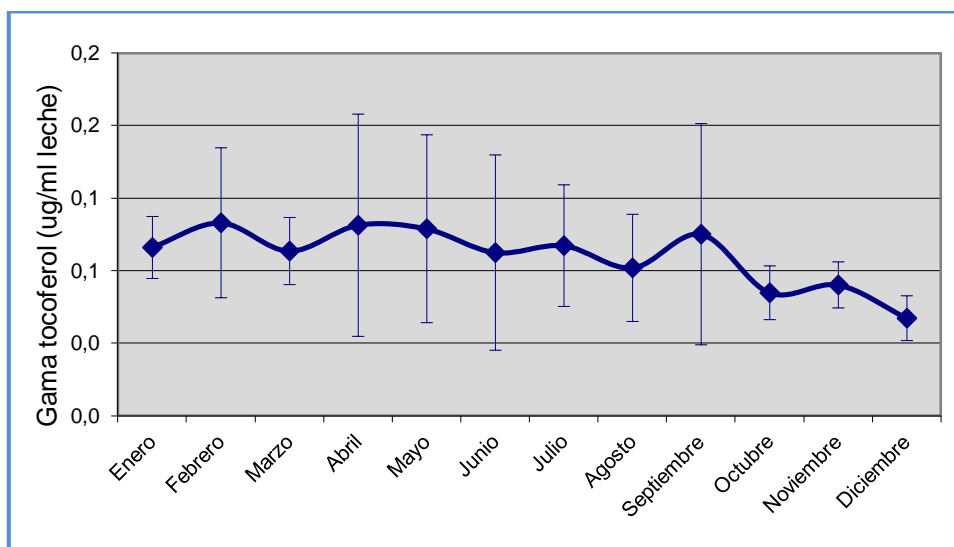
El perfil anual de alfa tocoferol en estos tambos mostró una correlación con el porcentaje de pasturas incluido en la dieta de los animales, como se puede ver en la Figura 3-1, para el tambo número 1489.

Esta distribución de forraje es característica para la zona de Santa Fe, sin embargo, algunos tambos de la misma zona presentan perfiles de forraje más homogéneos durante el año (por ejemplo tambo 314, Figura 3-1).

### 3.1.2 Concentración de gama tocoferol a lo largo de 12 meses.

La concentración de esta vitamina en leche también presentó una alta variabilidad (Figura 3-4). El análisis de los datos mostró una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) en los tres primeros trimestres del año respecto del

último trimestre (período primavera), en el cual se observó una caída en su concentración y además menor variabilidad (ver Tabla 3-1, pág. 64).



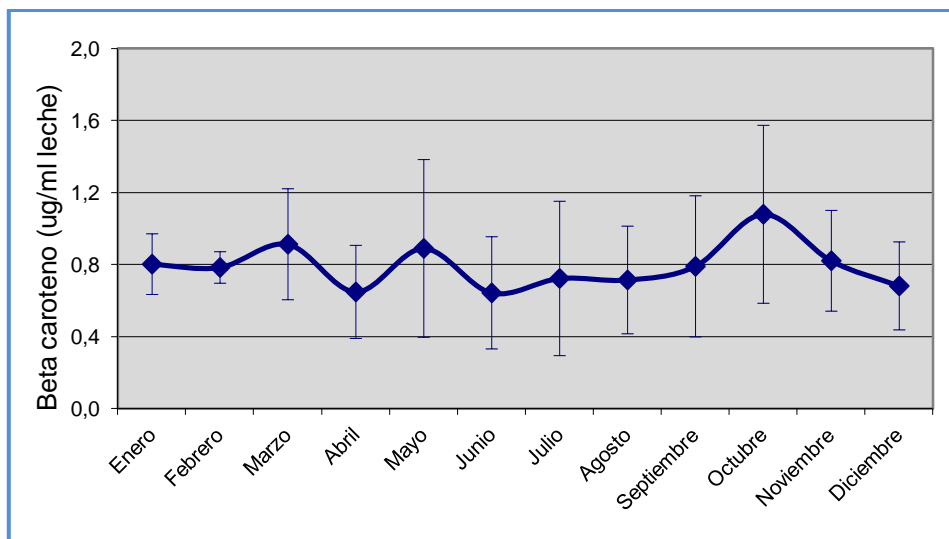
**Figura 3-4 Concentración promedio y desvío de gama tocoferol ( $\mu\text{g}/\text{ml}$  leche) en leche de todos los tambos evaluados**

La presencia del isómero gama tocoferol en leche cruda podría relacionarse con el consumo de oleaginosas (principalmente soja) en forma de expeler o concentrado, ya que los mismos poseen altas cantidades de esta vitamina respecto de otros alimentos. La caída de este isómero en los meses de verano, podría relacionarse con el incremento de pasturas naturales (más ricos en alfa tocoferol) en la dieta de las vacas lecheras.

### 3.1.3 Concentración de retinol y beta caroteno a lo largo de 12 meses.

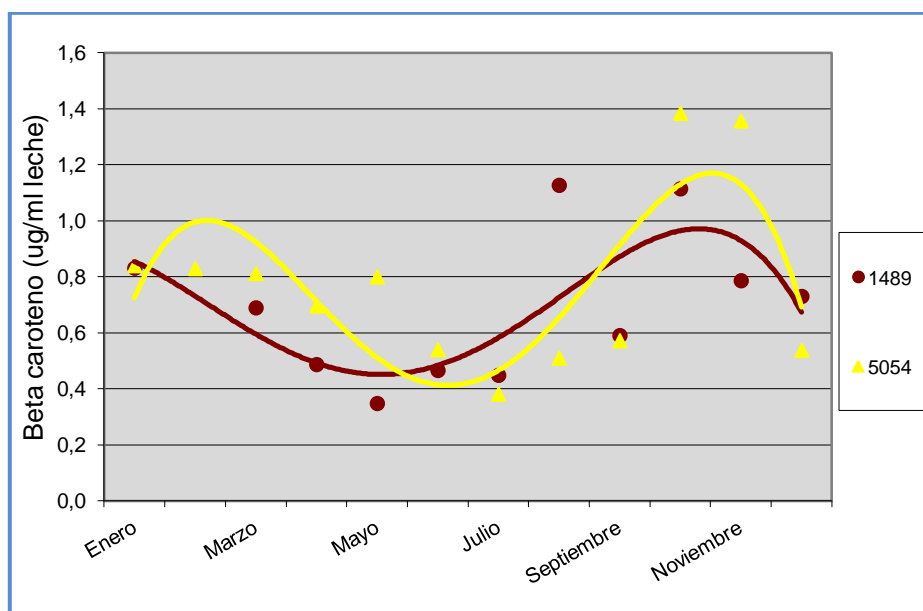
La vitamina A se encuentra presente en tejidos animales mayoritariamente en forma de retinol o sus ésteres y beta caroteno (pro-vitamina A). Se determinaron las concentraciones de ambos compuestos durante el ensayo.

Para el caso del beta caroteno (Figura 3-5) no se observaron diferencias a lo largo del año (ver Tabla 3-1, pág. 64).



**Figura 3-5 Concentración promedio y desvío de beta caroteno en leche de todos los tambos evaluados ( $\mu\text{g}/\text{ml}$  leche).**

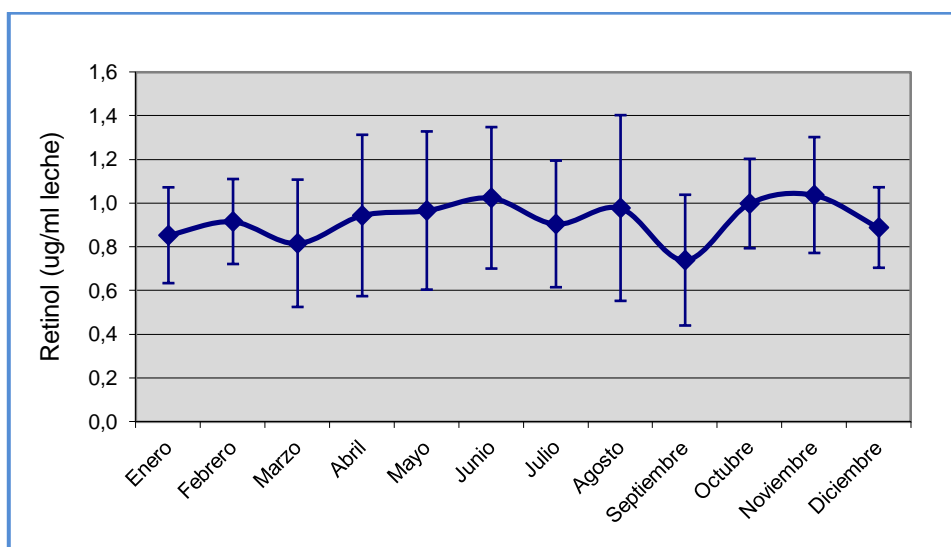
Tampoco se observaron diferencias al agrupar a los tambos por trimestre. Las diferencias entre los tambos y las fluctuaciones mensuales de los mismos, hicieron que el coeficiente de variación fuera muy elevado. Sí se observó cierta tendencia a la estacionalidad para los tambos con alta proporción de pastura en la dieta (Figura 3-6).



**Figura 3-6 Concentración de beta caroteno en leche de dos tambos seleccionados ( $\mu\text{g}/\text{ml}$  leche).**

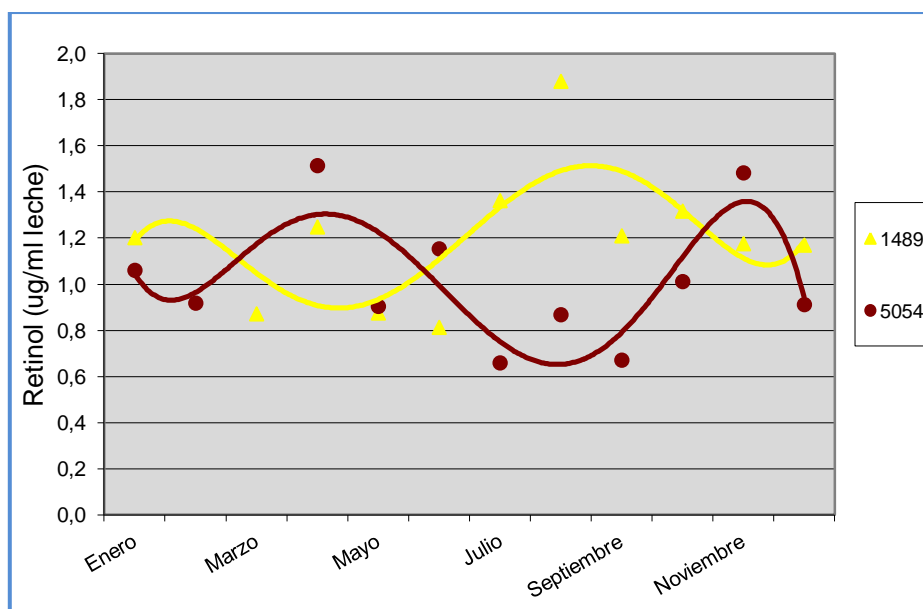
Lo mismo ocurrió en el caso del retinol (Figura 3-7), la concentración resultó altamente dependiente de la concentración de carotenoides en el

alimento y no se observaron diferencias estacionales en esta vitamina considerando el total de tambos, como tampoco se observó en los niveles de beta caroteno (ver Tabla 3-1, pág. 64).



**Figura 3-7 Concentración promedio y desvío de retinol ( $\mu\text{g/ml}$  leche) en la leche de todos los tambos evaluados**

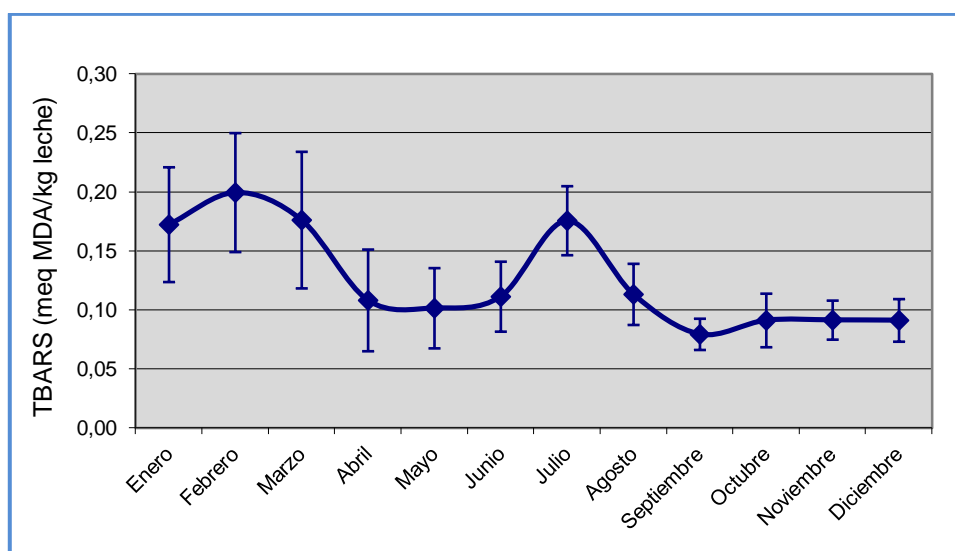
Cuando se observan los tambos individualmente, también se ven variaciones anuales debido a la concentración de carotenoides en los alimentos como es el caso del beta caroteno (Figura 3-8).



**Figura 3-8 Concentración de retinol ( $\mu\text{g/ml}$  leche) en leche de dos tambos seleccionados**

### 3.1.4 Oxidación lipídica a lo largo de 12 meses.

La variación medida por el método de TBARS entre los meses resultó significativa para el ensayo de oxidación lipídica, lográndose la diferenciación de dos grupos (Figura 3-9).

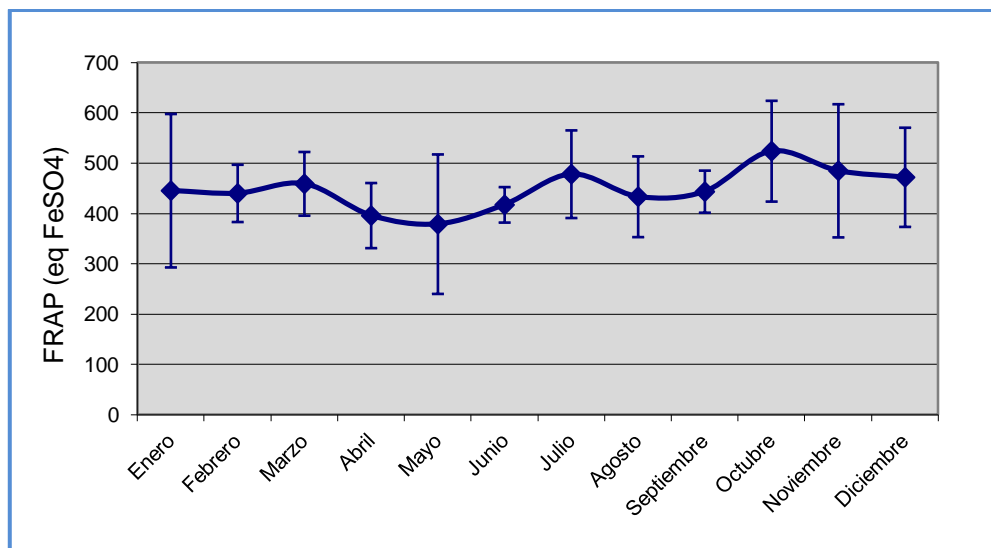


**Figura 3-9 Valores promedio y desvío de TBARS (meq MDA/ kg leche) en leche de todos los tambos evaluados.**

La variabilidad dentro de cada mes de muestreo es alta y ello se evidencia por los coeficientes de variación para cada uno de los parámetros ensayados. Este fenómeno es esperable, ya que las leches tienen diferentes orígenes. Sin embargo al intentar comparar los tambos entre sí, las diferencias no fueron significativas; es decir se encontró mayor diferencia debido a la estación o trimestre de muestreo que a la procedencia de la leche.

### 3.1.5 Poder antioxidante total a lo largo de 12 meses.

No se encontraron diferencias estacionales respecto a la capacidad reductora medida por el método de FRAP (Figura 3-10). Hay una tendencia a bajar en los meses de otoño, pero debido a la alta variabilidad no se observan diferencias significativas.



**Figura 3-10 Valores de FRAP (eq FeSO<sub>4</sub>) en leche de todos los tambos evaluados.**

A continuación se presenta la Tabla 3-1 con los promedios y desvíos mensuales de los compuestos analizados y una discusión de los resultados obtenidos. Se expresan todos los valores en las mismas unidades para mayor claridad.

**Tabla 3-1 Valores promedio de vitaminas, antioxidantes, oxidación lipídica y capacidad antioxidante para todos los tambos evaluados.**

	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
<b>Beta Caroteno (µg/ml leche)</b>	0,699 ± 0,136	0,683 ± 0,070	0,716 ± 0,091	0,565 ± 0,225	0,775 ± 0,397	0,591 ± 0,257	0,565 ± 0,235	0,640 ± 0,154	0,610 ± 0,260	0,940 ± 0,398	0,715 ± 0,206	0,594 ± 0,213
<b>Gama Tocoferol (µg/ml leche)</b>	0,093 ± 0,016	0,106 ± 0,038	0,091 ± 0,019	0,092 ± 0,035	0,103 ± 0,048	0,068 ± 0,015	0,094 ± 0,034	0,131 ± 0,064	0,094 ± 0,028	0,068 ± 0,014	0,072 ± 0,011	0,054 ± 0,012
<b>Alfa Tocoferol (µg/ml leche)</b>	2,000 ± 0,392	1,880 ± 0,358	1,968 ± 0,454	1,618 ± 0,577	1,532 ± 0,679	1,326 ± 0,436	1,503 ± 0,461	1,252 ± 0,134	1,495 ± 0,310	1,787 ± 0,203	1,974 ± 0,339	1,547 ± 0,276
<b>Retinol (µg/ml leche)</b>	0,853 ± 0,22	0,916 ± 0,19	0,816 ± 0,29	0,943 ± 0,37	0,97 ± 0,36	1,024 ± 0,33	0,905 ± 0,29	0,977 ± 0,42	0,739 ± 0,30	0,998 ± 0,20	1,037 ± 0,26	0,888 ± 0,18
<b>Nro. TBA (mg eq. MDA/kg)</b>	0,172 ± 0,055	0,199 ± 0,071	0,176 ± 0,064	0,108 ± 0,042	0,101 ± 0,032	0,111 ± 0,033	0,176 ± 0,085	0,113 ± 0,080	0,079 ± 0,020	0,091 ± 0,023	0,091 ± 0,019	0,091 ± 0,018
<b>FRAP (eq FeSO<sub>4</sub> microM)</b>	445.5 ± 152.5	440.2 ± 56.9	459.2 ± 63.3	396.0 ± 64.7	379.0 ± 138.7	417.4 ± 35.3	478.3 ± 87.1	433.5 ± 80.3	443.6 ± 41.9	524.1 ± 100.2	485.1 ± 132.3	472.1 ± 98.6

Se presentan los promedios +/- desvíos

En el caso del alfa tocoferol, el rango de valores reportados en literatura varía entre 0,2 a 2,0  $\mu\text{g/ml}$  de leche, para el beta caroteno los mismos oscilan de 0,05 a 0,4  $\mu\text{g/ml}$  de leche (Barrefors et al., 1995). En los tambos estudiados por este autor en Suecia, los valores de alfa tocoferol tienen un promedio de 8  $\mu\text{g/gr}$  grasa (que corresponde aproximadamente a 0,32  $\mu\text{g/ml}$  leche), valores muy bajos internacionalmente y muy bajos comparados con los reportados en este ensayo. Para el caso de la vitamina A, Debier et al. (2005) reportaron valores de varios autores que oscilan entre 0,33 a 0,57  $\mu\text{g/ml}$  leche. También indicaron que las variaciones en estas concentraciones están muy relacionadas con la alimentación, así como los valores de ácidos grasos.

Estos resultados confirman la variabilidad en los niveles de vitaminas obtenidos en las leches de diferentes tambos, ya que su perfil, así como el de los ácidos grasos, es modulado por la dieta. Por el mismo motivo se encontró variación estacional también en la concentración de alfa y gama tocoferol.

Sin embargo, al realizar el seguimiento de algunos tambos en forma individual se observó que la concentración de alfa tocoferol en el primer y cuarto (primavera- verano) trimestre del año fueron significativamente más altas que el segundo y tercer trimestre. Esto se condice con el aumento de pastura fresca en la dieta. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Rafalowski et al. (2014) en donde las concentraciones más altas de vitaminas correlacionaron con el pastoreo natural en primavera-verano y las más bajas con las épocas de encierro de los animales en invierno en Polonia durante dos años.

A su vez, el gama-tocoferol es el isómero mayoritario en suplementos como aceites o expeler de soja. Por ello la disminución que se observó en el cuarto trimestre, junto con el aumento de alfa tocoferol indicaría un aumento en la alimentación con pasturas naturales y menor aporte de silaje. Asimismo, el contenido de este isómero fue de casi un orden menos que el isómero alfa, esto está dado por la incorporación diferencial en el metabolismo que tienen los distintos isómeros (Schwartz et al., 2008).



Tomando todos los tambos en conjunto no se encontraron diferencias en beta caroteno ni retinol. Sin embargo, como en el caso del alfa tocoferol, en aquellos tambos con alta proporción de pastura, el beta caroteno mostró una clara estacionalidad, por lo cual este compuesto pudo asociarse al tipo de dieta que recibieron las vacas lecheras. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo de trabajo en el marco del Proyecto Nacional de Lechería (Taverna, 2005).

Respecto a la oxidación lipídica, las leches del período estival (enero-marzo) se diferenciaron claramente de las de otoño-invierno (abril- agosto). En este último grupo, las leches del mes de julio presentaron diferencias dentro del grupo. La oxidación lipídica depende de la composición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en las muestras biológicas y por ende de la alimentación de los animales. Havemose et al. (2004) reportaron que las pasturas de verano aportan mayor concentración de PUFA que las dietas de silaje (generalmente otoño-invierno), lo cual explicaría el mayor nivel de TBARS durante el primer trimestre. Rafalowski et al. (2014) también encontraron una variación estacional relacionada con el consumo de pastura en los valores del índice de estabilidad oxidativa en la crema de leche de tanque analizada durante un período de dos años. Entonces, si bien una alta proporción de pastura en la dieta favorece la incorporación de antioxidantes naturales a la leche cruda, también modifica la concentración de algunos ácidos grasos poli-insaturados y por ello la susceptibilidad a la oxidación lipídica.

Para estas mismas muestras, se observó un comportamiento estacional de ciertos ácidos grasos asociados a la disponibilidad y consumo de pasturas por parte de los animales, observándose valores máximos de *trans*-18:1, 18:3 y CLA en el período primavera-verano. Sin embargo, esta tendencia no se observa en el caso del 18:2 (datos no presentados) (Taverna, 2005).

### 3.1.6 Conclusiones del ensayo.

Se pudo determinar que la composición de la leche de tambos comerciales sufrió variaciones en relación a la concentración de vitaminas y su capacidad antioxidante.

Estas modificaciones, en parte estuvieron asociadas a la oferta o no de pastura en la dieta ya que hubo una correlación entre la alimentación del ganado lechero con la concentración de estos compuestos de interés. Estos elementos podrían servir para diferenciar la calidad de la leche, ya que actualmente los consumidores aprecian el carácter natural de los alimentos que consumen.

Hasta el momento no se contaba con información bien registrada y sistematizada sobre este tipo de micronutrientes esenciales, siendo éste un gran avance para la determinación de la calidad de la leche en nuestro país, principalmente en la cuenca central.

### **3.2 Descripción química de los alimentos usados en las dietas de vacas lecheras.**

La caracterización química de las dietas animales provee la posibilidad de modular la presencia de compuestos biológicamente activos en los productos derivados. En particular, puede modificar el perfil lipídico, contenido de vitaminas, estatus antioxidante, etc. de la leche a través de la alimentación de las vacas lecheras (Calderón et al., 2007b).

Los recursos forrajeros son esenciales en Argentina, la mayor parte de la ganadería bovina se realiza sobre pastizales y pasturas. La alfalfa (*Medicago sativa* L.), es uno de los alimentos más usados en las dietas de las vacas lecheras (Castillo et al., 2006) y constituye un componente vital en los tambos de Argentina. Por ellos es importante caracterizar los nutrientes esenciales que la misma aporta a la leche junto con los suplementos que se utilizan en alimentación animal.

En esta sección se presentan tablas con las concentraciones de compuestos antioxidantes, volátiles y ácidos grasos de los distintos componentes de las dietas animales. Se discute la función, presencia y concentración de estos compuestos. Antioxidantes naturales: vitaminas liposolubles.

En el transcurso de cuatro años de ensayos, se analizaron diferentes fuentes de alimentos. Los valores resultaron altamente variables ya que, como se mencionó en la introducción, en las pasturas la producción de metabolitos secundarios depende de la naturaleza del cultivar y del estado fenológico de las plantas, mientras que en los productos procesados, dependen del tipo de procesamiento y su conservación, exposición a la luz, temperatura, aire, etc.

Como ejemplo, en la Tabla 3-2, (pag 71) se observa que los valores de gama tocoferol oscilaron entre 6,4 y 16,6 mg/kg MS para alfalfa fresca, 45,7 a 83,9 mg/kg MS para el alimento balanceado y 101,5 mg/kg MS en el expeler de soja, siendo los de la soja los valores más elevados que se encontraron, ya que este vegetal produce gama tocoferol como isómero

mayoritario de la vitamina E. Los valores reportados por Müller et al. (2007) para pasturas frescas fueron de alrededor de 4 mg/kg MS y no se encontró una gran pérdida en el procesamiento de las mismas, a diferencia del alfa tocoferol o de los carotenos.

El girasol es una fuente de alfa tocoferol por excelencia, no así de gama tocoferol cuyos niveles resultaron muy bajos en el expeler correspondiente (entre 3,3 y 3,6 mg/kg MS). En el aceite de girasol, la proporción entre los isómeros alfa y gama es de 1% de gama respecto al alfa tocoferol (Aladedunye and Przybylski, 2013). En el expeler esta proporción no se mantuvo, probablemente por el proceso de elaboración del mismo.

Respecto a los valores obtenidos para el alfa tocoferol, en alfalfa fresca fueron de 78,3 a 81,5 mg/kg MS, en pastura fresca de avena se observaron concentraciones menores (16 mg/kg MS) y entre 8 y 55 mg/kg MS para el heno de alfalfa, variando según el año y estación (Tabla 3-2). En las pasturas frescas, la relación encontrada entre el alfa y gama tocoferol suele ser entre 5 y 10 veces menor para el isómero gama y ésta se mantiene en el heno de alfalfa.

En pasturas frescas, Müller et al. (2007) reportaron valores de alfa tocoferol que variaron desde 8 hasta 275 mg/kg MS, en *Holcus* spp. y *Bromus* spp. los valores más bajos y *Festuca pratensis* (plantas jóvenes) los más altos. En esta última especie, en plantas maduras, el valor cae hasta <50 mg/kg MS y para la alfalfa el valor reportado fue de 70 mg/kg MS, similar a lo obtenido en nuestros ensayos. En el caso del heno, los valores de esta vitamina variaron entre 10 y 60 mg/kg MS (con un rango de 10-30 en la alfalfa) y para el silaje de pasturas entre 30 a 76 mg/kg MS (con un rango de 30-45 para el caso de la alfalfa). Los valores en el heno fueron muy similares a los nuestros. La pérdida de vitaminas durante el henolaje es esperable y oscila entre un 20 y 60% del valor en materia fresca, dependiendo de las condiciones de procesamiento. Es por esto que se deben realizar esfuerzos por reducir al mínimo esta pérdida para mantener la calidad de los alimentos (Pagan et al., 2005).

En los concentrados comerciales los valores de alfa tocoferol variaron entre 30 y 45 mg/kg MS (Marino et al., 2014). Estos valores son un poco superiores a las concentraciones medidas en los alimentos balanceados en nuestros ensayos.

En el caso de los carotenoides de importancia en leche, para el beta caroteno se obtuvieron concentraciones promedio de 139 mg/kg MS en alfalfa y 66 mg/kg MS en avena en pasturas frescas. Junto a la luteína con valores de 481 y 1128 mg/kg MS para alfalfa y avena respectivamente, son los ingredientes dietarios con mayor proporción de estos compuestos. Para el heno de alfalfa, la descomposición de beta caroteno fue importante, llegando a representar un 90% de pérdida, con valores finales de entre 0,6-13 mg/kg MS y no encontrándose concentraciones detectables de luteína.

En los alimentos balanceados comerciales, los niveles de beta caroteno fueron mínimos y de 85 mg/kg MS de luteína. En el silo de maíz utilizado en los ensayos, los valores fueron de 13 y 41 mg/kg MS para beta caroteno y luteína respectivamente.

En los concentrados prácticamente no se encuentran carotenos, esto se explicaría por el proceso de cocción y secado al que son sometidos los mismos y que degradarían estos compuestos. Además, en los concentrados que provienen del maíz hay que considerar que inicialmente las concentraciones de estos compuestos son bajas. En ninguna de nuestras muestras se encontraron concentraciones apreciables, sólo trazas.

Prache et al. (2009) reportaron valores entre 40 y 123 µg/g MS para beta-caroteno (60 µg/g MS para alfalfa) y entre 152 a 437 µg/g MS para la luteína (152 para alfalfa) en muestras de pasturas tomadas entre primavera (mayo) y verano (julio). Müller et al. (2007) encontraron valores de beta caroteno de 31-53 mg/kg MS en pastura fresca y entre 10,3 a 44,4 mg/kg MS en silaje y henolaje de una mezcla de *Phleum pratense*, *Festuca pratensis* y una pequeña proporción de *Agropyron repens* (0,45:0,45:0,1). Respecto a la luteína, 138-211 mg/kg MS para la pastura fresca y 51,9 a 361,6 mg/kg MS

en silaje y henolaje. Estos valores fueron concordantes con los obtenidos en estos ensayos.

Variaciones similares a los de Prache et al. (2009) encontraron Calderón et al. (2006) en los niveles de carotenoides en pasturas de montaña, con valores entre 18 y 60,4 µg/g MS para beta caroteno y entre 96 y 262 µg/g MS para la luteína. Chauveau-Duriot et al. (2010) encontraron una pérdida promedio de carotenoides de 83% entre las pasturas frescas y el heno, valores análogos a los reportados en nuestros ensayos, esto podría deberse al método de conservación o las condiciones ambientales.

En nuestros ensayos, el silaje de maíz tuvo baja concentración de carotenos, en concordancia con resultados de literatura (McDonald et al., 2010).

La luteína es una de las xantófilas presentes en los alimentos, además de la criptoxantina y zeaxantina, sin embargo, a pesar de las concentraciones elevadas de este compuesto en las pasturas, tiene una tasa de conversión muy baja o prácticamente nula en vitamina A (McDonald et al., 2010).

En resumen, como se observa en la Tabla 3-2, las pasturas frescas son las que presentaron mayores concentraciones de alfa tocoferol, beta caroteno y luteína entre todos los alimentos estudiados. Los rangos altos entre valores en un mismo tipo de alimento son debido a variaciones estacionales, estado fenológico y tecnología de conservación, entre otros factores. Además, otros componentes de la dieta con menor variación también son fuente de antioxidantes, pero su contribución fue menos marcada que la de las pasturas.

**Tabla 3-2 Concentración de antioxidantes liposolubles en componentes dietarios usados en los distintos experimentos.**

Alimento	<b>Promedio o rango (de acuerdo a variabilidad) (mg/kg MS)</b>			
	Gama tocoferol	Alfa tocoferol	Beta caroteno	Luteína
Pastura fresca				
Alfalfa	6,4 - 16,6	79,9	139,5	481,9
Avena	9,1	16,1	66,7	1128,2
Heno Alfalfa	2,8 - 4,1	8,5 - 55,0	0,6 - 13,1	nd*
Balanceado comercial	45,7- 83,9	9,2 - 24,2	<1,1	85,8

Silo Maíz	20,1	17,7	13,2	41,6
Afrechillo trigo	48,8	27,5	nd	nd
Expeler girasol	3,5	20,8	nd	nd
Expeler soja	101,5	7,0	0,3	nd
Pellets Girasol	1,5	2,4	0,4	nd

nd\*: no detectado

### 3.2.2 Antioxidantes naturales: polifenoles.

Los datos mostrados en la Tabla 3-3 indican que el cumestrol es el fitoestrógeno mayoritario encontrado en pastura y heno de alfalfa, silo de maíz, expeler de girasol y afrechillo de trigo. El alimento balanceado mostró mayores niveles de daidzeína que los otros componentes de la dieta, probablemente derivado de la soja. En este experimento no se diferenció entre las formas aglicona y glucósido dado que la extracción se llevó a cabo en medio ácido, por lo tanto las isoflavonas son hidrolizadas y convertidas en su forma aglicona.

Dentro de las leguminosas, la alfalfa es una de las especies con menor concentración total de estos compuestos, reportándose 0,9 y 1,47 mg/kg MS para genisteína y daidzeína respectivamente (Rodrigues et al., 2014).

**Tabla 3-3 Concentración de polifenoles en componentes dietarios usados en los experimentos realizados en INTA con vacas lecheras**

Alimento	Promedio (mg/kg MS)		
	Genisteína	Daidzeína	Coumestrol
Pastura fresca			
Alfalfa	2,165	5,568	25,821
Heno Alfalfa	2,103	1,962	18,461
Balanceado comercial	1,110	14,061	10,993
Silo Maíz	1,593	5,070	22,731
Afrechillo de trigo	1,085	1,665	14,652
Expeler de Girasol	2,884	2,035	11,943

### 3.2.3 Compuestos volátiles.

La pastura de alfalfa fue el componente de la dieta que tuvo los valores más elevados de compuestos volátiles (Tabla 3-4). El compuesto mayoritario en la alfalfa, el d-limoneno no sólo fue el terpeno más abundante, sino que además se lo encontró en todos los componentes de la dieta. Solamente dos

compuestos minoritarios, el nerol, y el linalyl acetato fueron encontrados exclusivamente en la alfalfa. El terpin-4-ol fue encontrado exclusivamente en el silaje de maíz. Los valores de occimeno fueron el doble en pastura de alfalfa que los otros componentes y el de linalool fue 4 veces mayor que en silaje de maíz y afrechillo de trigo. No hay mucha literatura respecto a los volátiles presentes en alimentos para ganado. Sin embargo, según Buttery et al. (1982), el occimeno es un terpeno que está ampliamente distribuido en la naturaleza y hasta hace algunos años era el terpeno más abundante reportado en EEUU en flores de alfalfa, seguido en una proporción mucho menor por el limoneno. A diferencia de esto, Pecetti et al. (2002) reportaron en que, en general, la concentración de terpenos en las flores de alfalfa era muy baja y que los compuestos mayoritarios eran aldehídos y alcoholes. El estado fenológico de las plantas es un factor importante a tener en cuenta en el momento de analizar los compuestos volátiles presentes y ambos autores trabajaron sobre flores de alfalfa.

**Tabla 3-4 Terpenoides volátiles presentes en componentes dietarios usados en los ensayos de INTA con vacas lecheras**

**Promedio Terpenoides (Unidades de Área Relativas)**

Alimento	d-limoneno	p-cymeno	Occimeno	Linalool	Menthol	Terpinen-4-ol	$\beta$ -ciclocitral	Nerol	Linalyl-acetato	$\beta$ -caryophylleno	Geranyl acetona	%CV <sup>a</sup>
Pastura fresca												
Alfalfa	52,919	0,109	0,164	0,985	nd	nd	0,412	0,052	0,021	0,061	0,089	36,1
Avena	2,392	0,086	nd	nd	nd	nd	0,051	nd	nd	nd	nd	12,01
Balanceado comercial	3,586	0,026	0,009	nd	nd	nd	0,004	nd	nd	0,018	0,024	14,29
Silo de maíz	8,577	0,009	nd	0,116	nd	0,002	0,107	nd	nd	0,071	0,122	18,07
Afrechillo de trigo	1,126	nd	0,077	0,136	nd	nd	nd	nd	nd	0,044	0,028	8,83
Expeler de Girasol	0,251	nd	0,062	0,072	nd	nd	nd	nd	nd	0,017	nd	17,45

<sup>a</sup>Coefficiente de variación promedio de todos los volátiles para cada compuesto dietario.



En nuestro caso, también en las muestras de alfalfa se encontraron las mayores concentraciones de aldehídos volátiles comparadas con el resto de los componentes de la dieta. El más abundante fue el trans-2-hexenal, como se observa en la Tabla 3-4. De acuerdo a Pecetti et al. (2002) este es el volátil más abundante en estas plantas y proviene de la degradación de los lípidos, en particular de la oxidación enzimática del ácido linoléico. Además, Tava and Pecetti (1997) reportaron que el trans-2-hexenal era el volátil más frecuente en 13 genotipos de alfalfa, coincidiendo de esta manera con nuestros resultados. Lo mismo sucede con la pastura de avena pero en menor concentración. Para el silo de maíz, el aldehído mayoritario fue el 3-metil-butanal y para los componentes que tienen algún tipo de tratamiento térmico como el balanceado y el expeler, la cantidad de volátiles encontrada fue muy baja.

**Tabla 3-5 Aldehídos volátiles presentes en los componentes dietarios usados en los ensayos de INTA con vacas lecheras**

Alimento	Promedio Aldehídos (Unidades de Área Relativas)									%CV <sup>a</sup>
	3-methyl-butanal	pentanal	hexanal	trans-2-hexenal	heptanal	trans-2-heptenal	octanal	nonanal	trans-2-nonenal	
Pastura fresca										
Alfalfa	0,161	0,363	0,889	6,689	0,056	0,175	0,215	0,235	0,292	30,08
Avena	0,022	0,016	0,360	1,911	nd	0,067	nd	0,039	0,019	9,66
Balanceado comercial	0,026	0,008	0,130	nd	0,018	0,058	0,041	nd	nd	14,04
Silo de maíz	4,877	0,036	0,129	0,302	0,091	0,292	0,143	nd	0,022	6,62
Afrechillo de trigo	0,020	0,013	0,190	0,030	0,038	0,176	0,017	0,205	0,081	5,11
Expeler de Girasol	nd	nd	0,192	nd	nd	0,154	nd	0,158	nd	14,22

<sup>a</sup>Coeficiente de variación promedio de todos los volátiles para cada compuesto dietario.

Estos resultados mostraron que la composición de las dietas podría ser evaluada por un grupo de volátiles y sus cantidades relativas y no sólo por un compuesto determinado.

### 3.2.4 Ácidos grasos.

Se evaluaron las concentraciones de los ácidos grasos presentes en la alfalfa utilizada en nuestros ensayos en primavera, verano y otoño. Se

encontró que la estación afectaba el extracto etéreo (EE%) y la composición de la alfalfa (Tabla 3-6). En otoño aumentan los valores de C18:2 y disminuyen C16:0, C16:1 y C18:0. Entre primavera y verano las diferencias estuvieron en C16:1, C18:0, C18:2 y C18:3. El EE% y la contribución de C18:2 y C 18:3 fueron mayores en otoño comparado con las otras estaciones.

**Tabla 3-6 Composición de ácidos grasos (%), extracto etéreo (EE) y mg/g EE de C18:2 y C18:3 de cultivos de alfalfa en distintas estaciones del año.**

Estación	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	18:3	EE%	18:3 mg	18:2 mg
Primavera	29,4b	2,4c	5,6b	6,8	16,1a	39,4b	2,0a	0,80a	0,33a
Verano	31,0b	1,8b	6,6c	6,9	18,9b	33,9a	2,2a	0,75a	0,41b
Otoño	20,0a	1,5a	3,2a	7,6	27,4c	40,8b	3,3b	1,33b	0,89c
%CV	0,80	0,09	0,22	0,61	0,66	1,05	0,07	0,04	0,02

<sup>abc</sup>Misma columna con distintas letras difiere significativamente ( $p < 0.05$ )

En la Tabla 3-7 se muestra la composición de ácidos grasos, de los distintos componentes de las dietas usados en nuestros ensayos. Como es de suponer, el perfil de los mismos varía según el compuesto analizado.

En las pasturas de alfalfa, el ácido graso mayoritario fue el 18:3. Ésta podría ser la molécula que origina los aldehídos ramificados, especialmente el trans-2-hexenal.

**Tabla 3-7 . Ácidos grasos en componentes dietarios usados en los ensayos en INTA**

Alimento	Ácido graso (%) <sup>a</sup>							%CV <sup>b</sup>
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	18:3/18:2	
Pastura Alfalfa	33.21	5.14	9.06	17.20	13.21	22.06	1.69	14.57
Heno Alfalfa	38.42	3.79	8.73	14.56	18.41	15.89	0.82	32.88
Balanceado comercial	16.84	0.39	2.57	27.31	49.58	3.24	0.06	13.69
Silo de maíz	27.97	1.67	7.89	16.74	37.14	8.51	0.23	28.29
Afrechillo de trigo	18.02	0.58	1.69	21.23	54.21	4.03	0.07	8.25
Expeler de Girasol	15.72	0.48	4.78	30.01	48.57	nd	nd	13.29

<sup>a</sup>Coeficiente de variación de todos los ácidos grasos para cada compuesto dietario.

### 3.2.5 Conclusiones del ensayo.

La composición de los alimentos en relación a la presencia y concentración de compuestos de interés como vitaminas antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados, compuestos liposolubles, etc. está ligada a la naturaleza de los mismos, la forma de conservación y preparación y en el caso de los forrajes, la especie utilizada.

Como se mencionó, las pasturas modifican muy significativamente la presencia de determinados compuestos en leche. Dado que muchos factores afectan estas modificaciones, aún es difícil determinar de antemano la concentración suministrada a los animales.

En nuestro país, es muy poco lo que se ha estudiado respecto a la composición de la dieta en cuanto a antioxidantes y terpenos. La correlación entre ciertas moléculas asociadas a la dieta puede ser usada en el futuro para trazabilidad respecto a la alimentación y/o para conferirle a los productos lácteos propiedades nutricionales específicas. Por lo tanto, se podría modular la presencia y concentración de antioxidantes y terpenos en la dieta de la vaca lechera en pos de conseguir una alimentación tendiente a proveer cantidades adecuadas de estos compuestos para que sean transferidos a la leche y productos lácteos, obteniendo así alimentos de elevada calidad nutricional.

En el siguiente punto se discutirá la oferta de los compuestos presentados en la dieta de los animales y su transferencia a la leche y productos lácteos.

Los recursos forrajeros son esenciales en Argentina, la mayor parte de la ganadería bovina se realiza sobre pastizales y pasturas. La alfalfa (*Medicago sativa* L.), es uno de los alimentos más usados en las dietas de las vacas lecheras y constituye un componente vital en los tambos de Argentina. Por ello es importante caracterizar los nutrientes esenciales que ella aporta a la leche junto con los suplementos que se utilizan en alimentación animal.

### **3.3 Modificación en la concentración de antioxidantes naturales en leche mediante la inclusión de alfalfa en la dieta de vacas lecheras.**

#### **3.3.1 Composición general y contenido de antioxidantes en la leche.**

Como se observó en el ensayo de evaluación de leche de tambos comerciales, la concentración de vitaminas antioxidantes y oxidación lipídica mostró una alta variabilidad asociada a los diferentes meses del año. Dado que esta variabilidad se asoció a su vez a la presencia de pasturas con valores más elevados de antioxidantes liposolubles en las leches procedentes de tambos con alimentación pastoril, se planteó un ensayo para precisar la cinética de incorporación de estos compuestos en la leche y asociar el aporte pastoril de la dieta con características de calidad bioquímica, microbiológica y biológica en la leche.

En algunos países la percepción del consumidor respecto de una dieta pastoril está asociada a los criterios de producción ecológicamente sustentables. Esta leche a su vez pueden relacionarse con el aumento en compuestos nutricionales de interés sensorial y biológico (Martin et al., 2005b), como los microconstituyentes liposolubles i.e. la vitamina E y el beta caroteno en su rol de antioxidantes y los carotenoides en su rol de provitamina A (Calderón et al., 2007b).

Por ello la hipótesis de trabajo que se planteó en este ensayo fue que las dietas contrastantes en pastura de alfalfa conferirían a la leche características diferenciales que podrían mejorar la calidad nutricional y sensorial de la misma.

Para ello se tomaron 10 vacas lecheras de lactancia media que se sometieron durante 20 días a una dieta de corral, sin aporte de pasturas, tal como se indicó en la sección de materiales y métodos y luego de 20 días se separaron en dos grupos, uno de los cuales continuó con la alimentación a base de grano de sorgo, mientras que al otro grupo se lo alimentó con 70% de alfalfa en un sistema de pastoreo por franjas, de modo que cada animal recibió la dieta de forma individual. En la Tabla 3-8 se ilustra el consumo de

para cada tipo de dieta A70 (alfalfa 70%) o dieta A0 a base de silaje de sorgo (alfalfa 0%).

**Tabla 3-8 Composición de la dieta para vacas con tratamiento 70% Alfalfa (A70) y 0% Alfalfa (A0).**

Alimento	A70		A0	
	Consumo Kg/vaca/día	% Total consumido	Consumo Kg/vaca/día	% Total consumido
Alfalfa	13,4	62,4	0	0
Silo de sorgo	0	0	9,3	46,0
Alimento balanceado	8,1	37,6	5,4	26,6
Pellets de girasol	0	0	1,0	5,1
Expeller de soja	0	0	3,1	15,5
Heno	0	0	1,4	6,8
<b>TOTAL</b>	<b>21,5</b>	<b>100</b>	<b>20,2</b>	<b>100</b>

Las dietas fueron isoenergéticas (2,46 and 2,47 Mcal/kg MS para A70 y A0 respectivamente) y alta fibra con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para las dietas A0 respecto de A70 (35,7 vs. 33,9% MS para FDN y 19,3 vs. 16,7% MS para FDA).

A continuación se presentan los datos de composición de la leche cruda obtenida del estudio en cada uno de los tratamientos (Tabla 3-9).

**Tabla 3-9 Composición de la leche cruda.**

Dieta	Tiempo	Lípidos totales (g/100g leche)	Proteínas totales (g/100g leche)	Lactosa (g/100g leche)	SNG (g/100g leche)	ST (g/100g leche)	RCS	pH	Acidez (°D)
A0	0	3,6	3,1	5,2	9,0	12,6	57,8	nd	nd
	20	3,1	3,2	5,1	8,9	12,0	103,6	6,7	13,7
	40	3,2	3,0	4,9	8,6	11,8	215,3	6,7	12,8
	60	3,4	3,1	4,8	8,6	12,0	175,8	6,7	12,3
A70	0	3,1	3,2	5,0	8,9	12,0	139,6	nd	nd
	20	2,2	3,3	4,8	8,8	10,7	147,2	6,7	14,3
	40	2,2	3,2	4,8	8,6	10,5	137,6	6,7	13,5
	60	3,2	3,2	4,7	8,5	11,7	222,0	6,7	13,1

\*nd: no determinado; SNG: sólidos no grasos, ST: sólidos totales, RCS: recuento de células somáticas, pH y acidez expresada en grados Dornic

Los niveles de producción obtenidos fueron elevados teniendo en cuenta el momento de la lactancia (entre los 128 y 218 días de lactancia) y con una

leve pero positiva ganancia de peso. En la dieta A70, la producción promedio de leche (31,78 L/vaca/día) y el rendimiento promedio en proteína (3,22 %) fueron superiores ( $p < 0,05$ ) a los valores en la dieta A0 (26,14 L/vaca/día y 3,20% de proteína). Las concentraciones de lípidos totales fueron especialmente bajas en A70 respecto a las obtenidas en A0 ( $p < 0,01$ ). Salvo para el contenido de ST el resto de las variables analizadas no fueron significativamente distintas ( $p < 0,05$ ). No existieron diferencias significativas entre semanas ni en la interacción ( $p < 0,05$ ).

Este resultado es similar al reportado por Boland (2003) que demostró que la alimentación con alto grado de pastura favorece la producción de leche y por lo tanto puede ser una opción para un tipo de producción lechera rentable.

Al mismo tiempo se calcularon las cantidades de antioxidantes consumidos en promedio por las vacas de los tratamientos A70 o A0 (Tabla 3-10).

**Tabla 3-10 Consumo diario (mg/v/d) de vitaminas en cada tratamiento**

Consumo (mg/v/d)	Dieta	
	A70	A0
Gama tocoferol	909,08	1421,41
Alfa tocoferol	404,40	280,55
Beta caroteno	118,40	30,22

(mg/v/d): estimado promedio de cada compuesto (mg) por vaca por día. A70: pastoreo en alfalfa; A0 alimentación a corral a base de silage de sorgo

Como se observa en la Tabla 3-10, las vacas del tratamiento A70 consumieron menor cantidad de gama tocoferol y mayor de alfa tocoferol y beta caroteno que las vacas del tratamiento A0 ( $p < 0,05$ ).

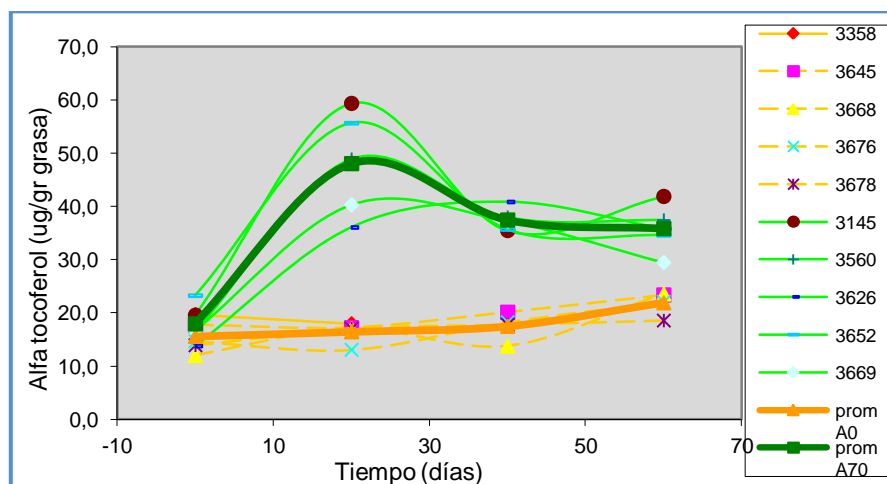
Como el porcentaje de grasa de las leches de la dieta A70 resultaron menores, en las figuras de incorporación de vitaminas liposolubles se ilustra la concentración de cada vitamina en las vacas individuales relativas al porcentaje de grasa de la misma leche.

Sin embargo a los efectos de comparar con datos de literatura, se consideró también la concentración por ml de leche y los análisis estadísticos, ya sea relativo a grasa o a volumen de leche, mostraron las mismas tendencias.

En los gráficos que se presentan a continuación, cada cifra de 4 números de la leyenda corresponde a la nomenclatura de una vaca lechera particular. Las vacas de dieta pastoril A70 se representaron en color verde y las A0 en color naranja. También con líneas gruesas se representan los respectivos promedios.

### 3.3.1.1 Vitamina E.

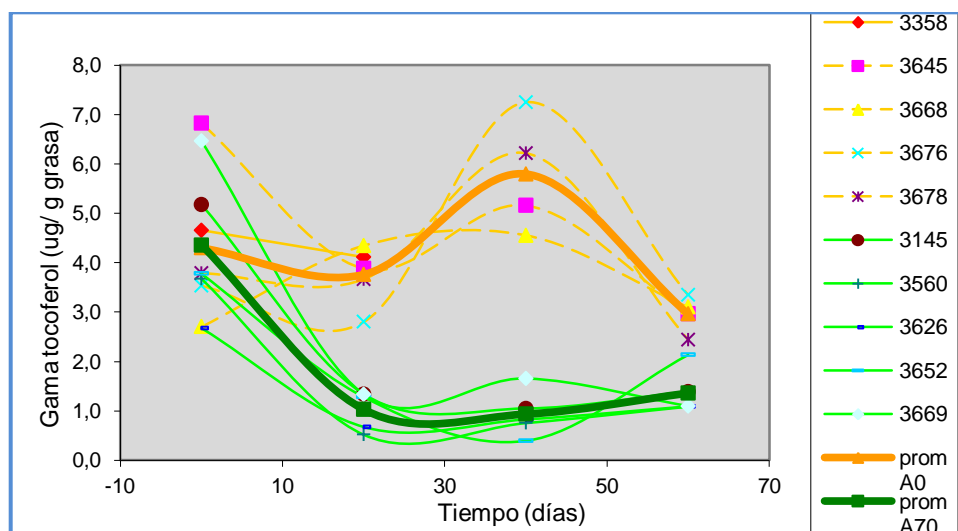
La incorporación de alfa tocoferol fue mayor en las leches del tratamiento A70 (Figura 3-11). A los 20 días se alcanzó un valor máximo en la concentración promedio de esta vitamina, mientras que en las leches del tratamiento A0 se mantuvieron en niveles significativamente más bajos a lo largo de todo el tratamiento ( $p < 0,05$ ). Este fenómeno había sido observado por Calderón et al. (2007b) para vacas lecheras de la raza Montbéliarde que habían recibido una dieta pastoril. El alfa tocoferol se mantuvo en los niveles alcanzados a los 20 días durante todo el ensayo (60 días), demostrando que la alimentación pastoril indujo un cambio persistente en la concentración de esta vitamina en la leche.



**Figura 3-11 Dinámica de incorporación de alfa tocoferol a la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación.**

Las diferencias entre las leches del tratamiento A0 y A70 resultaron significativas ( $p < 0,05$ ) a partir de los 20 días de ensayo.

En la Figura 3-12 **Error! Reference source not found.** se observa el efecto contrario para el gama tocoferol. Si bien en la dieta este isómero fue mayoritario (Tabla 3-10), su incorporación a la leche fue diez veces menor a la del isómero alfa.



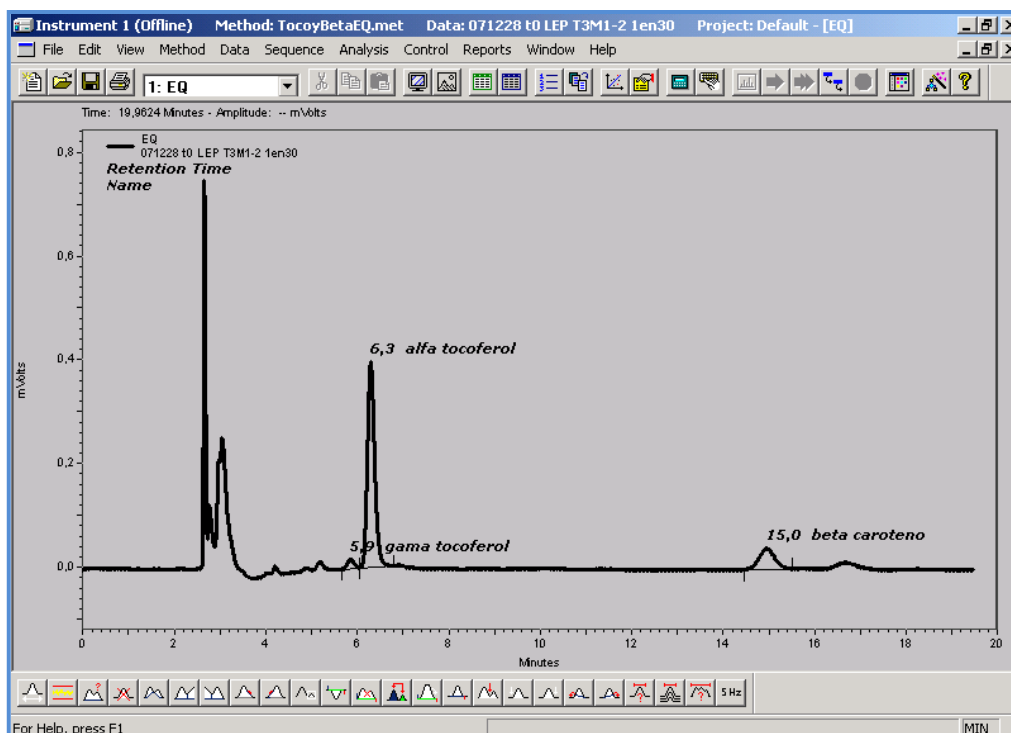
**Figura 3-12 Dinámica de incorporación de gama tocoferol a la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días.**

Este fenómeno se debe a la absorción diferencial de los isómeros de la vitamina E (Traber, 2013) y también fue observado en otros ensayos llevados a cabo por el grupo de trabajo (Descalzo et al., 2012). La mayor concentración de gama tocoferol fue característica del tratamiento con alimentación con grano y resultó aproximadamente dos veces mayor que la concentración en el tratamiento A70.

Los isómeros beta y delta tocoferol fueron encontrados en algunos alimentos derivados de soja, pero no en la leche, al menos en los niveles detectables en el sistema de cuantificación que se utilizó en el presente trabajo.

En la Figura 3-13 se muestra un cromatograma característico de una leche de origen pastoril en la cual se observa la diferencia encontrada para los dos isómeros en leche cruda.





**Figura 3-13 Cromatograma de tocoferoles y carotenos por detección EQ**

Este trabajo describe por primera vez la dinámica de incorporación de isómeros de la vitamina E en leches de vacas alimentadas con dietas contrastantes en pastura de alfalfa en Argentina y es uno de los pocos que describen este fenómeno a nivel internacional.

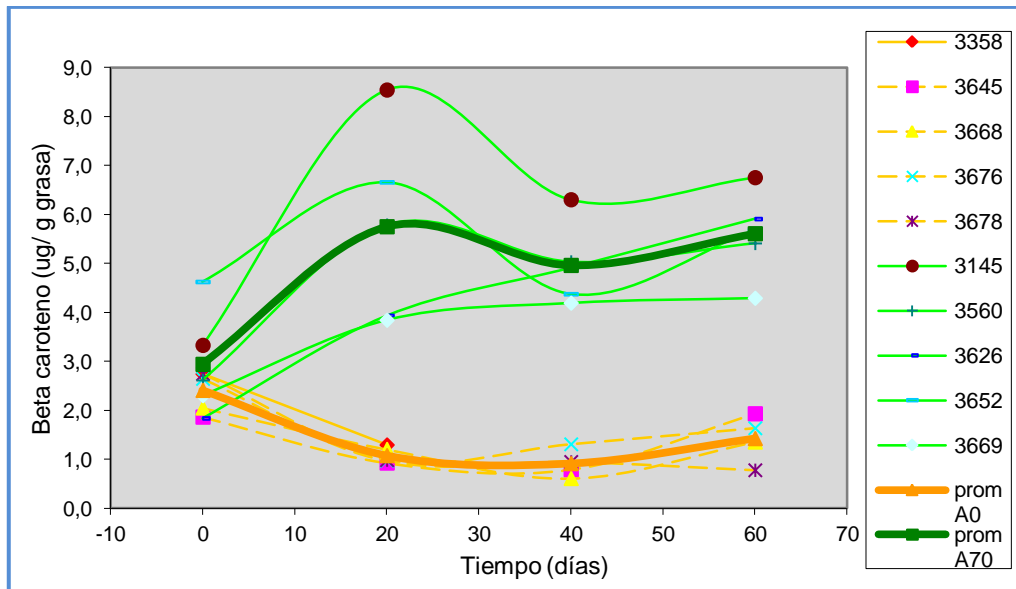
### 3.3.1.2 Beta caroteno.

La incorporación de beta caroteno siguió la misma tendencia que el alfa tocoferol, con una rápida conversión que respondió al cambio de dieta (Figura 3-14).

Los niveles alcanzados en estos ensayos son comparables a los reportados por Calderón et al. (2007b) para vacas lecheras con dietas pastoriles en la región central de Francia (1,33 mg/ml de leche para carotenos totales). Estos autores reportaron una rápida incorporación de beta caroteno a la leche de vacas que fueron sometidas a un cambio de dieta con alto contenido de pastura. Entre 7 y 17 días ya observaron un aumento cuadrático en la concentración de beta caroteno en leche. Asimismo Nozière et al. (2006b), reportaron una rápida pérdida de

carotenoides en leche al pasar de una alimentación pastoril a una alimentación en base de silaje de granos.

De este modo, el presente ensayo muestra la plasticidad de la grasa láctea para ser modificada en sus micronutrientes con actividad antioxidante.



**Figura 3-14 Dinámica de incorporación de beta caroteno a la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación.**

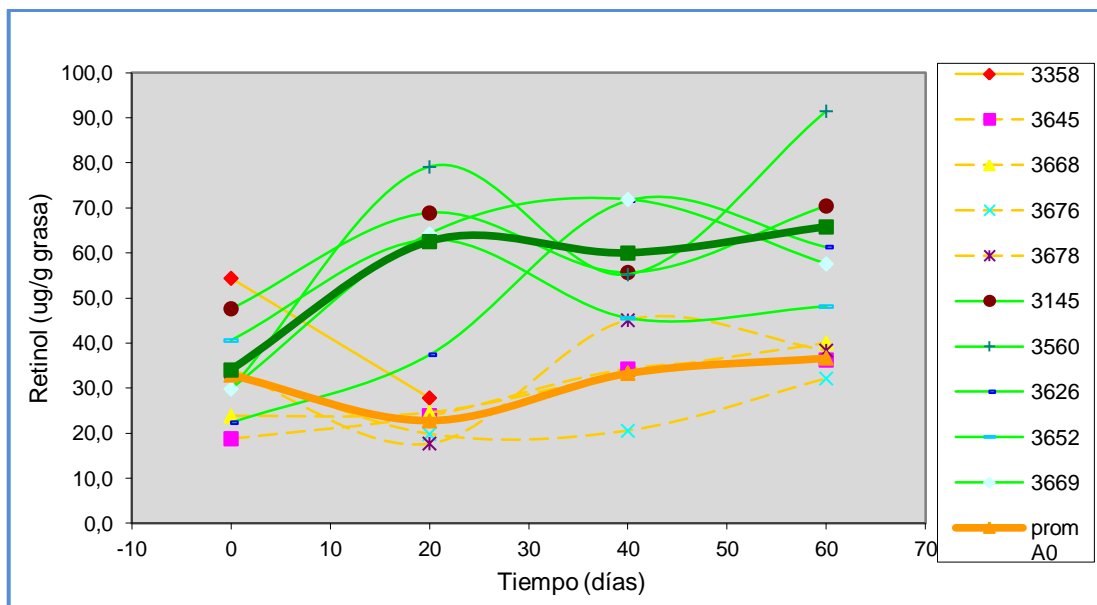
Cabe señalar que los resultados reportados en esta tesis corresponden al isómero all-trans beta-caroteno. Se observó también la presencia de un carotenoide menor, que por las características de su espectro de absorción correspondería al 13-cis beta caroteno, que no fue cuantificado por falta de estándar para confirmar su presencia (Figura 3-13).

### 3.3.1.3 Retinol.

El beta caroteno es el precursor de la vitamina A con mejor tasa de conversión. La forma activa de esta vitamina es el retinol.

Su incorporación en leche cruda siguió el patrón observado para el beta caroteno y se mantuvo en niveles significativamente más elevados en las leches de pastura que en las de silaje ( $p < 0,05$ ).

La Figura 3-15 muestra que los valores de retinol en la leche cruda persistieron a lo largo de todo ensayo.

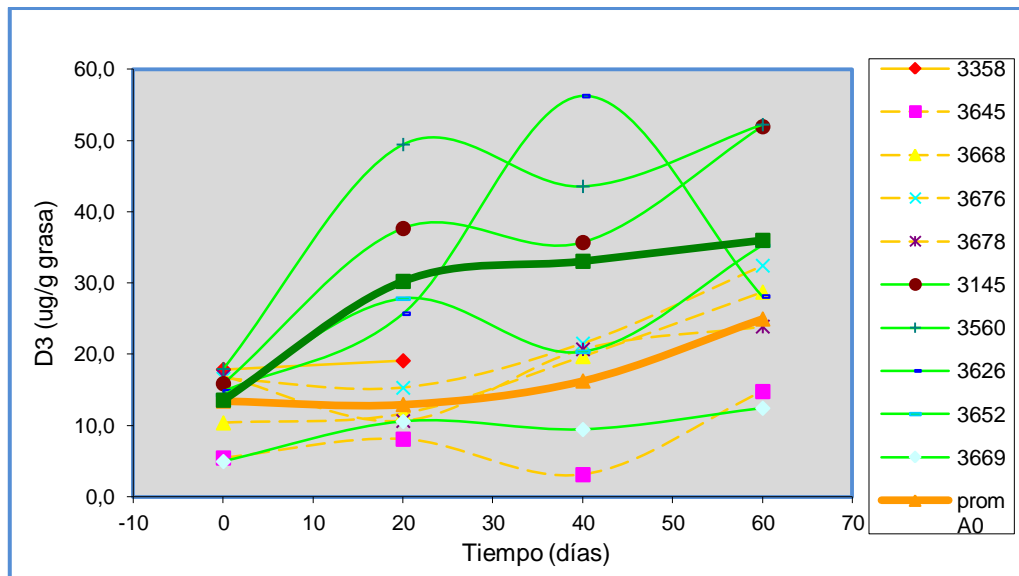


**Figura 3-15 Dinámica de incorporación de retinol a la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación.**

Este resultado es explicado por la eficiencia de transferencia de vitamina A a través de la glándula mamaria, o de la capacidad de las células en la glándula mamaria de convertir eficientemente el beta caroteno a vitamina A (Calderón et al., 2007a).

#### 3.3.1.4 Vitamina D<sub>3</sub>.

La vitamina D<sub>3</sub> o colecalciferol es necesaria para la reproducción y lactancia en bovinos. Participa del metabolismo del calcio y del fósforo y su principal fuente son los forrajes curados a las radiaciones del sol. Por ello se observó un aumento significativo de esta vitamina en la leche de vacas que pastorean, ya que al hacerlo, estos animales estuvieron expuestos al sol (Figura 3-16,  $p < 0,05$ ).

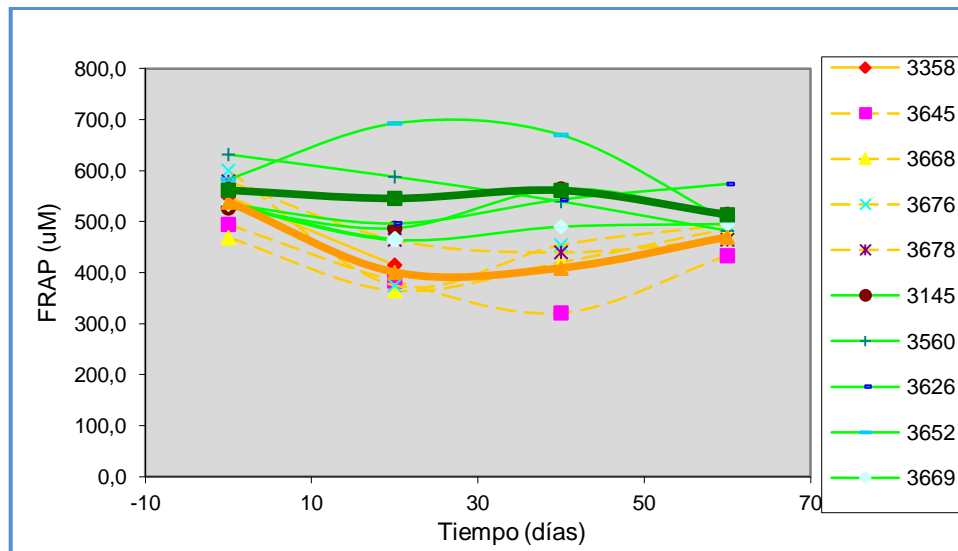


**Figura 3-16 Dinámica de incorporación de vitamina D<sub>3</sub> a la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación.**

### 3.3.1.5 Actividad antioxidante total y ácido ascórbico.

La mayor concentración de antioxidantes en las leches pastoriles correlacionó en forma positiva con la capacidad antioxidante total en las leches medidas por la técnica de FRAP.

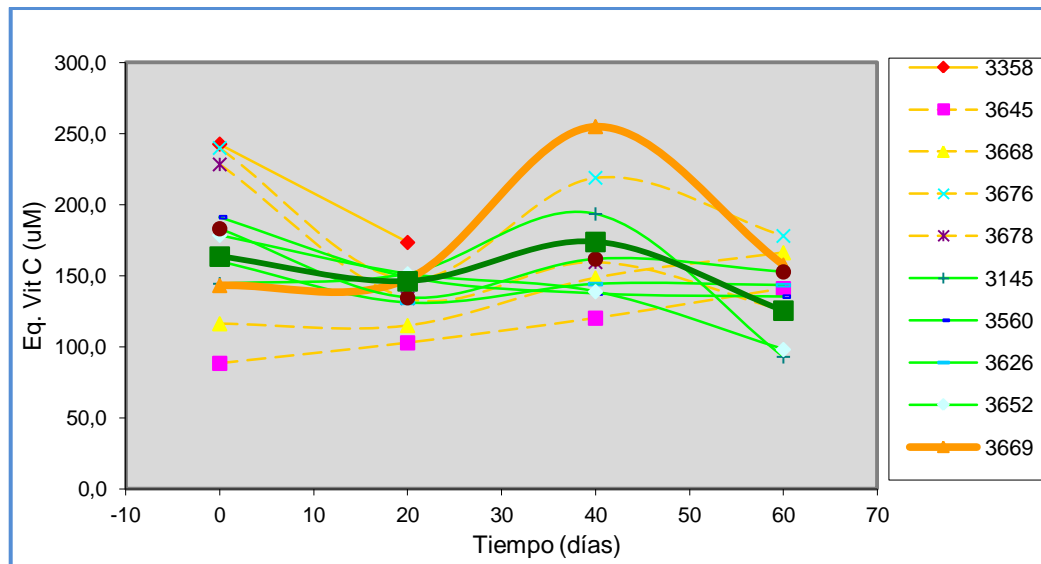
Estas mediciones, como se observa en Figura 3-17, resultaron significativamente mayores en las leches del tratamiento A70 respecto de A0 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3-17 Capacidad antioxidante total medida por la técnica de FRAP de la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación**

Al mismo tiempo se midió la concentración de ácido ascórbico en las muestras, a fin de determinar si la vitamina C podría estar implicada en la mayor actividad antioxidante de estas leches. Los resultados que se obtuvieron se ilustran en la Figura 3-18. El ácido ascórbico, medido por diferencia de potencial reductor tal como se explicó en la sección materiales y métodos, mostró niveles bajos en leche cruda y fueron ligeramente más elevados en las leches del tratamiento A0 (27,7 mg/l) que en las del tratamiento A70 (25,8 mg/l). Los valores obtenidos coinciden con los de referencia en leche cruda sin tratamiento térmico (Haddad and Loewenstein, 1983). Estos autores describieron que la pérdida por pasteurización llega al 20% y por congelamiento hay una pérdida del 8%.

La vitamina C aportó en promedio un 30% de la actividad antioxidante total medida por FRAP. Sin embargo esta vitamina no fue el factor determinante de la diferencia en la actividad antioxidante total entre las leches A70 y A0 y sus valores se mantuvieron relativamente constantes a lo largo del ensayo.



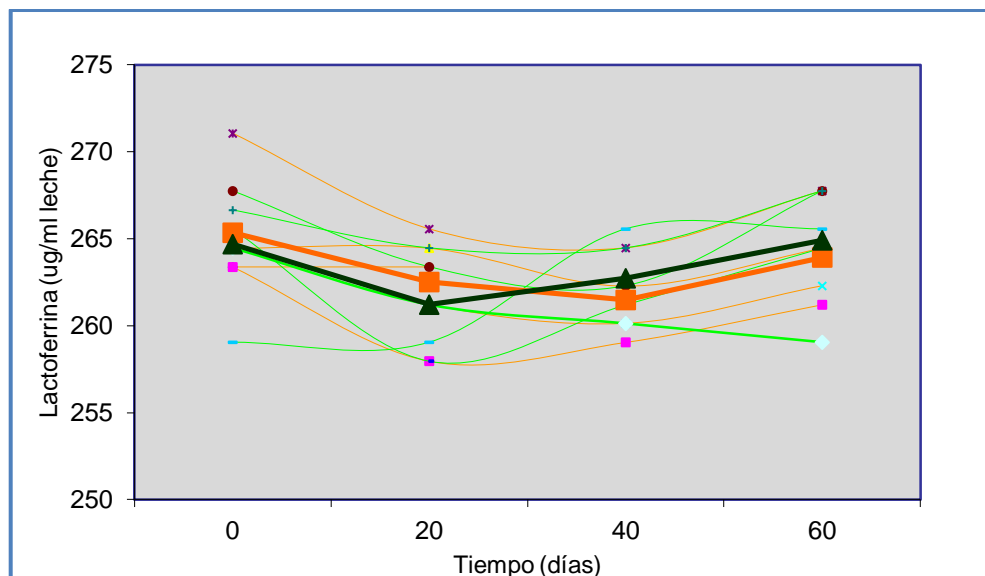
**Figura 3-18 Dinámica de incorporación de vitamina C a la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación**

### 3.3.1.6 Lactoferrina.

La lactoferrina es una de las proteínas antioxidantes más importantes de la leche. Esta proteína podría contribuir a la actividad de la fracción hidrosoluble de la leche. Por ello se realizó su cuantificación por medio de un ensayo de ELISA, como se mencionó en la sección de materiales y métodos.

Los valores han resultado un tanto superiores a los indicados en literatura (Figura 3-19). Esto puede deberse a que en general las tablas corresponden a sistemas productivos diferentes (Fox, 2003)

Por primera vez este trabajo cuantifica lactoferrina en leches en un sistema modelo productivo de Argentina.



**Figura 3-19 Concentración de lactoferrina de la leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación**

La concentración de esta proteína en leche no fue modulada por la dieta de silaje ó pastura, sin embargo ha tenido diferencias asociadas a los tiempos de muestreo, que si bien han sido significativas ( $p < 0,05$ ), muestran valores similares o incluso superiores a los encontrados en la literatura.

La lactoferrina puede ser usada como proteína funcional, de ahí su importancia en leche. Esta proteína tiene diversas actividades. En su sitio activo liga moléculas de hierro. Esto podría asociarse a un mayor potencial reductor y/o antioxidante en las muestras.

Sin embargo, la diferencia en la actividad de FRAP, que se observó en estas leches (Figura 3-17), no puede atribuirse a la lactoferrina, y sería consecuencia de otras moléculas antioxidantes presentes en forma diferencial en la leche (Rossetti et al., 2010).

### 3.3.2 Perfil de ácidos grasos e inducción de oxidación.

La composición de ácidos grasos en los dos tratamientos dietarios se ejemplifica en la Tabla 3-11, extraída de Páez et al. (2007).

Se observan ciertos ácidos grasos a los que el tratamiento no afectó a través del tiempo de aplicación del mismo (C4, C6, CLA, C20:4 en adelante).

Existió interacción entre el tratamiento y el tiempo evaluado en los siguientes ácidos grasos: C10, C12, C14, C14:1, C15, C16, C16:1, C17, C18, C18:1c, C18:1t, C18:2c, C18:2t, C24. Se observó que la leche producida por las vacas del tratamiento A70 tuvo una menor concentración de ácidos grasos insaturados totales (33,80 vs. 36,89) pero a la vez, una mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados con dos o más insaturaciones como los C18:2t, CLA y C18:3 (5,99 v. 5,21).

**Tabla 3-11 Perfil de ácidos grasos de la leche A0 y A70**

	Dieta		Significancia		
	A70	A0	Dieta	Tpo	Interacc
C4	3,21 +/- 0,125	3,52 +/- 0,135	ns	ns	ns
C6	1,80 +/- ,0071	2,02 +/- 0,078	ns	ns	ns
C8	1,02 +/- 0,058	1,14 +/- 0,064	ns	*	ns
C10	2,27 +/- 0,125	2,21 +/- 0,132	ns	ns	*
C10:1	0,26 +/- 0,010	0,26 +/- 0,009	ns	*	ns
C12	2,79 +/- 0,123	2,45 +/- 0,132	ns	*	*
C14	10,79 +/- 0,344	9,30 +/- 0,359	*	*	*
C14:1	1,04 +/- 0,029	0,96 +/- 0,032	ns	*	*
C15	1,26 +/- 0,031	0,94 +/- 0,033	*	*	*
C16	29,63 +/- 0,617	26,26 +/- 0,650	*	ns	*
C16:1	1,71 +/- 0,071	1,73 +/- 0,078	ns	*	*
C17	0,72 +/- 0,012	0,64 +/- 0,013	*	*	ns
C18	8,84 +/- 0,504	12,22 +/- 0,563	*	*	*
C18:1c	21,00 +/- 0,823	25,22 +/- 0,840	*	*	*
C18:1t	3,80 +/- 0,269	3,51 +/- 0,285	ns	*	*
C18:2c	2,63 +/- 0,085	2,98 +/- 0,098	*	*	*
C18:2t	0,40 +/- 0,029	0,15 +/- 0,031	*	*	*
C18:3	1,03 +/- 0,051	0,54 +/- 0,054	*	*	ns
CLA	1,52 +/- 0,096	1,25 +/- 0,107	ns	ns	ns
C20	0,03 +/- 0,016	0,13 +/- 0,017	*	ns	ns
C20:4	0,17 +/- 0,008	0,19 +/- 0,008	ns	ns	ns
C20:5	0,09 +/- 0,016	0,04 +/- 0,016	ns	ns	ns
C22:4	0,06 +/- 0,028	0,02 +/- 0,028	ns	ns	ns
C22:5	0,09 +/- 0,014	0,04 +/- 0,015	ns	ns	ns
C24	0,04 +/- 0,006	0,05 +/- 0,006	ns	ns	*
Insat Tot	33,80	36,89			
PUFA>1	5,99	5,21			
PUFA >2	1,44	0,83			

<sup>1</sup>Resultados promedios +/- desviación estándar de muestras de tres períodos. Los valores presentados fueron modificados por la covariable. (p<0,05), ns: no significativo

Se observa que si bien la leche A70 presentó mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados -sobre todo aquellos con dos o más insaturaciones que podrían dar compuestos intermediarios de peroxidación-, no presentaron



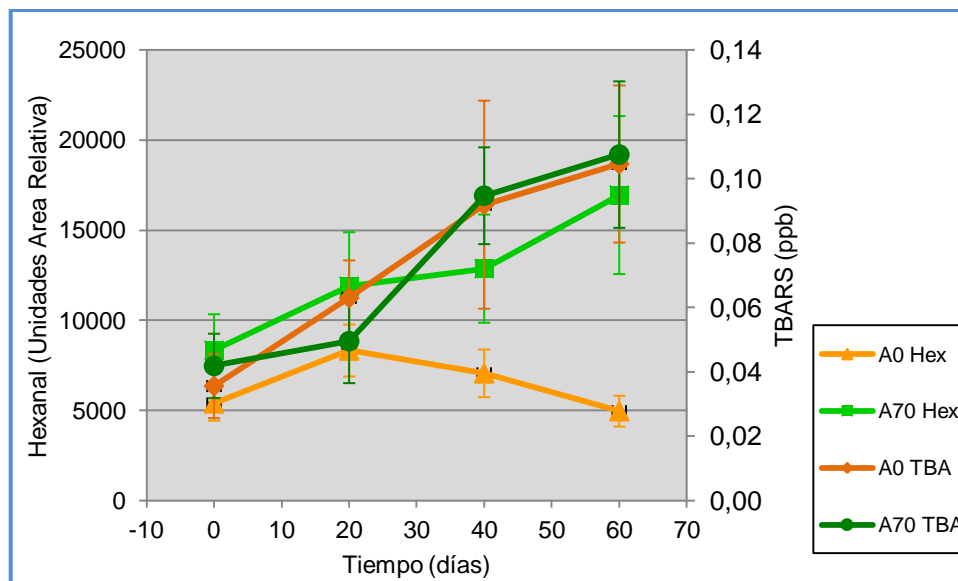
valores de TBARS mayores que las leches del tratamiento A0 (Figura 3-20). Las leches A70 presentan mayores concentraciones de antioxidantes, que podrían actuar inhibiendo la cadena de oxidación, dando como resultado un nivel de TBARS equivalente en las leches A0 y A70, ya que la técnica de TBARS determina malondialdehído que es un compuesto final de oxidación, como se explicó previamente.

La mayor concentración de antioxidantes se traduciría en una mayor capacidad antioxidante total en la leche A70 con respecto a la leche A0.

Otra observación que surge de este ensayo es que la oxidación medida por TBARS fue significativa en el tiempo y aumentó en la leche de ambos tratamientos a medida que transcurrió el ensayo y de la misma manera para los dos tratamientos. El valor inicial de A0 y A70 del tiempo 0 fue distinto de los valores a los 20 días para A0 y A70 y a su vez, éstos fueron distintos que A0 y A70 a los 40 y 60 días. Esta mayor oxidación podría estar asociada a mayor temperatura ambiente, indicando que existirían factores ambientales o interacciones ambiente-metabolismo bovino que podrían afectar de algún modo la oxidación espontánea de la leche cruda.

En el primer ensayo expuesto en este trabajo, también se observó una mayor oxidación en las leches correspondientes al verano, con temperaturas ambiente más elevadas. Bernabucci et al. (2002) describieron que el estrés calórico induce niveles mayores de TBARS en eritrocitos de vacas lecheras en condiciones de producción. Posiblemente este fenómeno se refleja también en la glándula mamaria, induciendo la oxidación lipídica y la producción de aldehídos asociados al aumento de la temperatura corporal de los animales, que podría causar una fragilidad de las membranas celulares al afectar a los ácidos grasos poliinsaturados.

El aumento de TBARS correlacionó bien ( $r=0,88$ ) con el aumento en los valores de hexanal para las muestras de leches provenientes pastura, no así las de A0. Este aldehído volátil es indicador de oxidación de ácidos grasos, especialmente PUFA > 18:2, como se observa en la Figura 3-20.



**Figura 3-20 Concentración de TBARS y Hexanal de leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación**

A partir de los 40 días se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos dietarios para el hexanal, con un marcado aumento en las leches de las dietas A70, como consecuencia de su mayor proporción de ácidos grasos con dos o más insaturaciones.

### 3.3.3 Parámetros de calidad sensorial instrumental.

#### 3.3.3.1 Perfil de olor mediante NE-MS y su relación con compuestos volátiles.

El aroma de las leches de ambas dietas se determinó mediante el uso de una nariz electrónica Alpha MOS, tal como se explicó en la sección de materiales y métodos. A su vez en estas leches se determinó la presencia de compuestos aldehídos volátiles indicadores de oxidación. El hexanal, que fuera presentado y discutido en conjunto con los valores de TBARS resultó ser el que se encontró en mayor proporción.

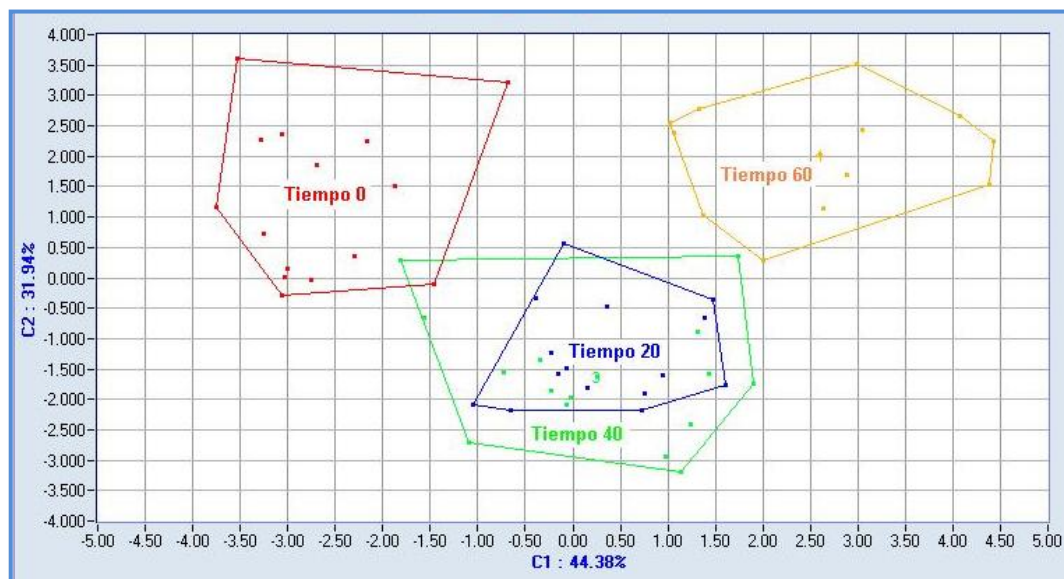
Otros compuestos tuvieron menor expresión, pero la alta variabilidad en los resultados no permitió sacar conclusiones respecto a su comportamiento.

Al analizar la leche obtenida en cuanto al aroma determinado mediante el uso de una nariz electrónica, no se encontraron diferencias claras entre tratamientos. Se observó la agrupación de las muestras por tiempo de

muestreo más que por la dieta de las vacas lecheras. Es de esperar que las leches del tiempo 0 se presenten como un grupo único, ya que constituyó el punto de partida y covariable del ensayo.

Como se observa en la Figura 3-21, las leches del tiempo 0, se separaron de las de los tiempos 20 y 40 y éstas a su vez de las del tiempo 60.

Estos resultados podrían indicar que el olor instrumental de las leches estaría relacionado con la inducción de oxidación en las mismas.

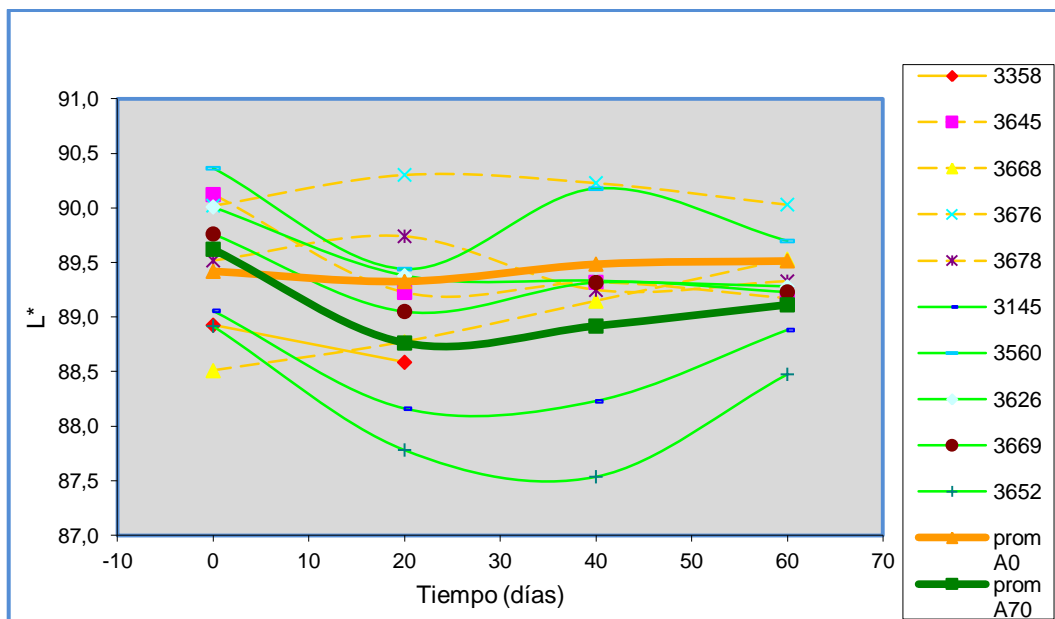


**Figura 3-21 Análisis factorial discriminante del perfil de aroma analizado por NE-MS**

### 3.3.3.2 Color.

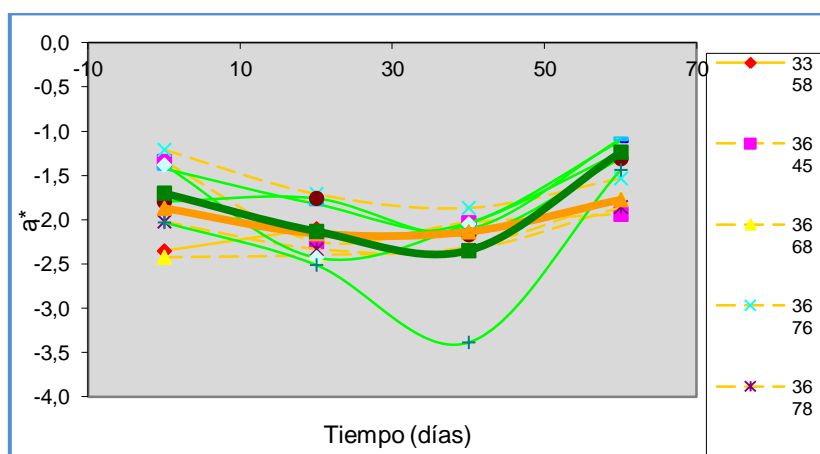
El color de la leche varió de acuerdo a la dieta de las vacas lecheras. Este fenómeno había sido descrito para vacas lecheras de la región central de Francia por Nozière et al. (2006b) planteando el uso de un índice de color para diferenciar leches procedentes de sistemas pastoriles o no pastoriles.

Como se observa en la Figura 3-22, las leches de animales alimentados sin pasturas fueron más claras (valor del parámetro  $L^*$  más elevado) que las leches de la dieta A70. Sin embargo esta componente no presentó diferencias significativas en todo el período de ensayo ( $p < 0,05$ ). Las muestras correspondientes a A70 para tiempo mayores a 20 presentaron menores valores de  $L^*$  (muestras más oscuras).



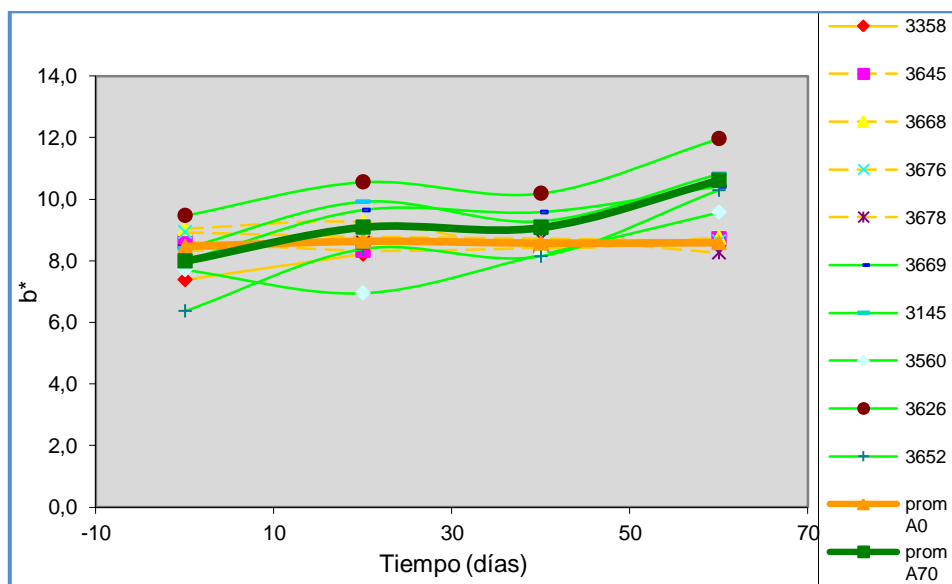
**Figura 3-22 Evolución del parámetro L\* en leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación**

La componente a\* presentó un comportamiento atípico en el tratamiento A70 (Figura 3-23); primeramente se observó un aumento (en valor absoluto) a los 40 días ( $p < 0,05$ ) para luego disminuir a los 60 días de ensayo, adquiriendo valores similares al de los tiempos 0 y 20 días. Por otro lado, los valores de este parámetro no mostraron diferencias para el tratamiento A0 en todo el período. A los 60 días hubieron diferencias significativas entre las muestras correspondientes a A0 y A70 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3-23 Evolución del parámetro a\* en leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación**

Con respecto a la componente de color  $b^*$ , solamente aquellas muestras pertenecientes a la dieta A70 a los 60 días mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto a A0 a los 60 días. Estas muestras presentaron mayores valores de  $b^*$  lo que indica una coloración más amarilla (Figura 3-24). En general, las muestras correspondientes al tratamiento A70 presentaron una mayor variabilidad.



**Figura 3-24 Evolución del parámetro  $b^*$  en leche de vacas alimentadas con dieta pastoril (A70, 70% de alfalfa) o de silaje de sorgo (A0) durante 60 días de alimentación**

Para el caso de los parámetros  $a^*$  y  $b^*$ , tanto la dieta, como el tiempo de muestreo como la interacción entre ambos factores resultaron significativos ( $p < 0.05$ ), indicando un efecto de los mismos sobre el color de las leches.

Las diferencias en la incorporación de  $\beta$ -caroteno dentro del grupo A70, comparado con el A0, fueron evidentes en los días 20, 40 y 60. La misma tendencia se presentó para el parámetro  $b^*$ , mostrando que este método espectrocolorimétrico es sensible a los cambios en el contenido de los carotenoides en la leche.

### 3.3.4 Análisis de datos quimiométricos.

En el caso de los resultados obtenidos en esta parte del ensayo, fue de interés conocer si las leches crudas pueden discriminarse unas de otras de

acuerdo al tratamiento que tuvieron los animales, particularmente las leches procedentes de la alimentación pastoril, a fin de determinar si existe y luego describir el “efecto alfalfa” sobre la calidad de leche y los parámetros a los cuales esta calidad se asociaría.

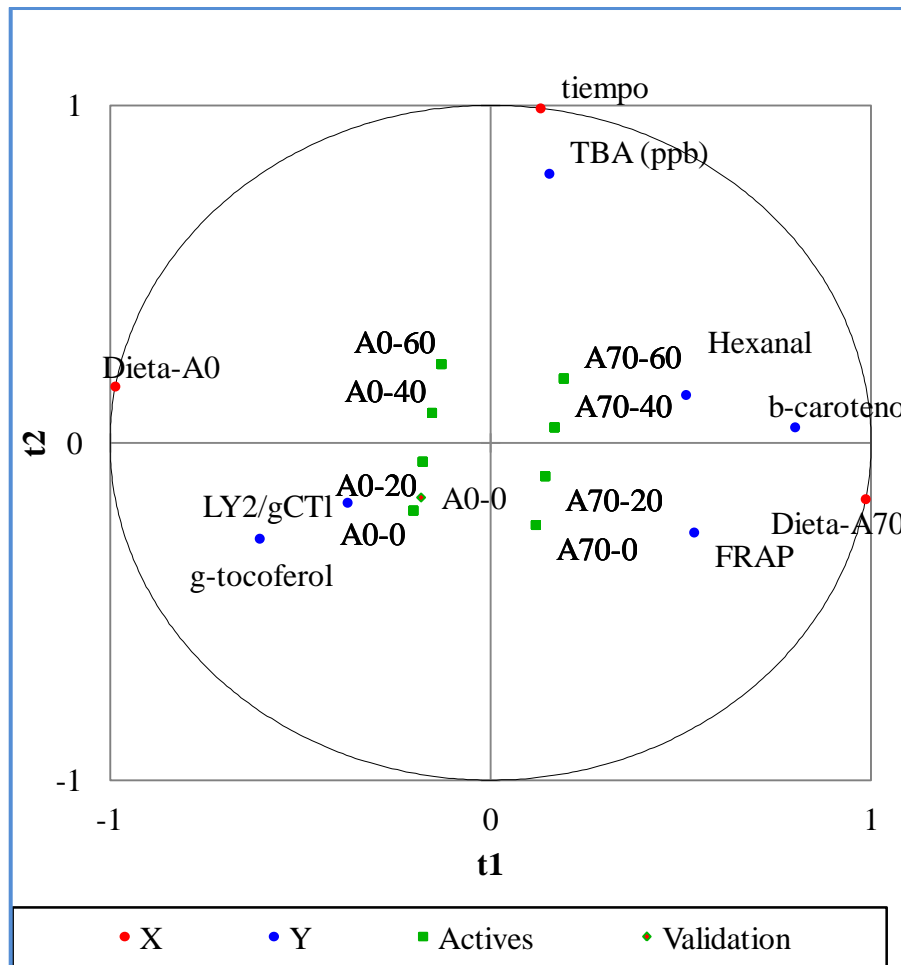
En primer lugar se realizó un análisis de varianza, considerando el tiempo 0 como covariable. Las muestras analizadas por ANOVA en este tiempo inicial no arrojaron diferencias significativas.

Luego se tomaron los parámetros que fueron significativos entre las dietas y en el tiempo. De este modo, se eligieron las variables que podrían discriminar a las muestras en cuestión para pasar de una matriz multidimensional de datos a una representación en dos dimensiones, conteniendo la información original pero de una manera mas accesible.

Así se contó en primer lugar con una matriz de datos de 40 muestras por 47 variables, que por selección de variables estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) luego de un análisis de varianza, pasó a ser una matriz de 40 muestras por 18 variables. Algunas de las variables se relacionaron entre sí, de modo que se seleccionaron aquellas con mayores valores vectoriales en las tres dimensiones, tanto hacia el eje positivo como negativo. Así quedaron las 40 muestras por 6 variables distribuidas en dos dimensiones.

Las variables seleccionadas por este sistema resultaron ser: beta caroteno, gama tocoferol, TBARS, FRAP, hexanal y el sensor LY2/CTI.

De este modo, se pudo obtener la discriminación de las leches de acuerdo a sus valores en estas seis variables que presentan mayor peso de discriminación en los tres componentes de la regresión PLS, como se observa en la Figura 3-25.



**Figura 3-25 Análisis discriminante de todas las variables del ensayo por la metodología de PLS.**

En este caso se observó una separación clara del tipo de alimentación a lo largo de la componente t1, con las muestras pastoriles (A70) con valores positivos en el eje x, asociadas a mayores niveles de FRAP y beta caroteno. Por otro lado las muestras de la dieta de silo de sorgo (A0), se asociaron con valores negativos en el eje x, con mayores valores para el sensor LY2/gCTI y gama tocoferol.

La validación de las muestras dio una correcta clasificación (muestra A-0) para la muestra seleccionada.

Los tiempos de muestreo se separaron a lo largo de la componente t2, coincidiendo con mayores niveles de TBARS y en menor medida hexanal, para las leches de 60 días de muestreo.

Este tipo de análisis permite observar relaciones que no son evidentes cuando se consideran los procedimientos de comparación lineales como el ANOVA.

Además podemos señalar que el análisis de calidad de leche cruda no es trivial, ya que si bien no se consume como tal, existe una variedad de quesos que son producidos con leche cruda y que por lo tanto se debe asegurar la calidad de la misma, obviamente desde el punto de vista microbiológico pero también de sus microcomponentes, ya que los productos elaborados con leche cruda son apreciados por su aroma, flavor, aspecto y textura (Lerch et al., 2015).

### 3.3.5 Expresión de genes asociados a la actividad antioxidante en leche.

La caracterización de las leches crudas mostró una mayor concentración de alfa tocoferol, beta caroteno y retinol en las leches procedentes de vacas alimentadas con una alta proporción de alfalfa en pastoreo y un aumento en el isómero gama tocoferol en las leches procedentes de dietas con alto contenido en grano y oleaginosas.

El mecanismo de absorción de las vitaminas a nivel intestinal es similar para el alfa y gama tocoferol y para el beta caroteno. Algunos autores han demostrado que estas vitaminas sufren muy pocas modificaciones a nivel ruminal, por lo cual su absorción y procesamiento en las vacas lecheras resulta principalmente un fenómeno post-ruminal. Los isómeros de alfa tocoferol son incorporados diferencialmente a través de proteínas transportadoras específicas (Stocker, 2004; Traber and Arai, 1999).

Para analizar este proceso, se realizó un estudio piloto de la expresión de los genes asociados a la actividad antioxidante en la leche con el objeto de probar si a través de la alimentación de las vacas lecheras sería posible modular la expresión de las proteínas involucradas en la unión y transporte de vitaminas liposolubles a la célula, de modo de obtener productos lácteos enriquecidos selectivamente en compuestos nutraceuticos.



Los cebadores utilizados para el ensayo de expresión génica (Tabla 3-12) se diseñaron como se especificó en la sección de materiales y métodos y se probaron sobre ARN extraído de diferentes tejidos bovinos. Las pruebas se realizaron a fin de determinar la expresión diferencial de estas proteínas, ya que hay escasos datos en la literatura, de expresión de genes que puedan modular la actividad de vitamina E y vitamina A en bovinos para leche y la regulación de estas proteínas podría usarse como un mecanismo para enriquecer las leches en vitaminas antioxidantes.

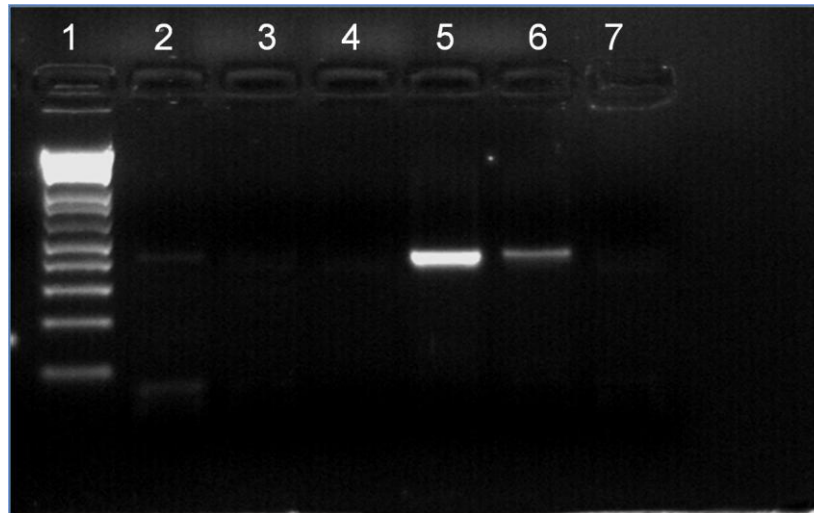
**Tabla 3-12 Cebadores usados para ensayo de expresión génica**

Abreviatura de cebador	Nombre de la proteína
$\alpha$ TAP	Proteína asociada a alfa tocoferol ( $\alpha$ -tocopherol associated protein)
$\alpha$ TTP	Proteína transportadora de alfa tocoferol ( $\alpha$ -tocopherol transport protein)
$\beta$ LG	Beta-Lactoglobulina
CRABP1	Proteína celular de unión de ácido retinoico 1 (Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1)
CRABP2	Proteína celular de unión de ácido retinoico 2 (Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2)
CRBP	Proteína celular de unión de retinol (Cellular Retinol Binding Protein 1)
RBP4	Proteína de binding de retinol 4 (Retinol Binding Protein 4)
RAR	Elemento de respuesta al ácido retinoico (Retinoic Acid Response Element)
AoxP	Proteína antioxidante (peroxidasa dependiente de glutatión)

En este trabajo se muestran solamente los resultados de los genes expresados diferencialmente en glándula mamaria y células somáticas de leche, aunque además se probó la expresión de los mismos en hígado, glándula mamaria, células sanguíneas, tejido graso y músculo.

Los genes  $\alpha$ TAP y  $\alpha$ TTP en leche y células somáticas no difirieron de otros tejidos en las condiciones del ensayo.

En cuanto a la incorporación de vitamina A, se estudió la expresión del gen de beta lactoglobulina, que transporta retinol a través de la unión en su dominio lipocalina (Sawyer and Kontopidis, 2000). En la figura Figura 3-26 se ilustra dicha expresión, que como era de esperar fue mayoritaria en glándula mamaria y células somáticas de leche.

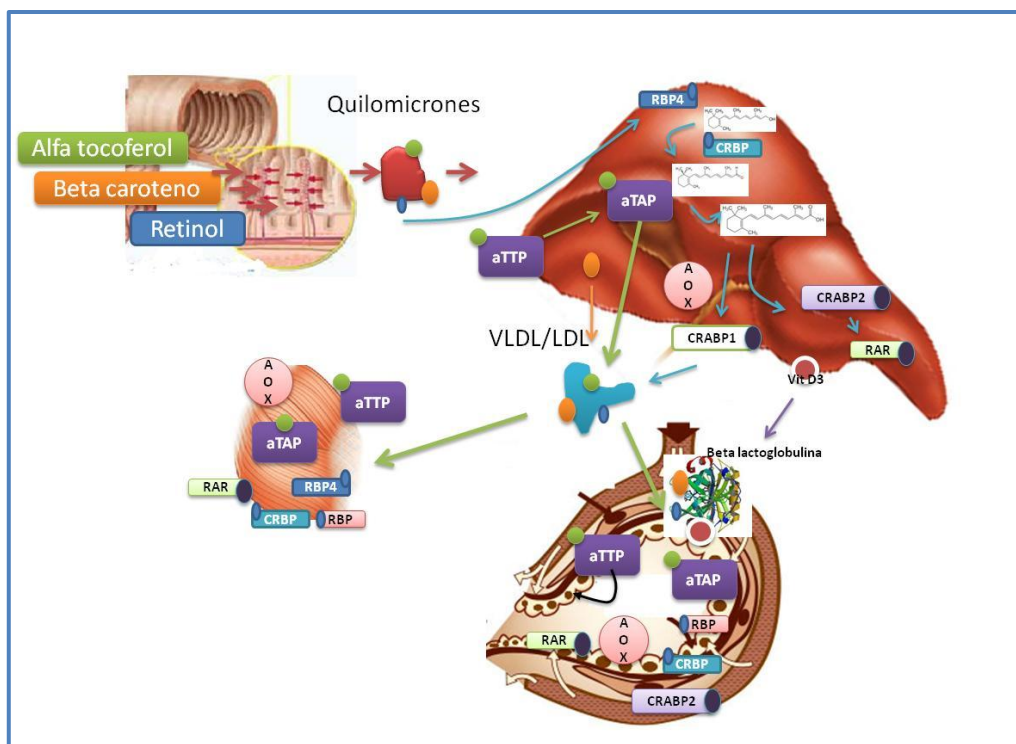


**Figura 3-26 Beta Lactoglobulina** (396 bp) 5  $\mu$ l 1 kb marcador PM (línea 1) y 19  $\mu$ l de producto de PCR de Tejido graso (línea 2), Hígado (línea 3), Músculo (línea 4), Gl. mamaria (línea 5), Leche (células somáticas) (línea 6), T Sanguíneo (línea 7).

Los genes CRBP1, CRBP2 y CRBP se expresan levemente o no lo hacen en glándula mamaria y células de la leche, en las condiciones de los ensayos. La proteína de unión a retinol RBP4 se expresó en todos los tejidos, al igual que RAR, indicando la importancia de la acción de esta vitamina a nivel de la expresión de genes.

Las vitaminas A y E son absorbidas por los enterocitos a nivel del intestino. Son incorporadas al organismo mediante quilomicrones (Harrison and Hussain, 2001; Ishibashi et al., 1996) y así se transportan hasta el hígado, tejido graso, músculo, glándula mamaria, células somáticas y tejido sanguíneo. La modulación de esta proteína podría ser importante para plantear el enriquecimiento natural de la leche en vitamina E. En cuanto a la vitamina A, la glándula mamaria expresa altos niveles de betalactoglobulina, como era de esperar, ya que es un componente de la leche. Esta proteína está involucrada en el transporte de vitaminas A y D y no se encontraron evidencias de una posible unión a beta caroteno o alfa tocoferol.

Los ensayos de expresión de genes asociados a las vitaminas A y E del presente trabajo, concuerdan con los modelos presentados (Kono and Arai, 2015) que pueden resumirse en el siguiente esquema (Figura 3-27).



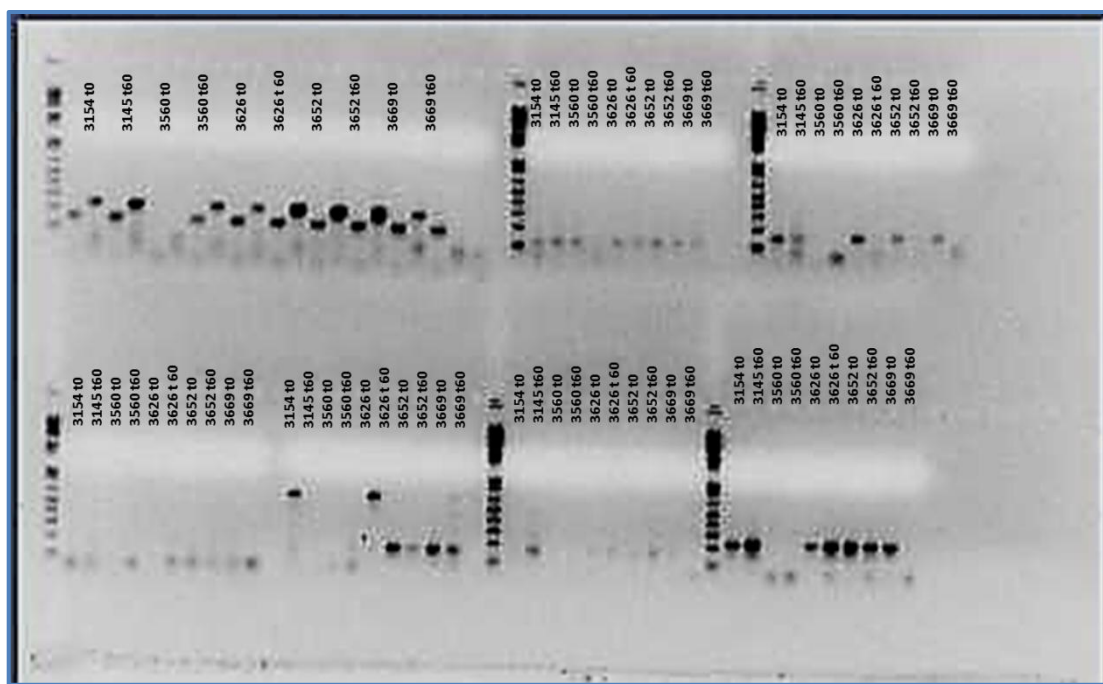
**Figura 3-27 Esquema de incorporación de vitaminas antioxidantes en el organismo**

Estos ensayos en conjunto mostraron una evidente expresión de los genes responsables de la síntesis de las proteínas involucradas en el transporte de vitaminas A y E. Sería importante determinar si esta expresión puede ser modulada por la dieta, para plantear el enriquecimiento de la leche con los isómeros naturales de estas vitaminas antioxidantes.

Posteriormente se estudió la expresión de estos genes en células somáticas de los animales del ensayo exploratorio. Para ello se eligieron los leches del tiempo 0 y tiempo 60 de los mismos animales pertenecientes al grupo A70.

En el tiempo 0 estos animales se consideraron privados de pastura, ya que es el comienzo del ensayo. A los 60 días es el muestreo correspondiente al máximo tiempo de pastoreo.

En la Figura 3-28 se observa la expresión de células somáticas de leche de los tratamientos A0 y A70 del ensayo exploratorio.



**Figura 3-28 Expresión de células somáticas.**

Arriba: Alternados Aox Prot (157 pb) y RAR (223 pb); αTAP (119 pb); αTTP (151 pb)

Abajo: CRBP (152 pb); CRABP2 (152 pb); CRABP1 (173 pb); RBP4 (247 pb)

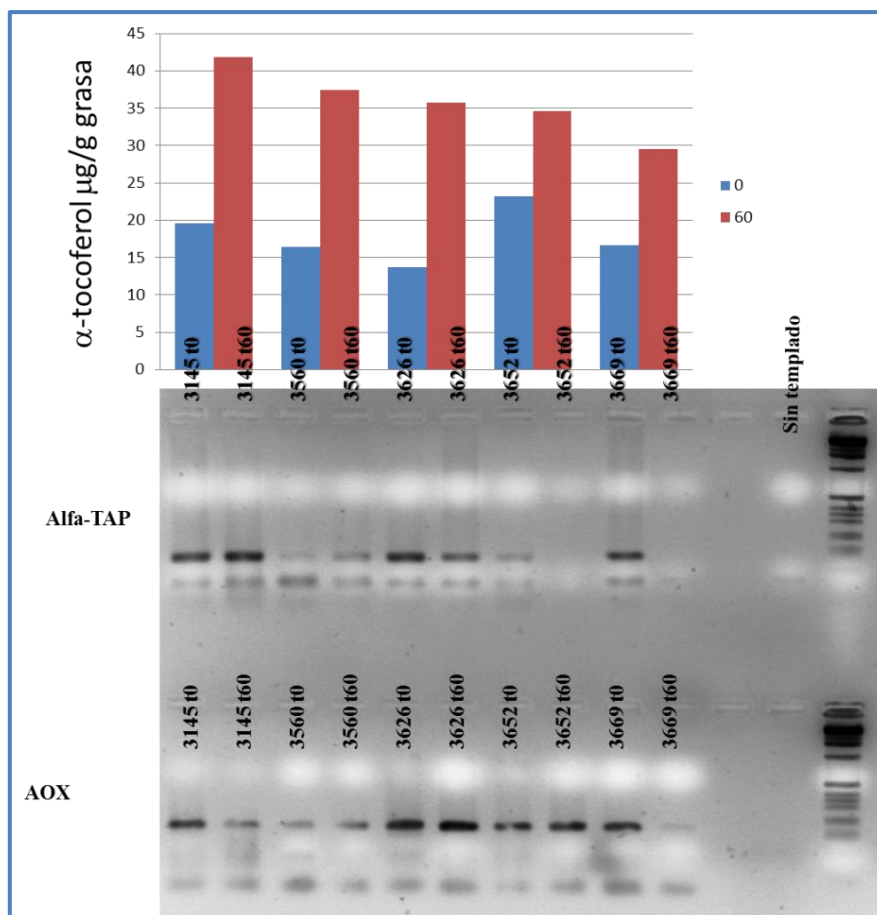
Si bien la calidad de la figura no resultó adecuada, se pudo observar la expresión cualitativa de los genes estudiados. En la Tabla 3-13 se ilustran los resultados de la interpretación de la misma en forma de cuadro.

**Tabla 3-13 Interpretación de expresión de genes de células somáticas de leche**

m-RNA	0 días A70 (n=5)	60 días A70 (n=5)
αTAP: Proteína asociada a tocoferol (vit E)	+++	+/-
αTTP: Proteína transportadora de tocoferol (vit E)	+++	+/-
CRABP1: proteína celular de binding de ácido retinóico 1	-	+
CRABP2: proteína celular de binding de ácido retinóico 2	+	+
CRBP: proteína celular de binding de retinol (vit A)	-	-
RBP4: proteína de binding de retinol (vit A)	+++	+++
RAR: factor de respuesta al ácido retinóico	+++	+++
AoxP: Proteína antioxidante (peroxidasa dependiente de glutatión)	+++	+++

Interpretación cualitativa de la expresión de los genes de células somáticas de leches muestreadas a tiempo 0 (sin pastoreo) o luego de 60 días en pastura de alfalfa al 70%.

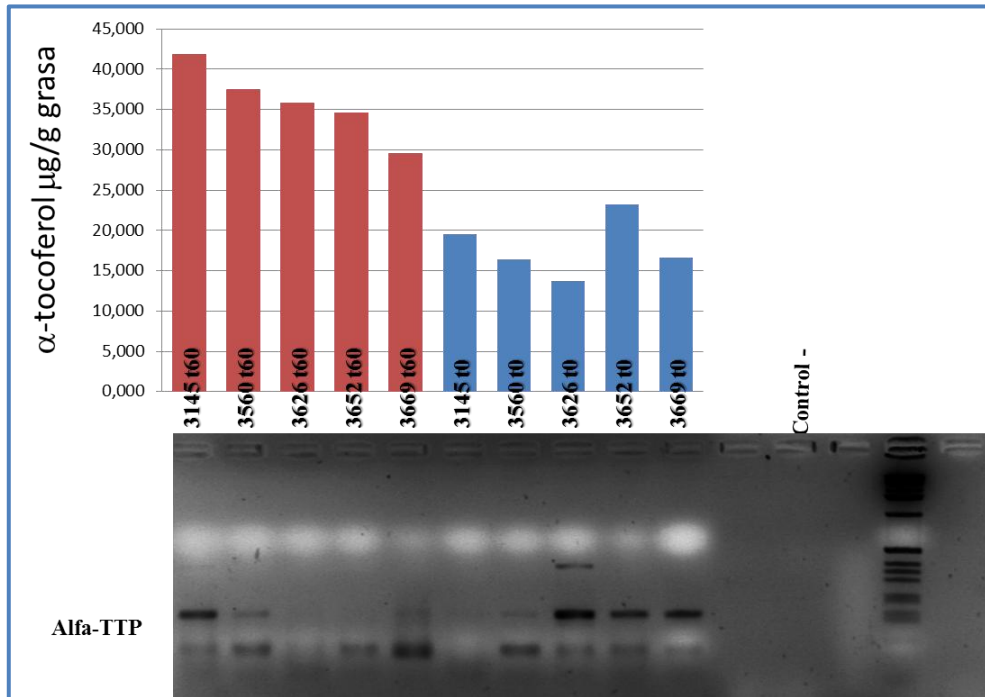
El ensayo se repitió para los genes  $\alpha$ TAP,  $\alpha$ TTP (cuya expresión fue diferente entre los tiempos 0 y 60) y AoxP (que se expresó en todas las muestras). La expresión de estos genes se relacionó con las concentraciones de alfa tocoferol en las leches, como se ve en las Figura 3-29 y Figura 3-30.



**Figura 3-29 Expresión de gen  $\alpha$ TAP y AoxP en relación a la concentración de alfa tocoferol**

Como se observa en la Figura 3-29, en las vacas 3145 y 3560 aparentemente no hubo efecto de la dieta mientras que en las vacas 3626, 3652 y 3669,  $\alpha$ TAP se expresó en tiempo 0 pero no en tiempo 60 en las condiciones del ensayo. Se obtuvo un resultado similar para la expresión del gen  $\alpha$ TTP (Figura 3-30). Esto podría indicar que la expresión de estas proteínas de transporte del alfa tocoferol en glándula mamaria (modelo células somáticas), podría inhibirse por un proceso de retroalimentación negativa en presencia de alfa tocoferol en exceso. Esto sería lo que sucede

en el pastoreo durante 60 días que mediante el control de su regulación podría utilizarse para aumentar la concentración de vitamina E en leche.



**Figura 3-30** Expresión de gen  $\alpha$ TTP en relación a la concentración de alfa tocoferol

### 3.3.6 Conclusiones del ensayo.

Se demostró que proveyendo pastura natural al ganado durante 20 días, se logró incrementar los niveles de compuestos bioactivos en la leche y que estos niveles perduraron durante el todo del ensayo.

Así, se obtuvo leche con características diferenciales, mayores niveles de vitaminas antioxidantes y precursores y con una capacidad antioxidante mejorada, por lo tanto menos susceptible a la oxidación, al maximizar la oferta de pasturas naturales.

Existen genes que se expresan diferencialmente en glándula mamaria y células de leche de acuerdo a las dietas contrastantes recibidas. Si bien estos resultados son preliminares y deben confirmarse por expresión cuantitativa, son los primeros resultados obtenidos en glándula mamaria y células somáticas respecto a la expresión de genes relacionados con actividad antioxidante en la leche.

### **3.4 Relación entre compuestos bioactivos de origen vegetal y calidad de la leche cruda y productos lácteos. Efecto de la dieta y la estación.**

En el ensayo de punto anterior (exploratorio), se demostró que los antioxidantes se incorporaron a la leche cruda durante los primeros 20 días de alimentación con 70% de pastura de alfalfa, que los compuestos incorporados persistieron con la continuidad de la dieta y que éstos favorecieron la capacidad antioxidante en la leche cruda.

Sin embargo, las condiciones productivas en la mayoría de las cuencas lecheras de nuestro país no siempre tienen disponibilidad de pasturas para lograr el 70 % de la dieta base. Por ello se procedió a evaluar el efecto del reemplazo del silaje de maíz con cantidades crecientes de alfalfa en la dieta incorporando una oferta intermedia consistente en 35% de pastura.

Teniendo en cuenta la estacionalidad observada para la incorporación de antioxidantes y ácidos grasos insaturados durante el mapeo de los tambos en el ensayo del punto 3.1, se decidió realizar el estudio de incorporación de compuestos bioactivos en las épocas de primavera y otoño, ya que tanto el estado fenológico de la alfalfa como el estado fisiológico de las vacas lecheras, podrían influir en la composición de la leche según la época del año.

#### **3.4.1 Calidad de la dieta.**

En primer lugar se evaluó el aporte de la dieta respecto de los compuestos bioactivos utilizando las tablas que se desarrollaron en el punto 3.2 (pág. 68).

Como se observa en la Tabla 3-14, las dietas resultaron isoenergéticas e isoprotéicas, con una ligera tendencia a la disminución de proteínas en las dietas con alfalfa de primavera.

**Tabla 3-14 Composición de dietas por tipo de alimento.**

Ingredientes (kg MS/v/d)	A0		A35		A70	
	Primavera	Otoño	Primavera	Otoño	Primavera	Otoño
Alfalfa	0	0	6,8	7,09	11,6	13,6
Balanceado	3,3	3,3	4,4	4,4	4,4	4,4
Silo maíz	5,15	5,25	2,91	3,04	1,65	1,64
Expeler girasol	4,74	4,83	2,72	2,84	0	0
Afrechillo trigo	4,12	4,2	3,11	3,24	0	0
Heno alfalfa	4,54	4,54	0,8	0,8	0,8	0,8
Total (kg MS/v/d)	21,8	22,1	20,7	21,4	18,4	20,7
PB dieta (%)	18	18,5	19	20,8	18	22,1
EM (Mcal/kg)	2,55	2,59	2,69	2,67	2,64	2,58

La dieta A0 representó el tipo de alimentación que se utiliza corrientemente en sistemas intensivos estabulados o semiestabulados, cuyos principales ingredientes son forrajes conservados (silaje de maíz y heno de gramínea) y concentrados energético-proteicos, mientras que en la dieta A70 se maximizó la participación de la alfalfa dentro de una alimentación balanceada en términos nutricionales. Por último, la dieta A35 representó un nivel intermedio entre los tratamientos extremos y coincidió aproximadamente con el promedio de mínima inclusión anual de alfalfa en los sistemas productivos lecheros argentinos (Taverna, 2005).

De acuerdo a la composición y al perfil de antioxidantes en los diferentes componentes de las dietas, se calcularon las concentraciones de beta caroteno y tocoferoles, ofrecidas a los animales según cada esquema de alimentación y la estación del año (Tabla 3-15). El aporte de estos compuestos se relacionó con su concentración en la leche cruda y productos derivados.

**Tabla 3-15 Cálculo del aporte en vitaminas antioxidantes liposolubles de las diferentes dietas según la estación del año**

Alimentos	A0			A35			A70		
	Gama-tocoferol	Alfa-tocoferol	Beta-caroteno	Gama-tocoferol	Alfa-tocoferol	Beta-caroteno	Gama-tocoferol	Alfa-tocoferol	Beta-caroteno
Alfalfa fresca	0,00	0,00	0,00	112,82	551,37	1064,97	192,46	940,58	1816,71
Balanceado	275,26	79,83	n/d	367,02	106,43	n/d	367,02	106,43	n/d
Silo maíz	103,57	91,16	68,20	58,52	51,51	38,54	33,18	29,21	21,85
Exp, girasol	17,51	73,77	n/d	10,05	42,33	n/d	0,00	0,00	n/d
Afrechillo trigo	211,31	103,24	n/d	159,51	77,93	n/d	0,00	0,00	n/d
Heno alfalfa	12,68	46,76	2,63	2,23	8,24	0,46	2,23	8,24	0,46
<b>Total (mg/vaca/día)</b>	<b>620,34</b>	<b>394,76</b>	<b>70,83</b>	<b>710,15</b>	<b>837,82</b>	<b>1103,97</b>	<b>594,90</b>	<b>1084,46</b>	<b>1839,03</b>



	A0			A35			A70		
Alimentos Otoño	Gama- tocoferol	Alfa- tocoferol	Beta- caroteno	Gama- tocoferol	Alfa- tocoferol	Beta- caroteno	Gama- tocoferol	Alfa- tocoferol	Beta- caroteno
Alfalfa fresca	0,00	0,00	0,00	45,29	558,69	867,17	86,87	1071,68	1663,40
Balanceado	150,82	30,20	n/d	201,10	40,27	n/d	201,10	40,27	n/d
Silo maíz	105,58	92,93	69,53	61,14	53,81	40,26	32,98	29,03	21,72
Exp, girasol	16,15	124,98	n/d	9,49	73,49	n/d	0,00	0,00	n/d
Afrechillo trigo	194,59	126,03	n/d	150,11	97,22	n/d	0,00	0,00	n/d
Heno alfalfa	18,70	249,71	59,70	3,30	44,00	10,52	3,30	44,00	10,52
<b>Total (mg/vaca/día)</b>	<b>485,84</b>	<b>623,85</b>	<b>129,23</b>	<b>470,42</b>	<b>867,49</b>	<b>917,95</b>	<b>324,24</b>	<b>1184,98</b>	<b>1695,63</b>

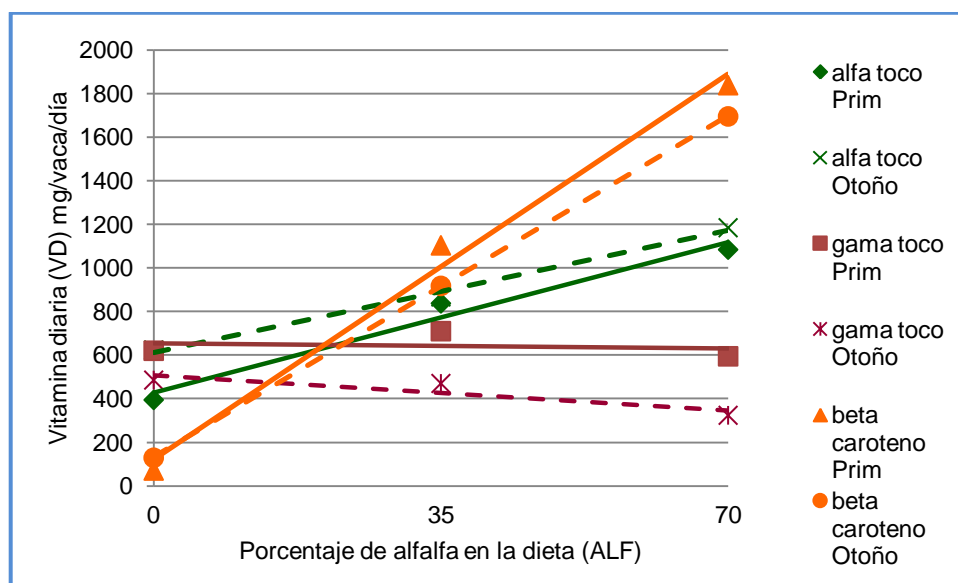
Tal como se puede apreciar, el aporte de la dieta total para el alfa tocoferol y beta caroteno, en ambas estaciones, fue similar para las dietas pastoriles. Por otro lado el gama tocoferol fue aportado principalmente por al afrechillo de trigo y el alimento balanceado, afectando el contenido en las dietas debido a su fluctuación estacional.

Otro ingrediente que presentó fluctuación en los tres compuestos analizados fue el heno de alfalfa. Esto pudo deberse a la diferencia de temperatura de secado del heno en primavera y otoño, ya que las vitaminas y precursores pueden descomponerse en mayor medida en el período de calor.

La composición de las pasturas, depende de su estado fenológico. A medida que la plantas maduran se observan variaciones en las propiedades químicas y nutricionales de las mismas. A grandes rasgos, aumentan los carbohidratos estructurales (aumento de pared celular y fibra) mientras disminuye la proteína cruda. Esto causa una reducción en la digestibilidad y disminución de la energía metabolizable (Bovolenta et al. (2008); Mountousis et al. (2011). En cuanto a la calidad de pasturas, en los años del ensayo y accediendo al registro de temperaturas y precipitaciones mensual de la zona (<http://www.smn.gov.ar/serviciosclimaticos/?mod=agro&id=6>), se observó que el año durante el cual se desarrolló el ensayo de primavera (año 2007) fue caracterizado por inundaciones en los meses de marzo y abril, con la consecuente problemática para la siembra de alfalfa para la época de primavera, seguido de sequías, bajas temperaturas y heladas tardías en los meses de agosto y septiembre. Por estas razones, la oferta de alfalfa fue

escasa y la calidad de la misma se vio afectada. Estos factores climáticos, observados también por otros autores (Adler et al., 2013b; Butler et al., 2008) modifican sustancialmente la disponibilidad de tocoferoles, carotenoides y otros metabolitos secundarios de las plantas que se sintetizan de acuerdo a factores de interacción entre genotipo y ambiente.

La Figura 3-31 resume el aporte diario de alfa tocoferol, gama tocoferol y beta caroteno, según el porcentaje de pastura (0, 35 y 70%) y la estación de año.



**Figura 3-31 Relación de alfa y gama tocoferol y beta caroteno según el porcentaje de pastura en la dieta para cada estación**

Se observó un aumento proporcional de alfa tocoferol y beta caroteno de acuerdo al porcentaje de alfalfa en la dieta. El isómero gama tocoferol no se relacionó con el incremento de pastura en la dieta. Esto indica que las principales fuentes de este isómero lo constituyen las oleaginosas presentes en los suplementos.

#### 3.4.2 Calidad de leche cruda.

En primer lugar se analizaron los parámetros lactológicos de las leches obtenidas con cada dieta y en cada estación. Para ello se tomaron cuatro pools individuales de cada tratamiento (8 vacas por tratamiento). Los datos de la Tabla 3-16 muestran que se observó una menor producción diaria en el

período de primavera respecto del otoño. También hubo una disminución atribuible al aumento de alfalfa en la dieta ( $P < 0,05$ ). En la literatura este fenómeno de disminución en la producción lechera diaria, está asociado con el tipo de alimentación orgánica y particularmente con pasturas (Adler et al., 2013b).

El porcentaje de grasa varió según la estación pero no por el contenido de alfalfa en la dieta observándose menores valores en primavera. Tal como en el caso de la producción, al aumentar la alimentación pastoril y disminuir el porcentaje de silaje en la dieta el rendimiento lechero resultó un poco menor.

Respecto al porcentaje de proteína en la leche, el rendimiento en otoño fue mayor que en primavera y se observó una diferencia significativa entre los tratamientos, siendo menores los porcentajes en las dietas con alimentación con alfalfa. Estos resultados son similares a los reportados previamente que muestran valores menores de grasa y proteína en la época estival (Poulsen et al., 2015).

De manera global, la leche mostró valores de calidad similar, encontrándose diferencias estacionales también para las variables lactosa y sólidos totales. Para los sólidos no grasos, se encontraron diferencias significativas a causa de la dieta ( $p < 0,01$ ).

**Tabla 3-16 Composición química y producción de la leche obtenida**

	Primavera	Otoño	A0	A35	A70	E	Tratamiento	TxE
Leche(kg/v/d 4% GB)	22,1	24,8	24,3	24,2	21,8	*	*	ns <sup>#</sup>
Grasa (%)	3,38	3,71	3,47	3,69	3,53	*	ns	ns
Proteína (%)	3,12	3,25	3,28	3,16	3,13	*	*	ns
Lactosa (%)	4,90	4,99	5,01	4,92	4,91	*	ns	ns
SNG (%)	8,70	8,91	8,95	8,76	8,71	*	*	ns
ST (%)	12,07	12,68	12,45	12,44	11,44	*	ns	ns
Urea (%)	0,046	0,042	0,046	0,044	0,042	ns	ns	*

ns<sup>#</sup>: no significativo. \* ( $p < 0,01$ )

Una vez determinada la calidad de los parámetros lactológicos, el interés del trabajo fue determinar los compuestos bioactivos y parámetros de

calidad bioquímica y sensorial en la leche cruda que pudieran asociarse a la alimentación de las vacas lecheras y así constituir un factor de diferenciación de las mismas para la obtención de materias primas de calidad diferenciada.

### 3.4.3 Micronutrientes y balance oxidativo en leche cruda.

En general se observaron diferencias en los micronutrientes asociadas a la alimentación pastoril y a la estación de año (Tabla 3-17).

**Tabla 3-17 Medias y nivel de significancia obtenidos en primavera y otoño para las variables analizadas mediante ANOVA en leche cruda**

Variable	PRIMAVERA (Leche Cruda)							
	P0		P35		P70	T	CME <sup>1</sup>	
Alfa tocoferol (µg/ml leche)	0,3478	b	0,7458	a	0,8691	a	****	0,00801
Gama tocoferol (µg/ml leche)	0,0579		0,0405		0,0606		ns	0,00018
Beta caroteno (µg/ml leche)	0,0226	b	0,1861	a	0,2168	a	****	0,00085
Retinol (µg/ml leche)	0,5541	b	1,4688	a	1,5675	a	***	0,09762
Vitamina D3 (µg/ml leche)	0,1123		0,1162		0,1132		ns	0,00058
Riboflavina (µg/ml leche)	1,7242		1,4465		1,5152		ns	0,055
FRAP (eq µM Fe2+)	308,36	b	391,40	b	542,35	a	***	5232,3
TBA (ppb)	214,75		198,37		206,95		ns	465,73

Variable	OTOÑO (Leche Cruda)							
	O0		O35		O70	T	CME <sup>1</sup>	
Alfa tocoferol (µg/ml leche)	1,0639		1,0644		1,1309		ns	52,4197
Gama tocoferol (µg/ml leche)	0,0681	a	0,0235	b	0,0157	b	****	0,00015
Beta caroteno (µg/ml leche)	0,1026	b	0,2486	a	0,2743	a	****	0,00185
Retinol (µg/ml leche)	0,2662	b	0,4169	a	0,462	a	****	0,00205
Vitamina D3 (µg/ml leche)	0,0124	b	0,0164	ab	0,0249	a	**	0,00003
Riboflavina (µg/ml leche)	1,5293	b	1,5547	b	1,7993	a	***	0,00989
FRAP (eq µM Fe2+)	374,7		374,59		355,14		ns	754,71
TBA (ppb)	41,65		29,67		44,00		ns	98,03

p<0,0001 (\*\*\*\*), p<0,001 (\*\*\*), P<0,01 (\*\*) y p<0,05 (\*)

<sup>1</sup>CME: cuadrado medio del error

#### 3.4.3.1 Vitamina E.

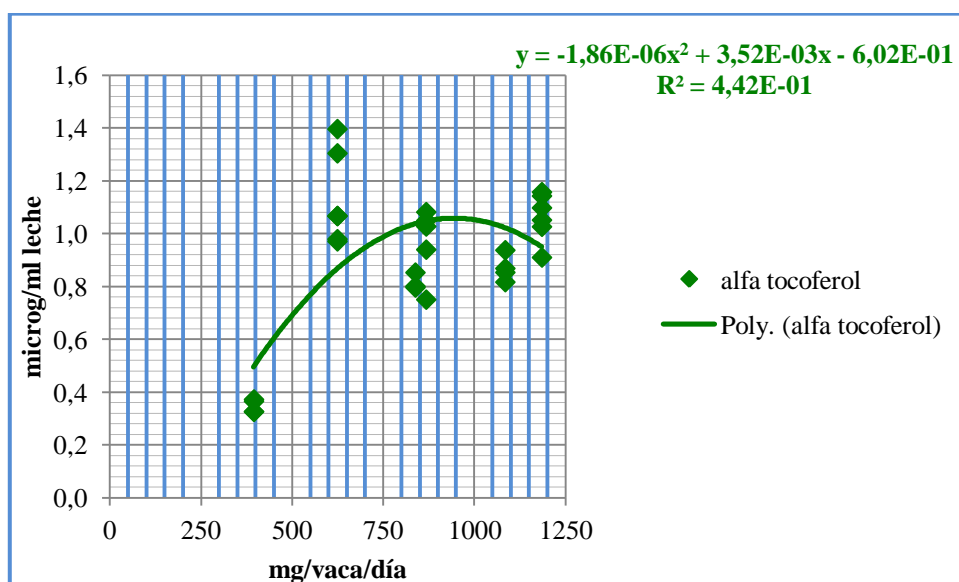
Los niveles de alfa tocoferol alcanzados en las leches de primavera del presente ensayo fueron similares a los del ensayo exploratorio, el cual fue realizado aproximadamente en el mismo período y un poco más altos que los encontrados por La Terra et al. (2010) para vacas de raza Fresian en Italia.

Como se observa en la Tabla 3-17, se obtuvo una diferencia entre las estaciones. En primavera el efecto de la dieta fue más evidente y las leches A0 fueron significativamente más bajas que las de los tratamientos A35 y A70 ( $p < 0,0001$ ).

Aún con diferencias entre las estaciones, la tendencia observada fue la obtención de mayores niveles de alfa tocoferol en leche a medida que aumentó el aporte de esta molécula en la dieta.

Los valores reportados en este ensayo para tocoferoles fueron similares a los reportados por (Adler et al., 2013a).

Como se observa en la Figura 3-32, la incorporación de alfa tocoferol en leche respecto de los valores ofrecidos en la dieta se ajustó a una función cuadrática.

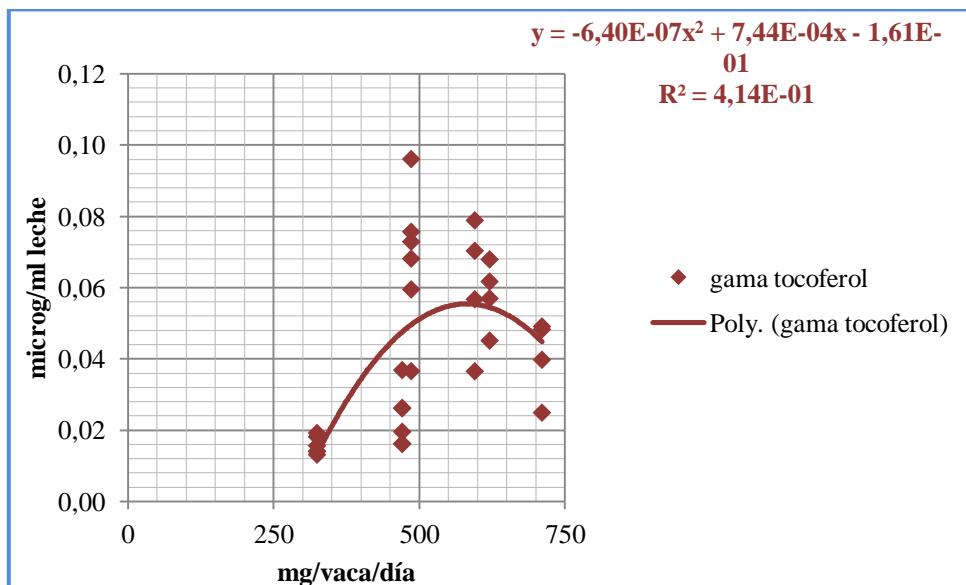


**Figura 3-32 Relación entre ingesta diaria de alfa tocoferol y su concentración en la leche**

El máximo de la función obtenida indica la cantidad de alfa tocoferol de la dieta que aporta la máxima concentración del nutriente en la leche cruda. Este valor fue de 946,24 mg de alfa tocoferol/vaca/día. Este valor sería aportado por una dieta pastoril entre A35 y A70.

El error de ajuste de los datos se debe a que las mediciones se realizaron en condiciones reales de producción de leche, con la variabilidad que ello implica.

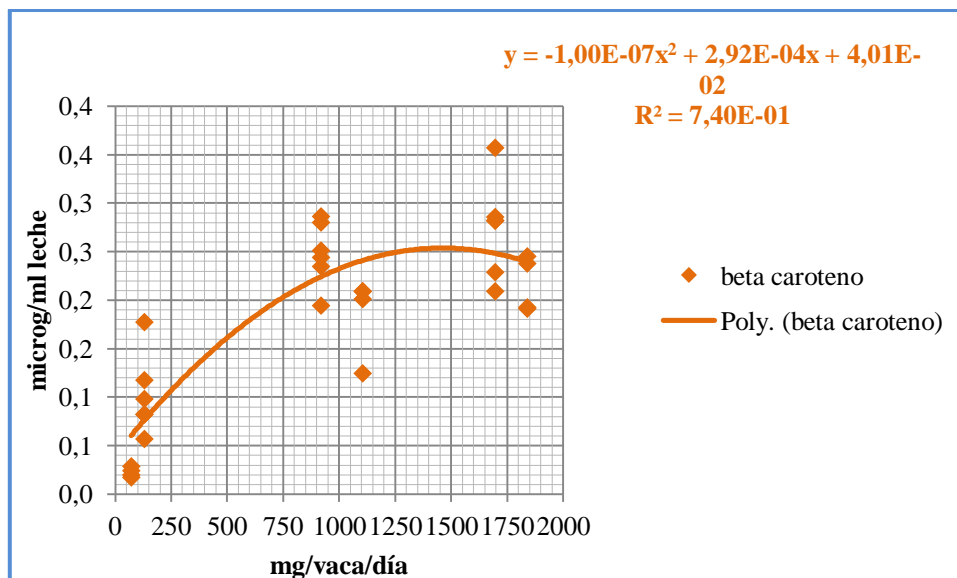
Para el gama tocoferol se observó una relación similar (Figura 3-33), con mayor dispersión y con valores máximos en leche entre 10 y 20 veces menores que para el isómero alfa. El máximo nivel de gama tocoferol en la leche cruda se alcanzaría con un aporte dietario de 581,37 mg/vaca/día. Estos valores serían aportados por todas las dietas ensayadas en primavera. En otoño los valores estuvieron un poco por debajo del máximo. Sin embargo se debe tener en cuenta que este isómero tiene menor actividad que el isómero alfa.



**Figura 3-33 Relación entre ingesta diaria de gama tocoferol y su concentración en la leche**

#### 3.4.3.2 Beta caroteno.

Una relación análoga a la del gama tocoferol se observó para este compuesto (Figura 3-34). El aporte de carotenoides depende fundamentalmente del consumo de pastura fresca, y la calidad de la misma resulta un factor definitorio de la presencia de este micronutriente en la leche (Calderón et al. (2006).



**Figura 3-34 Relación entre ingesta diaria de beta caroteno y su concentración en la leche**

Los cálculos del máximo de la función teórica obtenida para el beta caroteno, indicarían que 1461,8 mg/vaca/día, son necesarios para obtener la máxima concentración de provitamina A en la leche cruda.

Por lo tanto, como se indica en la Tabla 3-18, se puede inferir que una dieta con aproximadamente 50% de alfalfa alcanzaría para conseguir los valores máximos de concentración de alfa tocoferol y beta caroteno en la leche.

**Tabla 3-18 Porcentaje de pastura de alfalfa necesaria para lograr los máximos valores de alfa tocoferol y beta caroteno en leche cruda**

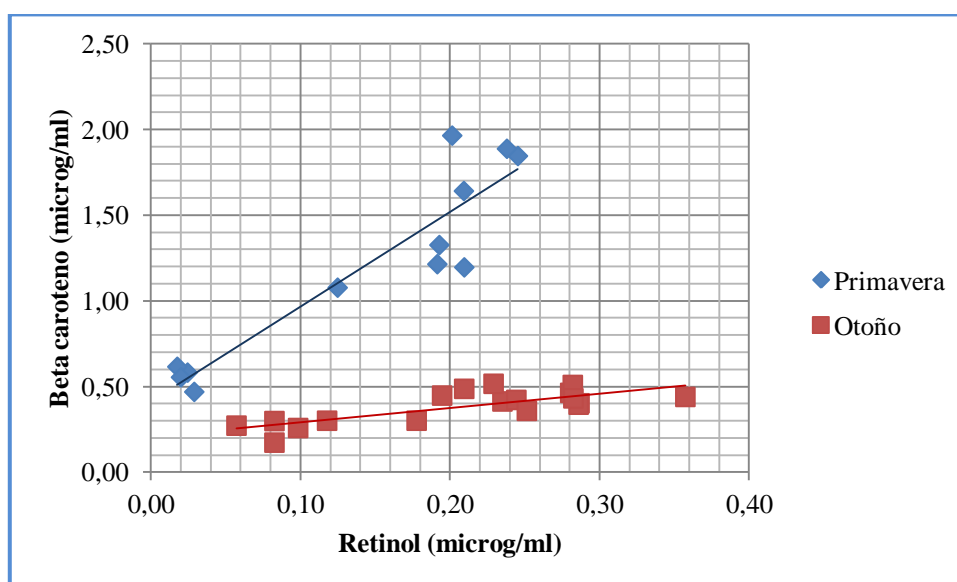
	Relación VD/porcentaje alfalfa (ALF)	Valor máximo de Y (VD mg/vaca/día)	Varlo calculado por ALF
Alfa tocoferol Primavera	$y = 9,852x + 427,5$	946,24	52,7
Alfa tocoferol Otoño	$y = 8,016x + 611,5$	946,24	41,8
Beta caroteno Primavera	$y = 25,26x + 120,5$	1461,8	53,1
Beta caroteno Otoño	$y = 22,37x + 131,0$	1461,8	59,5
		Promedio	51,8

### 3.4.3.3 Retinol.

El retinol es la forma activa de la vitamina A, por lo tanto esta vitamina mostró una tendencia similar a la del beta caroteno, con valores máximos en las leches de primavera (Tabla 3-17).

Debido a que el beta caroteno es el precursor de mayor tasa de conversión a vitamina A, al aumentar su oferta, aumenta la posibilidad de dicha conversión. Para los rumiantes esta tasa de conversión se estima en 6:1 beta caroteno:retinol (McDonald et al., 2010) (Baldi and Pinotti (2008).

Sin embargo, la relación beta caroteno/retinol no fue la misma en primavera y en otoño. A pesar que la oferta en la dieta fue similar en ambas estaciones para las dietas con pasturas, la relación entre las concentraciones de estos compuestos por ml de leche varió según la estación del año con coeficientes de correlación Pearson de 0,93 y 0,77 para primavera y otoño respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Figura 3-35).



**Figura 3-35 Relación entre la concentración de retinol y beta caroteno en leche cruda de primavera y otoño**

Esto indica que no es posible inferir el contenido de vitamina A en la leche con la simple medición de uno de sus precursores, Existen numerosos factores post-prandiales que determinarán la conversión de beta caroteno en vitamina A y su pasaje a la leche, desde fenómenos de acumulación en los tejidos (principalmente en hígado), de transporte a través de la sangre asociado a VLDL, de su uso en diferentes tejidos y su pasaje a la glándula mamaria, como el caso de la  $\beta$ -caroteno oxigenasa 2 (BCO2) bovina,



encargada de la transformación de beta caroteno en retinol (Berry et al., 2009).

Rafalowski et al. (2014) reportaron, en grasa extraída de leche de verano, valores similares a los conferidos por las dietas A35 y A70 en primavera, fenómeno evidentemente asociado a la pastura. Además en leches de invierno encontraron niveles similares a los de la leche procedente de la dieta A0.

#### 3.4.3.4 Vitamina D.

Se observó un incremento de la vitamina D asociado en primer lugar a la época del año. En primavera la concentración de vitamina D fue de un orden mayor que en otoño, sin importar el tipo de dieta.

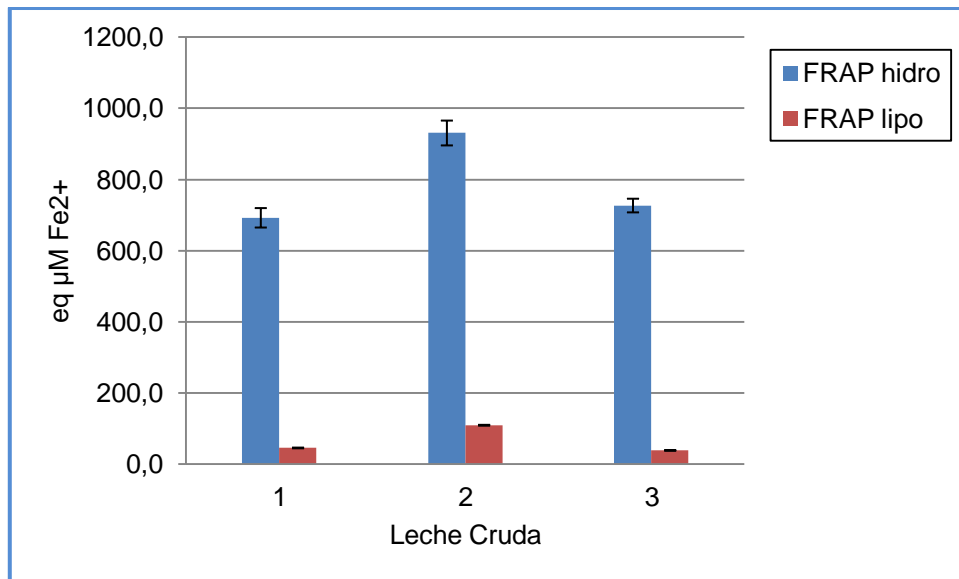
La síntesis de vitamina D está relacionada con la exposición al sol. Como la alfalfa fue ofrecida en comederos, las vacas de todos los tratamientos han tenido igual exposición al sol, ya que la dieta no estuvo asociada al pastoreo.

En cambio en el primer ensayo exploratorio, la dieta pastoril estuvo asociada al pastoreo directo en franjas y por lo tanto las leches pastoriles presentaron valores más elevados de esta vitamina en concordancia con lo reportado por Baldi and Pinotti (2008).

#### 3.4.3.5 Capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante total en las leches se midió por el método de FRAP, a través de la capacidad reductora de ión férrico en la leche cruda. Este método se eligió como complemento a las determinaciones de los antioxidantes liposolubles, ya que el 90% de la actividad reductora de la leche cruda se debe a la fracción hidrosoluble (Smet et al., 2008).

Para verificar este fenómeno en la Figura 3-36 se presenta la determinación de FRAP en las fracciones hidro y liposoluble en tres muestras de leche cruda procedente de tres tambos de productores lecheros (diferentes a los del ensayo) elegidos al azar (independientemente del tipo de alimentación).



**Figura 3-36 FRAP hidro y liposoluble**

Como se observa en la Figura 3-36, la fracción hidrosoluble participó casi con el 90% de la actividad antioxidante total medida por FRAP en la leche. Por esta razón se continuaron los ensayos de FRAP tomando en cuenta la leche entera, sin separar en fracciones, en los ensayos subsiguientes.

Estos valores no pueden compararse con los obtenidos en el ensayo de alimentación, ya que los tambos seleccionados para la prueba de FRAP hidro y liposoluble fueron de productores que aplicaron otro tipo de alimentación, incluyendo probióticos para animales, los cuales no son considerados en el presente trabajo de tesis.

Los resultados de la Tabla 3-17 muestran que la actividad antioxidante total en las leches de primavera aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) como resultado del incremento de alfalfa en la dieta, resultando para A0 y A35, 308,36 y 391,40  $\mu\text{M Fe}^{2+}$  respectivamente y para A70, 542,35  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ , mientras que en las leches de otoño no se observaron diferencias ( $p > 0,05$ ), promediando 368,14  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ . Smet et al. (2008) describieron que las variaciones medidas por la técnica de FRAP estarían relacionadas con la neutralización de los procesos iniciales de oxidación en la fase acuosa. Esto sería independiente de la concentración de vitaminas antioxidantes liposolubles que actúan a nivel del glóbulo de grasa en leche cruda.

Los valores de FRAP de las leches de otoño, fueron menores que los de las leches de primavera, pero más elevados que los encontrados por Amamcharla and Metzger (2014) y Chen et al. (2003) para leches crudas. Amamcharla and Metzger (2014) determinaron que valores de FRAP menores a 190  $\mu$ M eran insuficientes para evitar el daño oxidativo en la leche.

En cuanto a la inhibición de la oxidación se conoce que otros compuestos presentes en las pasturas también pueden contribuir a inhibir la oxidación lipídica en la leche. Ferlay et al. (2009) demostraron que una combinación de alfa tocoferol y un extracto rico en polifenoles fueron efectivos para reducir la oxidación en el plasma de vacas lecheras que consumían una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados. La alimentación con alfalfa podría conferirle a la leche compuestos fenólicos que potenciarían la actividad antioxidante de las vitaminas liposolubles.

#### 3.4.3.6 Oxidación.

En relación la oxidación lipídica, medida por TBARS se observaron valores diferentes entre las dos estaciones ( $p < 0,0001$ ), pero no hubo efecto de la dieta. Este resultado concuerda con la obtención de leche cruda de buena calidad, independientemente de la alimentación considerada.

La diferencia entre las estaciones podría deberse a factores ambientales. A medida que avanza el período primavera-verano, la temperatura aumenta y esto podría inducir un fenómeno prooxidante (de origen hormonal bajo estrés calórico, clivaje de ácidos grasos, etc). Este fenómeno se observó en los dos ensayos anteriores, con valores de TBA más elevados en las leches crudas del período cercano al verano respecto de las estaciones más templadas.

Los lípidos al oxidarse forman hidroperóxidos como productos de la oxidación primaria, especialmente de los ácidos grasos poliinsaturados, Luego, a través del clivaje de estos hidroperóxidos lipídicos se forman productos de oxidación secundarios tales como aldehídos, entre ellos el malonaldehído detectado por esta técnica (Stapelfeldt et al., 1997).

La variabilidad estacional del TBA en leche cruda, con valores más elevados en los meses de calor, se describe por primera vez en este trabajo, como resultado de cuatro experimentos independientes, y podría constituir un indicador de estrés calórico en las vacas lecheras.

Los valores de TBARS de las leches del presente ensayo, no alcanzaron los valores reportados en la literatura como para que sean sensorialmente detectables (Johnson et al., 2015), Estos autores indican que los cambios sensoriales debidos a la oxidación (por exposición a la luz) se detectan a partir de concentraciones de TBARS iguales o mayores a 1,3 ml/l (1300ppb).

#### 3.4.3.7 Color y aroma instrumental.

Como se mencionó, el color de los alimentos se puede determinar objetivamente a través de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ .

La luminosidad  $L^*$ , varió en las leches de otoño. El tratamiento sin alfalfa dio como resultado leche más clara ( $p < 0,001$ ). Sin embargo éste no fue el caso para las leches de primavera, ya que todos los tratamientos presentaron valores de  $L^*$  equivalentes y similares a los de las leches A35 y A70 de otoño.

Los valores de  $a^*$  y  $b^*$  aumentaron para las dos estaciones en las dietas con pasturas ( $p < 0,001$ ), tendiendo a aumentar en la escala hacia rojo y amarillo respectivamente (Tabla 3-19 y Tabla 3-20). Estos resultados y los valores son similares a los obtenidos en el ensayo de inclusión de alfalfa (punto 3.3).

Otro parámetro instrumental para determinar calidad de alimentos es la nariz electrónica. Su uso se aplicó a la diferenciación de las leches crudas procedentes de diferentes dietas. Como se toma cada aroma del espacio de cabeza de un vial, se tienen en cuenta todos los compuestos volátiles de este espacio a la vez. De este modo no es posible a través de esta metodología conocer cuáles son los compuestos que pueden diferenciar las distintas leches crudas.

Sin embargo, sí se pueden encontrar sensores individuales o un grupo de ellos que den una señal característica de cada dieta y/o época del año.

Los resultados de la Tabla 3-19 analizados por ANOVA, no muestran variaciones significativas en el aroma de las leches de primavera entre sí (sólo dos sensores fueron indicadores de dietas diferentes,  $p < 0,05$ ), mientras que en las leches de otoño (Tabla 3-20) se observaron diferencias en cinco de ellos ( $p < 0,05$ ).

Estos resultados analizados por sí solos, no son indicadores de diferencias atribuibles a la alimentación o a la estacionalidad. Sin embargo si los sensores se asocian a la presencia de determinados compuestos volátiles o a características químicas de la leche, pueden ser utilizados para explicar cómo se diferencian las leches procedentes de diferentes fuentes. Por ejemplo en un ensayo anterior de la presente tesis, se encontró un sensor que correlacionó con la capacidad antioxidante en la leche (Rossetti et al., 2010).

**Tabla 3-19 Medias y nivel de significancia obtenidos en primavera para las variables analizadas mediante ANOVA en leche cruda**

Variable	PRIMAVERA (Leche Cruda)							
	P0		P35		P70	T	CME1	
L* (color)	89,488		89,235		89,124	ns	0,07414	
a* (color)	-2,09	b	-0,8496	a	-1,01	a	***	0,1012
b* (color)	8,845	b	11,563	a	11,476	a	***	0,3802
LY2AA	-0,027		-0,0265		-0,0357	ns	0,00008	
LY2G	-0,0418		-0,0394		-0,0542	ns	0,00015	
LY2Gh	-0,0263		-0,0252		-0,0333	ns	0,00005	
LY2LG	-0,0827		-0,0770		-0,0755	ns	0,00004	
LY2gCT	0,0019		0,0043		-0,0031	ns	0,00004	
LY2gCT1	-0,0008		0,0053		-0,0201	ns	0,00028	
P101	0,4061		0,3734		0,3820	ns	0,00029	
P102	0,2999	a	0,2813	b	0,2854	ab	*	0,00008
P301	0,2163		0,1925		0,2177	ns	0,00028	
P302	0,1448		0,1308		0,1446	ns	0,00011	
P401	0,5048		0,4769		0,4852	ns	0,0002	
P402	0,2627		0,2301		0,2430	ns	0,00026	
PA2	0,3781		0,3349		0,3532	ns	0,0005	
T301	0,3644		0,3237		0,3426	ns	0,00041	
T401	0,4122		0,3799		0,3850	ns	0,0003	
T402	0,2412		0,216		0,221	ns	0,00017	
T702	0,2061	a	0,1793	b	0,1906	ab	*	0,00018
TA2	0,4248		0,3938		0,399	ns	0,00026	

Letras diferentes en distintas columnas indican efecto de Tratamiento

$p < 0,0001$  (\*\*\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $P < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,05$  (\*)

<sup>1</sup>CME: cuadrado medio del error

**Tabla 3-20 Medias y nivel de significancia obtenidos en otoño para las variables analizadas mediante ANOVA en leche cruda**

Variable	OTOÑO (Leche Cruda)					T	CME <sup>1</sup>	
	O0		O35	O70				
L* (color)	90,296	a	89,322	b	89,582	b	***	0,10381
a* (color)	-1,449	b	-0,6579	a	-0,4942	a	****	0,06267
b* (color)	10,196	c	12,362	b	13,292	a	****	0,2516
LY2AA	-0,0342	a	-0,0368	a	-0,0443	b	**	2,2E-05
LY2G	-0,0475	a	-0,0507	ab	-0,059	b	**	3,1E-05
LY2Gh	-0,0287	a	-0,0305	a	-0,0362	b	**	0,000012
LY2LG	-0,0682		-0,0675		-0,0665		ns	0,00009
LY2gCT	0,0093		0,0090		0,0073		ns	0,000005
LY2gCT1	-0,0037		-0,0107		-0,0203		ns	0,00021
P101	0,3682		0,3677		0,3695		ns	0,00039
P102	0,2705		0,2700		0,2712		ns	0,00014
P301	0,2008	b	0,2058	ab	0,2223	a	*	0,00013
P302	0,1310	b	0,1343	ab	0,1447	a	*	0,00006
P401	0,4668		0,4665		0,4692		ns	0,00032
P402	0,2090		0,2098		0,2153		ns	0,00029
PA2	0,3125		0,3133		0,3190		ns	0,00045
T301	0,3077		0,3075		0,3125		ns	0,00053
T401	0,3558		0,3545		0,3552		ns	0,00062
T402	0,1975		0,1972		0,1980		ns	0,00028
T702	0,1695		0,1695		0,1732		ns	0,00021
TA2	0,3733		0,3720		0,3728		ns	0,00057

Letras diferentes en distintas columnas indican efecto de Tratamiento

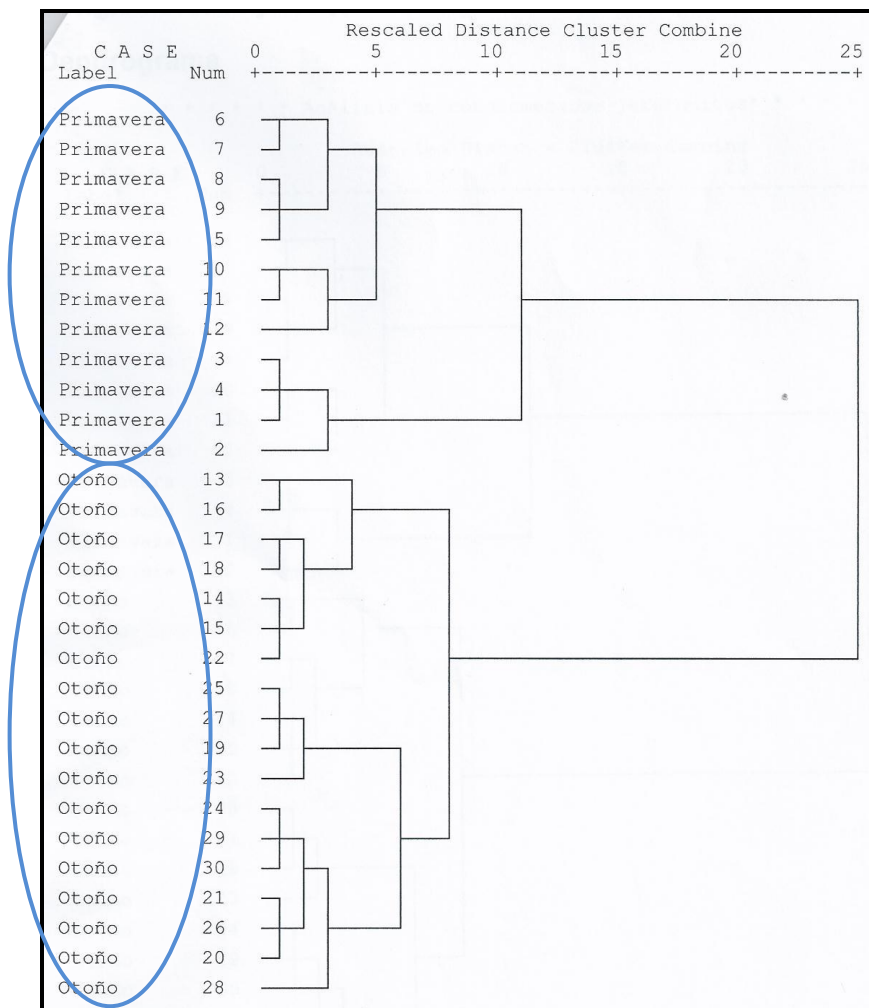
p<0,0001 (\*\*\*\*), p<0,001 (\*\*\*), P<0,01 (\*\*) y p<0,05 (\*)

<sup>1</sup>CME: cuadrado medio del error

De los resultados expuestos hasta el momento se puede deducir que el “efecto pastura” sobre la calidad de leche cruda resulta significativo en los meses de primavera-verano, en los cuales la oxidación y la capacidad antioxidante de la leche podrían reflejar una asociación con procesos relacionados a condiciones climáticas, que pueden influir sobre el rumen, la digestión, la absorción y el pasaje de los compuestos bioactivos a los tejidos y a la leche cruda.

Con todas las variables medidas hasta este punto (Tabla 3-19 y Tabla 3-20) para las leches crudas de primavera y otoño, se realizó un análisis por conglomerados jerárquicos que reveló dos grandes grupos de leches bien

diferenciadas correspondientes a las estaciones primavera y otoño (Figura 3-37), pero que no evidenció un efecto de las dietas dentro de cada estación.



**Figura 3-37 Conglomerado jerárquico por método de Ward**

Si sólo se consideran aquellas variables que demostraron ser significativamente distintas entre estaciones y dietas y se aplica un análisis discriminante, se pueden encontrar relaciones entre parámetros que permitan clasificar o discriminar las leches procedentes de las distintas dietas y así poner en evidencia el “efecto pastura”.

De este modo se encontraron funciones que diferenciaron significativamente las leches de diferentes estaciones y dentro de las estaciones, dietas pastoriles o no ( $p < 0,001$ ).

Las funciones lineales de Fisher para cada tratamiento fueron:

**P0=** -55,618 -13,766a\*+5,782L\* -12,687betacaroteno +0,148retinol +48,633TBARS

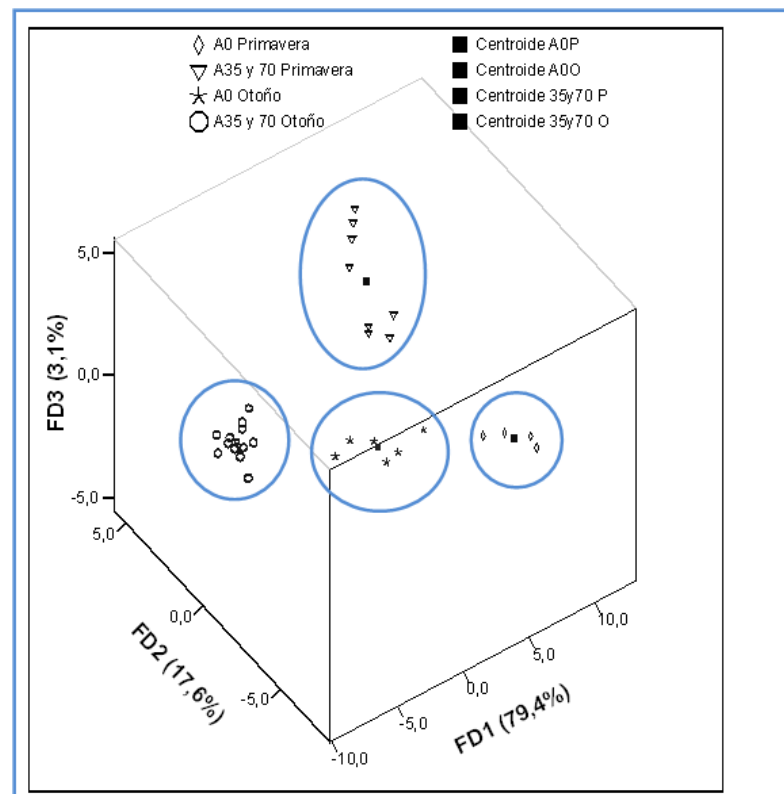
**P35 y 70=** -25,49-1,893a\*+1,949L\*-3,426betacaroteno+10,261retinol+31,12TBARS

**O0=** -14,288 -5,338a\*+4,162L\* -2,765betacaroteno -0,493retinol -16,886TBARS

**O35 y70=** -21,388+8,519a\*-5,308L\*+7,895betacaroteno-6,643retinol-28,515TBARS

Las variables de mayor peso elegidas por el programa fueron el valor a\* y L\* del color objetivo, beta caroteno, retinol y TBARS.

A su vez, los datos clasificaron correctamente en el 100,0% de los casos agrupados originales y clasificaron correctamente el 96,7% de los casos agrupados validados mediante validación cruzada, como se observa en la Figura 3-38.



**Figura 3-38 Análisis discriminante de las variables seleccionadas**

De este modo se observan cuatro grupos claramente separados, definidos dos de ellos por 0% de alfalfa, tanto en primavera como otoño y otros dos grupos, separados en primavera y otoño nuevamente pero dentro de estos últimos grupos vemos que no hay diferencia entre 35 y 70% de alfalfa.



En el caso de la aplicación de análisis discriminante, con selección de variables significativas por el método stepwise, ni los isómeros de alfa tocoferol ni los sensores indicadores de aroma fueron seleccionados como factor discriminante de la alimentación pastoril en cada estación. Sin embargo el tratamiento de todos los parámetros analizados (figura aroma, tabla parámetros ANOVA, dendrograma y gráfico función discriminante) nos permite concluir que la calidad de la leche está fuertemente influenciada por la estacionalidad, por la presencia o ausencia de pastura en la dieta y que el color varía como consecuencia de la inclusión de dicha pastura y la susceptibilidad a la oxidación de las mismas.

#### 3.4.3.8 Compuestos volátiles.

Las leches crudas de primavera presentaron valores más altos de hexanal, heptanal, trans-2-heptenal, nonanal and trans-2-nonenal en las leches A0 respecto de A35 y A70 (Tabla 3-21). Estos aldehídos volátiles son indicadores de oxidación espontánea en leche cruda (Barrefors et al., 1995). Por ende, estos parámetros podrían ser indicadores de oxidación lipídica temprana presentes en mayor medida en las leches provenientes de alimentación con silaje. De estos compuestos, en otoño sólo se observó un aumento del trans-2-heptenal en las leches del tratamiento A0.

La presencia de propanal es específica como indicador de oxidación de ácidos grasos n-3, pero no se detectó en ninguno de los tratamientos.

A su vez, el pentanal y hexanal son indicadores de oxidación de ácidos grasos n-6 (Li et al., 2012), Los valores más altos de hexanal para las leches del tratamiento A0 de primavera son concordantes con los porcentajes más altos de ácidos grasos n-6. Sin embargo, en ambas estaciones el pentanal aumentó con el aporte de alfalfa en la dieta. En primavera no fue significativo aunque sí se observa una tendencia.

Sensorialmente, los valores umbrales de pentanal y hexanal asociados a la detección de “olor oxidado” son de 130 y 50 ppb respectivamente (Duncan and Webster, 2010).

En el presente ensayo, las leches crudas estuvieron por debajo de estos valores, en consistencia con los datos obtenidos por la prueba de TBARS.

Los restantes compuestos volátiles sólo mostraron diferencias entre ensayos (Tabla 3-21 y Tabla 3-22).

**Tabla 3-21 Aldehídos volátiles para leche cruda proveniente de las distintas alimentaciones con alfalfa para primavera**

Variable (ppb)	PRIMAVERA (Leche Cruda)							
	P0		P35		P70		T	CME1
Butanal	1,907	b	2,078	b	2,976	a	**	0,668
Pentanal	0,596		0,594		0,732		ns	0,056
Hexanal	20,389	a	1,827	b	2,978	b	****	1,57
Trans 2 hexenal	0,302		0,294		0,345		ns	0,005
Heptanal	1,931	a	0,887	b	0,943	b	****	0,296
Trans 2 heptenal	3,958	a	2,132	b	2,316	b	****	0,949
Nonanal	6,244	a	3,019	b	2,541	b	****	2,282
Trans 2 nonenal	1,369	a	0,725	b	0,609	b	****	0,188
Octanal	4,832	a	2,931	b	3,934	ab	****	1,087
Volátiles totales	41,522	a	14,484	b	17,375	b	****	21,86

Letras diferentes en distintas columnas indican efecto de Tratamiento

$p < 0,0001$  (\*\*\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $P < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,05$  (\*) <sup>1</sup>CME: cuadrado medio del error

**Tabla 3-22 Aldehídos volátiles para leche proveniente de las distintas alimentaciones con alfalfa para otoño**

Variable (ppb)	OTOÑO (Leche Cruda)							
	O0		O35		O70		T	CME1
Butanal	4,469		4,423		4,952		ns	3,03
Pentanal	0,449	b	0,487	b	0,780	a	****	0,023
Hexanal	3,763	ab	3,052	b	5,193	a	*	2,600
Trans 2 hexenal	0,196		0,284		0,269		ns	0,008
Heptanal	2,774		3,207		3,744		ns	1,964
Trans 2 heptenal	1,044	a	1,403	a	0,202	b	****	0,173
Nonanal	1,150		1,205		0,970		ns	0,182
Trans 2 nonenal	0,129		0,129		0,122		ns	0,03
Octanal	1,029	b	1,743	a	1,135	b	*	0,346
Volátiles totales	15,007		15,930		17,363		ns	8,043

Letras diferentes en distintas columnas indican efecto de Tratamiento

$p < 0,0001$  (\*\*\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $P < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,05$  (\*) <sup>1</sup>CME: cuadrado medio del error

### 3.4.3.9 Ácidos grasos.

En general el consumo de pasturas frescas induce en la leche cruda, un aumento de ácidos grasos insaturados, especialmente los poliinsaturados y consecuentemente una disminución de ácidos grasos saturados (Adler et al., 2013a; Mansbridge and Blake, 1997; Whiting et al., 2004).

En los ensayos de la presente tesis, cuatro ácidos grasos presentaron diferencias aumentando con la incorporación de alfalfa en la dieta, independientemente de la estación del año en la que fueron evaluados (C15, C16:1, C18:3n3 y C20:5 n3). Éstos se transforman por lo tanto en posibles trazadores de alfalfa en las dietas.

**Tabla 3-23 Composición de ácidos grasos de leche cruda obtenida a partir de vacas alimentadas con diferentes proporciones de alfalfa en la dieta en primavera y otoño**

% ác gr, total	P0	P35	P70	O0	O35	O70	E	Trat
c4	3,27	3,45	3,61	3,42	3,46	3,49	ns	ns
c6	2,17	2,19	2,32	2,42	2,36	2,23	ns	ns
c8	1,34	1,27	1,31	1,50	1,42	1,29	*	*
c10	2,99	2,78	2,80	3,44	3,13	2,73	*	***
c10:1	0,24	0,22	0,22	0,31	0,31	0,27	****	*
c12	3,31	3,01	2,99	3,68	3,48	3,02	**	****
c14	10,94	10,72	11,03	11,84	11,14	10,61	*	**
c14:1	0,79	0,72	0,71	0,90	0,93	0,83	****	*
c15	0,89	0,95	1,12	0,88	1,00	1,18	ns	****
c16	25,16	26,37	28,33	27,48	27,13	29,78	***	****
c16:1	1,39	1,43	1,52	1,39	1,46	1,58	ns	**
c17	0,60	0,62	0,71	0,51	0,56	0,69	****	****
c18	12,97	13,08	11,70	11,37	10,90	10,46	****	**
c18:1t	3,12	2,89	2,88	2,56	2,85	2,60	**	ns
c18:1c	20,65	20,14	19,09	18,24	18,68	18,34	****	ns
c18:2 n6tt	0,15	0,15	0,19	0,17	0,23	0,25	**	**
c18:2 n6ct	0,13	0,15	0,09	0,19	0,22	0,23	****	ns
c18:2 n6tc	0,08	0,07	0,16	0,07	0,16	0,28	****	****
c18:2 n6cc	3,87	3,30	2,39	3,23	2,99	1,86	****	****
c18:3 n3	0,32	0,53	0,91	0,35	0,58	1,02	ns	****
CLA	0,87	0,91	0,87	0,71	0,81	0,84	***	**
c22:4 n6	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	ns	ns
c20:5 n3	0,03	0,04	0,08	0,05	0,06	0,08	ns	****
Tot, Saturados	63,63	64,45	65,92	66,44	64,59	65,50	ns	ns
Tot, Insaturados	34,79	33,62	32,24	30,87	32,44	31,27	****	*

Tot, Monoinsaturados	25,95	25,17	24,19	23,09	23,92	23,34	****	*
Tot, Poliinsaturados	5,42	5,17	4,73	4,79	5,07	4,57	**	****
Relación Sat/Insat	1,83	1,92	2,05	2,16	1,99	2,10	*	*
Trans (sin CLA)	3,43	3,27	3,32	2,99	3,45	3,35	ns	ns
n6 total	10,34	9,41	8,95	8,60	9,05	8,04		
n3 total	0,28	0,59	0,82	0,38	0,62	1,05		
n6/n3	36,91	15,94	10,98	22,62	14,59	7,69		
18:2 n6	4,38	3,58	3,36	3,50	3,53	2,68		
18:2 n3	0,26	0,54	0,75	0,33	0,56	0,96		

p<0,0001 (\*\*\*\*), p<0,001 (\*\*\*), P<0,01 (\*\*) y p<0,05 (\*)

Otros ácidos grasos tales como el C8, C10, C10:1, C14:1, C18:2cc disminuyeron con el aporte de alfalfa en la dieta pero con diferente concentración según la estación del año.

La dieta de alfalfa indujo cambios a nivel de los ácidos grasos C16, C18:2tt, y un aumento significativo del CLA sólo para otoño.

Tanto el CLA como los ácidos grasos n-3 y n-6 de cadena larga, son de interés desde el punto de vista nutricional y es importante señalar que su concentración fue modulada significativamente (p<0,05) por la dieta y la estación del año.

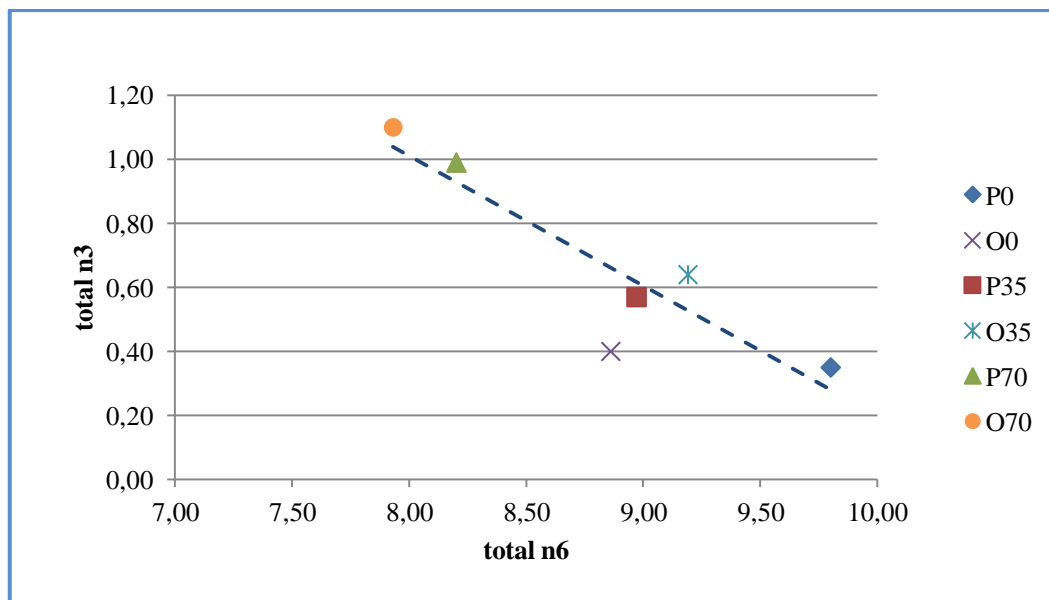
La inclusión de alfalfa en la dieta de las vacas lecheras favoreció el aumento de CLA total y disminuyó significativamente la relación n-6/n-3 en la leche cruda.

La desventaja de este perfil de ácidos grasos mejorado desde el punto de vista de la salud humana es que favorece la oxidación en la leche debido a la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados con más de dos dobles enlaces aumentando el índice de peroxidabilidad (Whitting and Horwitt, 1964).

De acuerdo con esta observación, al aumentar el porcentaje de alfalfa en la dieta, aumenta la susceptibilidad a la oxidación (desde el punto de vista de la composición de ácidos grasos (A70 > A35 > A0)).

Sin embargo, estas diferencias no se evidenciaron mediante la técnica de TBARS para ninguna de las estaciones evaluadas.

Como se puede ver en la Figura 3-39, para ambas estaciones se observa una buena correlación ( $r = -0,89$ ) en la alimentación entre porcentaje total de ácidos grasos n-6 y n-3. En las dietas pastoriles hubo un fuerte aumento de los n-3 a expensas de los n-6, mejorando de esta manera el aporte omega 3 en la leche.

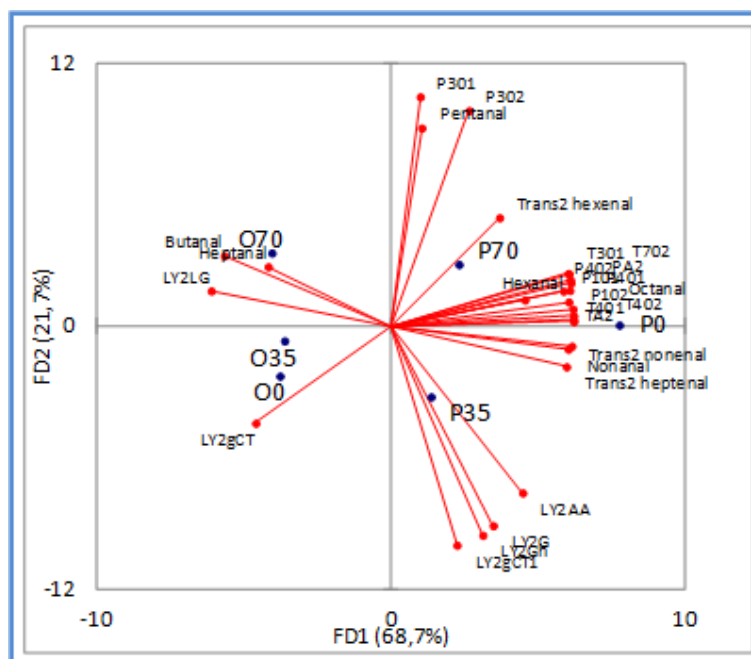


**Figura 3-39 Relación entre ácidos grasos n-6 y n-3 de leche cruda en primavera y otoño**

#### 3.4.4 Tratamiento quimiométrico de datos.

Este análisis cuantitativo se realizó con el objeto de observar relaciones entre variables individuales, medidas para cada uno de los tratamientos ensayados, sin la intervención de una hipótesis que pudiera afectar la distribución de los datos y sus relaciones.

Para ello se realizó un análisis discriminante de componentes principales entre los valores de compuestos volátiles y los valores de los sensores de la nariz electrónica con el objeto de determinar relaciones entre la medida de olor y el compuesto químico (Figura 3-40).



**Figura 3-40 AD de los compuestos volátiles y sensores de nariz electrónica en las muestras de leche cruda para Primavera y Otoño en los tratamientos 0, 35 y 70% de alfalfa**

Se observa la separación de las leches a lo largo de la componente FD1 para las diferentes estaciones. Las leches de primavera se asociaron a un mayor número de sensores y a una mayor cantidad de volátiles.

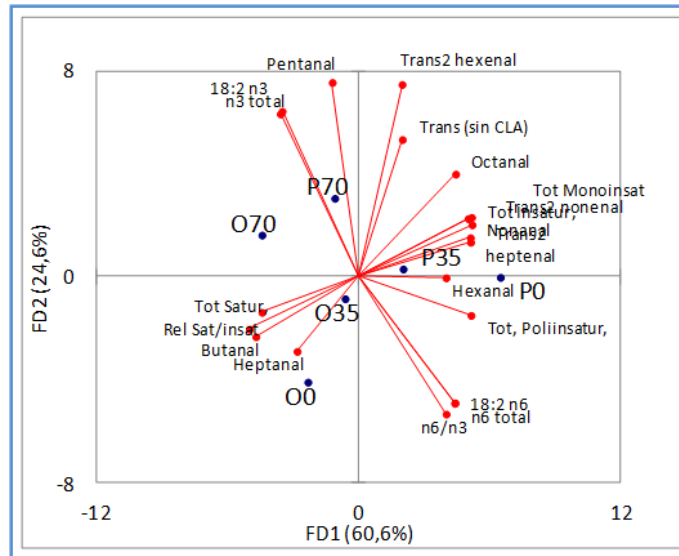
Es interesante señalar también las relaciones entre los volátiles y los sensores. El sensor LY2G se asoció a la presencia de heptanal y butanal y a su vez a la leche de otoño 70% alfalfa (O70), en la componente FD1.

En la componente FD2, los sensores P301 y P302 se asociaron al pentanal y en menor medida a las leches de primavera con 70% de alfalfa (P70) que a su vez se relacionó con la presencia de trans-2-hexenal - indicador de los ácidos grasos n-3- y presenta mayor abundancia en estas leches.

La leche 0% alfalfa de primavera (P0) se asoció a mayores niveles de hexanal, octanal, trans-2-heptenal, trans-2-nonenal y nonanal, consistente con mayores niveles de oxidación por TBARS y a su vez éstos correlacionaron con diez sensores en la componente FD1. Barrefors et al. (1995) encontraron que las leches crudas con mayor off flavor (olor

particular) tenían mayor proporción de estos aldehídos volátiles y menores contenidos de alfa tocoferol y beta caroteno.

Por otro lado se relacionaron los volátiles con los ácidos grasos, especialmente aquellos indicadores de oxidación (Figura 3-41).



**Figura 3-41 AD de los compuestos volátiles y ácidos grasos en las muestras de leche cruda para Primavera y Otoño en los tratamientos 0, 35 y 70% de alfalfa**

Se observó que las dietas con 70% de alfalfa (P70 y O70) se asociaron a la presencia de ácidos grasos n-3, ácidos grasos trans y a la producción de pentanal.

La dieta de otoño sin pastura (O0) se asoció a mayor concentración de ácidos grasos saturados y la presencia de hexanal y butanal, mientras que la dieta sin alfalfa de primavera (P0) mostró relación con aumento de los ácidos grasos n-6 y los poliinsaturados totales así como de hexanal, nonanal y trans-2 heptenal a lo largo del eje FD1.

Asimismo los ácidos grasos trans, se asociaron a la presencia de trans-2-hexenal en la componente FD2. Estos aldehídos son generados a partir de la ruptura de los ácidos grasos insaturados causada por la oxidación. Los hidroperóxidos formados continúan rompiéndose y generando compuestos carbonílicos volátiles responsables del off-flavor característico de la leche

oxidada. Los aldehídos de cadena simple son los responsables principales de estos aromas indeseados (Day and Lillard, 1960).

Este trabajo demuestra la posibilidad de utilizar herramientas quimiométricas para relacionar la influencia de la dieta pastoril, con la incorporación de ácidos grasos en la leche y la generación de volátiles asociados a la oxidación de los mismos y el aroma instrumental de la leche cruda a fin de describir el “efecto pastura” sobre la composición de la leche.

#### 3.4.5 Productos Lácteos. Leche Entera en Polvo.

A partir de las leches crudas caracterizadas en el punto anterior se elaboró leche en polvo en la planta piloto de Sancor, Provincia de Santa Fe, según la Figura 2-3 (pág. 41) de materiales y métodos.

La hipótesis experimental de esta parte del ensayo enuncia que la leche en polvo conserva las mismas características físico-químicas y sensoriales que la leche cruda que le da origen, de modo de relacionar los parámetros de alimentación con la calidad de un producto en condiciones de consumo.

La leche en polvo representa además un modelo experimental de inducción de oxidación, ya que la condensación y secado de las leches involucran procesos térmicos agresivos para las moléculas susceptibles de sufrir deterioro.

De este modo sirve como modelo para testear si las leches con mayores antioxidantes incorporados naturalmente al glóbulo de grasa, sufren menor deterioro oxidativo.

##### 3.4.5.1 Calidad de leche en polvo.

En primer lugar se presentan los parámetros de composición química convencional de las LEP de cada dieta y estación (Tabla 3-24).



**Tabla 3-24 Composición química de la leche en polvo obtenida**

Variable	P0	P35	P70	O0	O35	O70	E	Tratamiento	TxE
Grasa (%)	25,00	26,28	27,68	27,24	27,52	27,32	*	*	*
Proteína (%)	26,12	24,68	24,72	24,96	25,52	25,00	ns	0,039	*
Lactosa (%)	39,72	39,72	39,12	39,84	39,20	39,96	ns	ns	ns
Humedad (%)	2,30	3,10	2,26	1,60	1,48	1,46	*	ns	ns
Grasa libre	0,29	0,43	0,40	1,12	0,98	0,92	*	ns	ns

( $p < 0,01$ )

Se observaron diferencias estacionales en humedad (%) y grasa libre (%) ( $p < 0,05$ ), sin embargo hay que tener en cuenta que estas variaciones pueden estar asociadas al funcionamiento de la planta piloto, ya que las elaboraciones se realizaron en distintos días.

Se observó un leve efecto significativo de la dieta ( $p < 0,039$ ) sobre la proteína, con valores de 25,54, 25,10 y 24,86% para las dietas A0, A35 y A70 respectivamente. Esta tendencia es la misma que se observa en las leches crudas (Tabla 3-16, pág. 108), con valores menores de porcentaje de proteína asociados al aumento de pastura en la dieta.

#### 3.4.5.2 Vitamina E, beta caroteno y retinol.

Como se observa en la Tabla 3-25, los micronutrientes antioxidantes mostraron en la leche en polvo la misma tendencia observada en la leche cruda.

En primavera el alfa tocoferol, beta caroteno y retinol aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ), mientras que el gama tocoferol disminuyó ( $p < 0,05$ ) con la mayor oferta de pastura de alfalfa (A35 y A70).

En las LEP de otoño, el alfa tocoferol no tuvo relación con el aumento de pastura en la dieta, mientras que el gama tocoferol disminuyó con la presencia de pastura, mostrando la misma tendencia que en primavera. De este modo el gama tocoferol estaría modulado por la presencia de granos y alimento balanceado en la dieta de las vacas, mientras que el alfa tocoferol, el beta caroteno y el retinol, estarían asociados principalmente a la dieta pastoril siendo esta tendencia más evidente en primavera. El beta caroteno aumentó 4 veces para A35 y A70 respecto de A0 en primavera y 2 veces en

otoño y para el retinol se duplican los valores de las leches provenientes de alimentación con alfalfa tanto en primavera como en otoño.

El alfa tocoferol de las LEP de otoño mostró una tendencia no esperada. En los ensayos que se habían realizado hasta el momento y de acuerdo a la mayoría de los datos de literatura, el pastoreo favorece la incorporación de alfa tocoferol a la leche.

En este caso, los niveles fueron parejos para todas las dietas (con una leve tendencia a ser más elevados en A35 y A70 que en A0) y más elevados en otoño que en primavera, lo cual podría deberse a factores fisiológicos que controlan el pasaje de vitamina E a la glándula mamaria y que no estarían relacionados con la ingesta de la vitamina (Kono and Arai, 2015).

**Tabla 3-25 Medias y nivel de significancia obtenidos en primavera y otoño para las vitaminas y capacidad antioxidante mediante ANOVA en LEP**

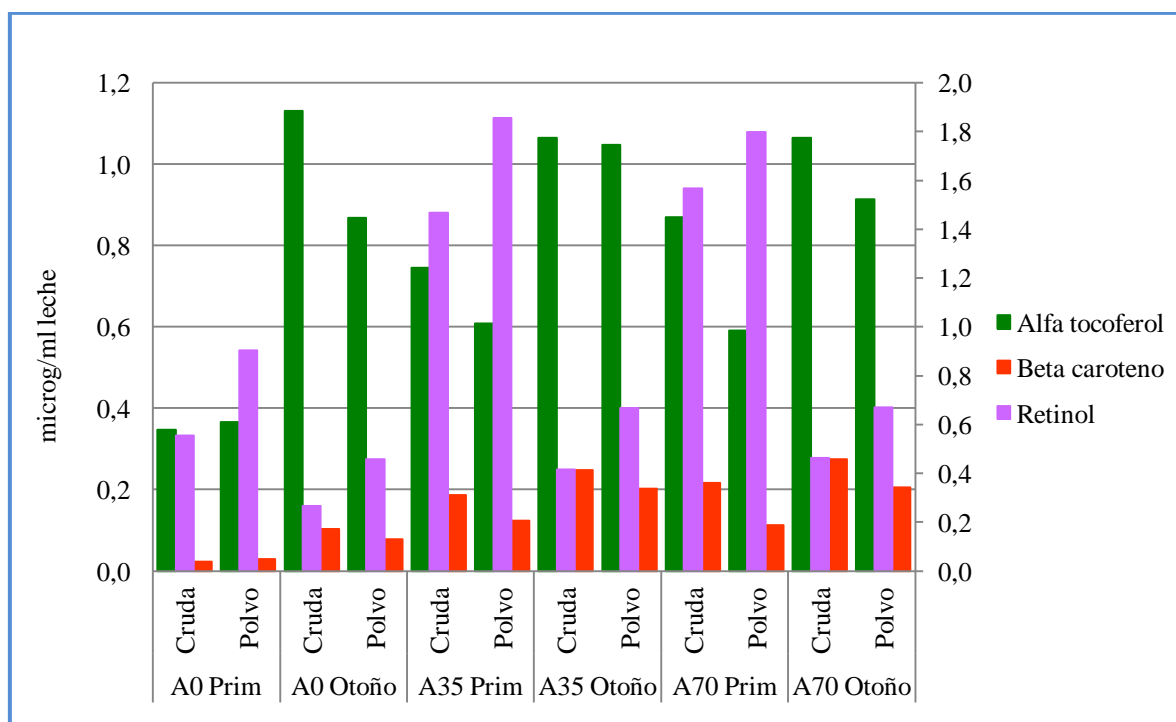
Variable	PRIMAVERA (LEP)				
	P0	P35	P70	T	CME1
Alfa tocoferol (µg/g LEP)	2,8159	b 4,6819	a 4,5469	a ****	0,008
Gama tocoferol (µg/g LEP)	0,6262	a 0,3865	b 0,3876	b *	0,0131
Beta caroteno (µg/g LEP)	0,2294	b 0,9564	a 0,8704	a ****	0,0035
Retinol (µg/g LEP)	6,956	b 14,280	a 13,854	a ****	2,042
D3 (µg/g LEP)	0,8978	0,8423	0,9021	ns	0,0179
FRAP (eq µM Fe2+)	271,55	335,05	266,98	ns	1309,47
TBA (ppb)	1073,5	1132,3	968,2	ns	9884,5
Ribo polvo (µg/g LEP)	10,813	11,027	11,010	ns	1,267
Variable	OTOÑO (LEP)				
	O0	O35	O70	T	CME1
Alfa tocoferol (µg/g LEP)	6,6837	8,0694	7,0366	ns	1,685
Gama tocoferol (µg/g LEP)	0,3519	a 0,1923	ab 0,0864	b **	0,0074
Beta caroteno (µg/g LEP)	0,5946	b 1,5593	a 1,5794	a ***	0,1122
Retinol (µg/g LEP)	3,528	b 5,144	a 5,154	a *	0,4866
D3 (µg/g LEP)	0,2868	0,3589	0,3432	ns	0,003
FRAP (eq µM Fe2+)	310,23	319,83	291,45	ns	740,32
TBA (ppb)	1102,7	b 1165,2	b 1490,2	a **	20724
Ribo polvo (µg/g LEP)	12,000	b 11,772	b 13,822	a ***	0,2956

Letras diferentes en distintas columnas indican efecto de Tratamiento

p<0,0001 (\*\*\*\*), p<0,001 (\*\*\*), P<0,01 (\*\*) y p<0,05 (\*)

<sup>1</sup>CME: cuadrado medio del error

Se puede estimar la recuperación de las vitaminas en la leche en polvo, respecto de sus valores originales en la leche cruda. Para ello se debe considerar que la leche en polvo se reconstituye al 13%, o sea 13 g LEP en 100 ml de agua. Si bien esta relación es estimativa, puede dar una idea del efecto del procesamiento sobre la estabilidad de los micronutrientes. A grandes rasgos se estimó que en promedio la recuperación de los micronutrientes en la leche en polvo respecto de su concentración en leche cruda fue de 86,0%; 80,3%; 141,8%; 120,1% y 98,7% para alfa tocoferol, beta caroteno, retinol, colecalciferol y gama tocoferol respectivamente. La Figura 3-42 ilustra estas relaciones para el alfa tocoferol, beta caroteno y retinol.



**Figura 3-42 Comparación de vitaminas antioxidantes: alfa tocoferol, beta caroteno y retinol en leche en polvo (expresado por ml) y cruda para los tratamientos en primavera y otoño**

#### 3.4.5.3 Riboflavina, capacidad antioxidante y oxidación.

Los valores de riboflavina fueron significativamente más altos en el tratamiento A70 de las leches de otoño. En las leches de primavera no se evidenció un efecto de la dieta sobre la concentración de esta vitamina. De este modo la riboflavina también presentó en leche en polvo la misma tendencia que en la leche fluida. No hay en la literatura consenso general sobre la variación de esta vitamina relacionada a la estación ni a la alimentación (Poulsen et al., 2015).

Sí es importante señalar que esta vitamina puede sufrir autooxidación, especialmente inducida por luz y constituir un factor prooxidante en las leches y productos lácteos, generando una cadena de oxidación que afecta principalmente lípidos y proteínas alterando sensorialmente los productos lácteos (Duncan and Webster, 2010; Johnson et al., 2015; van Aardt et al., 2005).

De hecho, la oxidación lipídica fue más elevada en las LEP del tratamiento A70 de otoño, leches que presentaron valores más elevados de riboflavina. Para el resto de los tratamientos y las estaciones, los valores de TBARS fueron similares, no observándose diferencias estacionales como se había observado para la leche cruda.

Respecto a la capacidad antioxidante medida por FRAP no hubo diferencias por tratamiento en ninguna de las dos estaciones ni tampoco diferencias entre dietas.

De este modo se podría inferir que el procesamiento térmico de las leches afectó de manera similar a todas las muestras, independientemente de la dieta o de la estación del año.

Dado que hay un tratamiento térmico en la elaboración de la leche en polvo, tal como calentamiento, concentración y secado, es importante estudiar el efecto en el tiempo sobre el desarrollo de productos de oxidación y producción de compuestos volátiles, Por esta razón, se estudió la vida útil de la leche en polvo producida. Estos datos se analizan en el siguiente capítulo de esta tesis.

### 3.4.5.4 Color y aroma instrumental.

**Para las variables de color, L\*, a\* y b\*, se observaron las mismas tendencias tendencias aunque con distinta significancia que en leche cruda (Tabla 3-26 y**

Tabla 3-27), En general, disminuyó el valor L\* en las LEP de vacas alimentadas con pasturas de primavera ( $p < 0,001$ ), pero no hubo diferencias en las LEP de otoño, mientras que los parámetros a\* y b\*, aumentaron hacia las componentes rojo y amarillo, respectivamente, debido a la presencia de alfalfa en la dieta ( $p < 0,05$ ) en ambas estaciones.

**Tabla 3-26 Medias y nivel de significancia obtenidos en primavera para las variables de color y aroma analizadas mediante ANOVA en LEP**

PRIMAVERA (LEP)								
	P0		P35		P70		T	CME1
L* (color)	94,822	a	94,501	b	94,258	c	***	0,00143
a* (color)	-1,5156	b	-0,9200	a	-0,9506	a	****	0,0159
b* (color)	12,6760	b	14,8110	a	14,0520	ab	**	0,0578
LY2AA	-0,0182		-0,0175		-0,0175		ns	0,00001
LY2G	-0,0224		-0,0213		-0,0212		ns	0,00001
LY2Gh	-0,0169		-0,0160		-0,0162		ns	0,00001
LY2LG	-0,1001		-0,1021		-0,1010		ns	0,00001
LY2gCT	0,0063		0,0063		0,0063		ns	0,00001
LY2gCT1	0,0211		0,0220		0,0217		ns	0,00001
P101	0,3604		0,3647		0,3629		ns	0,00001
P102	0,2708		0,2741		0,2728		ns	0,00001
P301	0,1437		0,1421		0,1424		ns	0,00001
P302	0,1064		0,1061		0,1056		ns	0,00001
P401	0,4698		0,4737		0,4718		ns	0,00001
P402	0,1734		0,1761		0,1750		ns	0,00001
PA2	0,2521		0,2550		0,2538		ns	0,00001
T301	0,2621		0,2649		0,2630		ns	0,00001
T401	0,3388		0,3444		0,3418		ns	0,00002
T402	0,1725		0,1757		0,1742		ns	0,0001
T702	0,1366		0,1380		0,1371		ns	0,0001
TA2	0,3573		0,3629		0,3605		ns	0,0002

Letras diferentes en distintas columnas indican efecto de Tratamiento

$p < 0,0001$  (\*\*\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $P < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,05$  (\*)

<sup>1</sup>CME: cuadrado medio del error

**Tabla 3-27 Medias y nivel de significancia obtenidos en otoño para las variables de color y aroma analizadas mediante ANOVA en LEP**

OTOÑO (LEP)						
	O0	O35	O70	T	CME1	
L* (color)	95,320	94,839	95,026	ns	0,1025	
a* (color)	-1,2350	b -0,7675	a -0,8975	ab	*	0,0397
b* (color)	13,5450	b 14,8840	a 15,6720	a	***	0,2503
LY2AA	-0,0402	-0,0365	-0,0370		ns	0,00002
LY2G	-0,0591	-0,0512	-0,0490		ns	0,00004
LY2Gh	-0,0426	-0,0371	-0,0352		ns	0,00002
LY2LG	-0,0607	b -0,0597	ab -0,0582	a	*	0,00001
LY2gCT	-0,0078	-0,0020	0,0085		ns	0,00008
LY2gCT1	-0,0289	-0,0257	-0,0241		ns	0,00001
P101	0,3696	a 0,3648	ab 0,3523	b	*	0,00005
P102	0,2429	a 0,2402	a 0,2333	b	***	0,00001
P301	0,2080	0,1950	0,1790		ns	0,0003
P302	0,1284	0,1228	0,1205		ns	0,00002
P401	0,4764	b 0,4706	ab 0,4567	a	*	0,00007
P402	0,2022	0,1945	0,1805		ns	0,0001
PA2	0,3222	0,3123	0,2905		ns	0,0004
T301	0,3684	0,3549	0,3199		ns	0,0013
T401	0,3271	a 0,3227	a 0,3115	b	***	0,00002
T402	0,1782	a 0,1759	a 0,1694	b	***	0,00001
T702	0,2027	0,1938	0,1721		ns	0,0004
TA2	0,3511	a 0,3465	a 0,3337	b	***	0,00002

Letras diferentes en distintas columnas indican efecto de Tratamiento

p<0,0001 (\*\*\*\*), p<0,001 (\*\*\*), P<0,01 (\*\*) y p<0,05 (\*)

<sup>1</sup>CME: cuadrado medio del error

Estos cambios fueron apreciables a simple vista como se observa en la Figura 3-43 para LEP de primavera de los tratamientos A0, A35 y A70.



**Figura 3-43 LEP de primavera de los tratamientos A0, A35 y A70**

En cuanto al aroma, no hubo diferencias significativas para las leches en polvo de primavera pero sí para las leches de otoño.

#### 3.4.5.5 Compuestos volátiles.

Los compuestos volátiles asociados a oxidación que manifestaron cambios significativos con la dieta fueron el hexanal, heptanal y trans-2-heptenal para las LEP de primavera, siendo mayores las concentraciones de estos compuestos para los tratamientos con menor porcentaje de alfalfa en la dieta (Tabla 3-28).

Las leches en polvo del tratamiento sin alfalfa estarían menos protegidas de la oxidación lipídica, Estos resultados no concordaron con lo observado por TBARS, indicando que la aparición de volátiles sería mejor indicador de la oxidación lipídica en leche en polvo. Este fenómeno se repitió en las LEP de otoño con el hexanal. La oxidación en las muestras de A0 fue significativamente mayor que en A70 ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3-28 Aldehídos volátiles para LEP proveniente de las distintas alimentaciones con alfalfa para primavera y otoño**

Variable (ppb)	PRIMAVERA (LEP)						T	CME1
	P0		P35		P70			
Butanal	2,962	ab	4,955	a	1,585	b	**	1,395
Pentanal	7,684		5,905		4,603		ns	2,790
Hexanal	94,05	a	54,13	b	50,95	b	****	92,81
Trans 2 hexenal	nd		nd		nd		--	--
Heptanal	10,026	a	6,533	b	6,457	b	*	2,937
Trans 2 heptenal	2,816	a	1,267	b	1,210	b	**	0,322
Nonanal	5,772		4,701		4,775		ns	0,681
Trans 2 nonenal	1,314		0,915		1,170		ns	0,110
Octanal	6,126		4,685		5,313		ns	1,702
Volátiles totales	115,41	a	64,40	b	57,55	b	***	201,92

Variable (ppb)	OTOÑO (LEP)						T	CME1
	O0		O35		O70			
Butanal	7,050	ab	6,012	b	7,862	a	ns	0,551
Pentanal	3,728	b	5,138	ab	7,325	a	**	2,464
Hexanal	25,968	a	22,128	ab	18,388	b	*	12,969
Trans 2 hexenal	0,358		0,333		0,438		ns	0,007
Heptanal	2,828		2,412		3,101		ns	0,436
Trans 2 heptenal	1,552		1,390		1,466		ns	0,023
Nonanal	2,951		2,673		3,058		ns	0,384
Trans 2 nonenal	nd		nd		nd		--	--
Octanal	2,434		2,007		2,458		ns	0,254
Volátiles totales	46,868		42,097		44,095		ns	39,12

Letras diferentes en distintas columnas indican efecto de Tratamiento

p<0,0001 (\*\*\*\*), p<0,001 (\*\*\*), P<0,01 (\*\*) y p<0,05 (\*)

<sup>1</sup>CME: cuadrado medio del error

#### 3.4.5.6 Ácidos grasos.

El efecto de la dieta sobre la composición de ácidos grasos de LEP reflejó el fenómeno que se había observado para las leches crudas (Tabla 3-29). En las LEP de primavera, el incremento de alfalfa en dieta indujo un aumento de los ácidos grasos n-3 y esto a su vez significó una reducción de la relación n-6/n-3, de modo que se alcanzó una relación óptima, desde el punto de vista de una leche saludable, para el tratamiento A70.

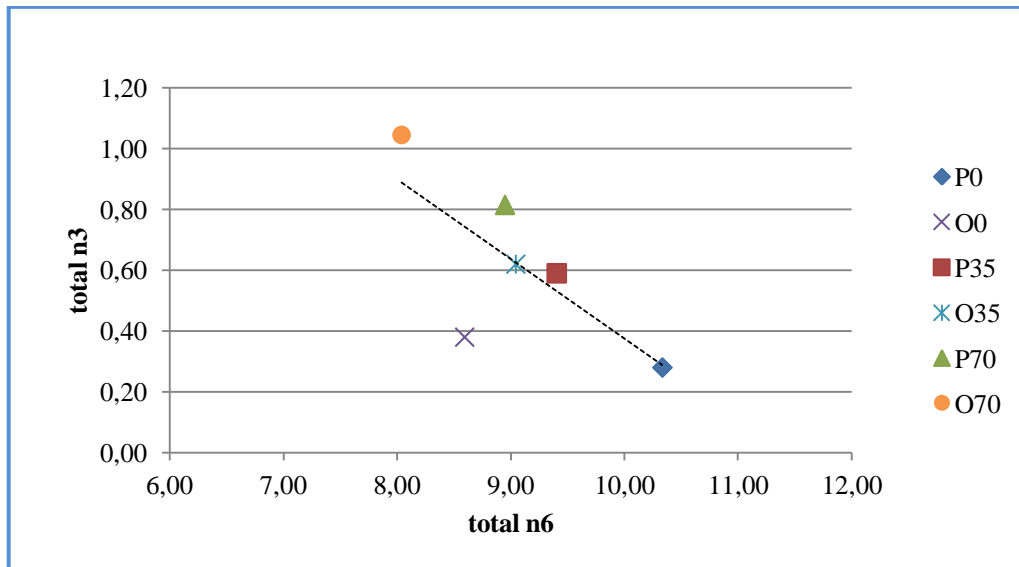


**Tabla 3-29 Composición de ácidos grasos de leche en polvo obtenida a partir de vacas alimentadas con diferentes proporciones de alfalfa en la dieta en primavera y otoño**

% ác gr, total	P0	P35	P70	O0	O35	O70	E	Trat	TxE
c4	2,93	3,035	2,97	3,175	3,145	3,14	ns	ns	ns
c6	2,045	1,97	1,945	2,29	2,205	2,015	ns	ns	ns
c8	1,345	1,16	1,135	1,435	1,34	1,175	ns	*	ns
c10	3,09	2,58	2,54	3,25	2,99	2,53	ns	**	ns
c10:1	0,245	0,21	0,195	0,29	0,29	0,24	*	ns	ns
c12	3,48	2,89	2,825	3,64	3,385	2,865	ns	**	ns
c14	11,22	10,76	10,745	11,77	11,14	10,365	ns	*	ns
c14:1	0,82	0,74	0,69	0,845	0,925	0,765	ns	ns	ns
c15	0,905	1,01	1,14	0,89	1,015	1,17	ns	**	ns
c16	25,115	27,67	27,805	27,715	28,045	29,6	*	*	ns
c16:1	1,505	1,535	1,46	1,325	1,46	1,525	ns	ns	ns
c17	0,6	0,655	0,74	0,52	0,565	0,71	**	**	ns
c18	12,84	12,685	12,64	12,06	10,91	11,17	ns	ns	ns
c18:1t	3,145	3,16	3,06	2,39	2,605	2,62	***	ns	ns
c18:1c9	20,195	19,295	19,415	18,1785	18,4975	18,6425	**	ns	ns
c18:2 n6tt	0,14	0,18	0,17	0,145	0,25	0,265	**	*	ns
c18:2 n6ct	0,13	0,22	0,205	0,17	0,225	0,255	**	***	ns
c18:2 n6tc	0,075	0,135	0,215	0,07	0,165	0,295	ns	**	ns
c18:2 n6cc	4,035	3,04	2,77	3,11	2,89	1,86	ns	ns	**
c18:3 n3	0,26	0,535	0,745	0,33	0,555	0,955	*	***	ns
c20:4n6	0,18	0,155	0,15	0,215	0,2	0,195	*	ns	ns
cla	0,9	0,91	0,89	0,635	0,74	0,815	**	ns	ns
c20:5n3	0,02	0,055	0,07	0,05	0,065	0,09	ns	*	ns
c22:4n6	0,06	0,03	0,035	0,035	0,035	0,02	ns	ns	ns
Tot Satur,	63,57	64,42	64,495	66,75	64,745	64,745	ns	ns	ns
Tot Insatur,	31,53	30,04	29,92	27,575	28,695	28,33	**	ns	ns
Tot Monoinsat,	25,91	24,935	24,82	23,03	23,77	23,795	**	ns	ns
Tot, Poliinsatur,	5,62	5,105	5,105	4,545	4,92	4,535	***	ns	*
Rel Sat/insat	2,005	2,135	2,145	2,315	2,14	2,17	ns	ns	ns
n6 total	10,34	9,41	8,95	8,60	9,05	8,04			
n3 total	0,28	0,59	0,82	0,38	0,62	1,05			
n6/n3	36,91	15,94	10,98	22,62	14,59	7,69			
18:2 n6		4,38	3,58	3,36	3,50	3,53			
18:2 n3		0,26	0,54	0,75	0,33	0,56			

p<0,0001 (\*\*\*\*), p<0,001 (\*\*\*), P<0,01 (\*\*) y p<0,05 (\*)

Tal como en leche cruda, en la Figura 3-44 se observa un aumento de 18:2 n-3 a expensas de 18:2 n-6 en las leches pastoriles con una buena correlación ( $r = -0,72$ ) mejorando de esta manera el aporte de estos ácidos grasos beneficiosos para la salud.



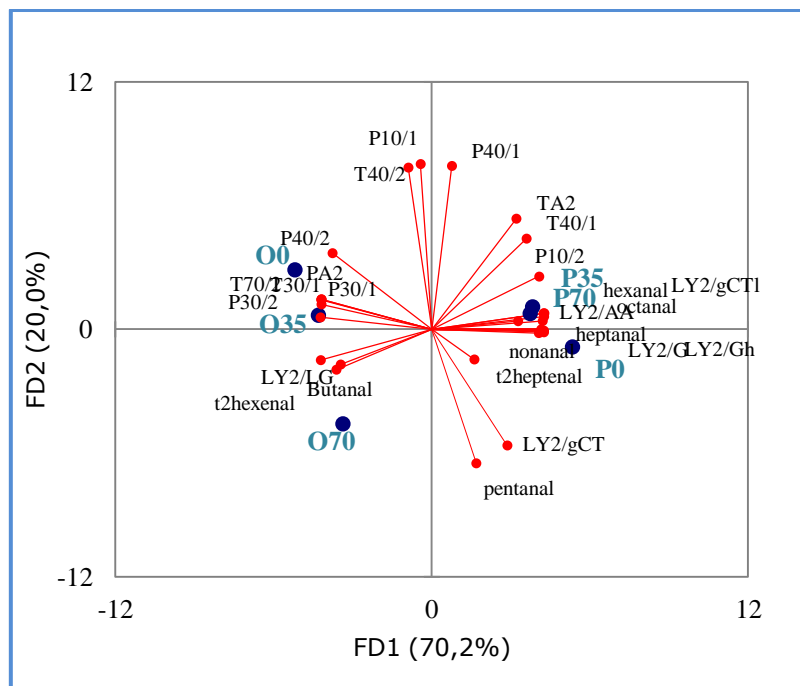
**Figura 3-44 Relación entre ácidos grasos n-6 y n-3 de LEP en primavera y otoño**

Estos resultados mostraron que el perfil de ácidos grasos de las LEP reflejó la tendencia obtenida en las leches crudas.

Se debe señalar que una mejora de dicho perfil desde el punto de vista nutricional, como lo es el aumento de los ácidos grasos n-3, aumentan a la vez la inestabilidad a la oxidación de las leches y esta inestabilidad química debe ser contrarrestada por la presencia de antioxidantes, como es el caso de las LEP de primavera con mayor contenido de alfalfa en la dieta.

#### 3.4.5.7 Tratamiento quimiométrico de datos.

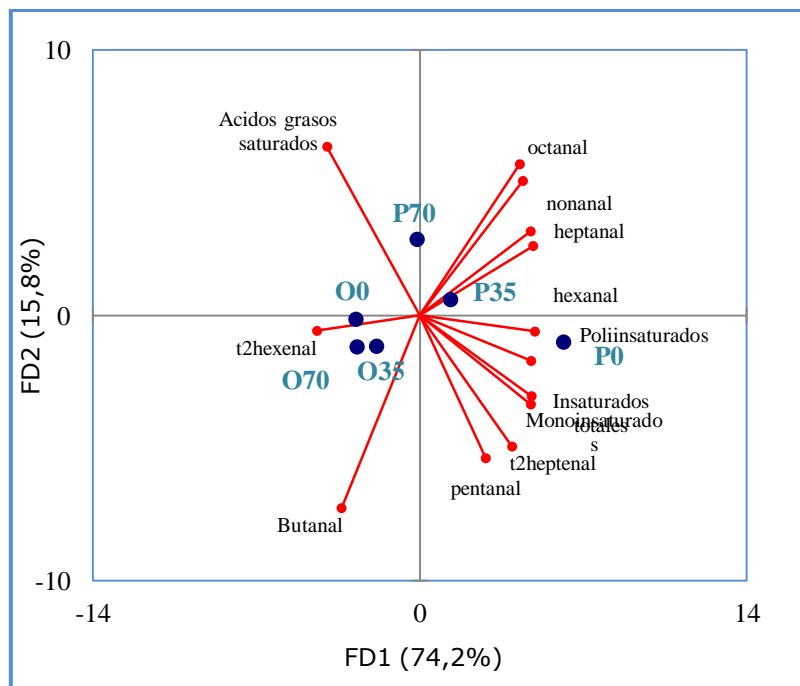
Igual que con la leche cruda, se realizó un análisis de componentes principales entre los valores de compuestos volátiles y los valores de los sensores de la nariz electrónica (Figura 3-45), con el objeto de determinar relaciones entre la medida de olor y el compuesto químico.



**Figura 3-45 AD de los compuestos volátiles y sensores de nariz electrónica en las muestras de LEP para Primavera y Otoño en los tratamientos 0, 35 y 70% alfalfa**

Al incluir los compuestos volátiles junto con los sensores de aroma, se obtuvo la separación de las leches en polvo según la estación del año a lo largo de la componente FD1 que explicó el 70,2% y no hubo una separación neta de los diferentes tratamientos dietarios. Sólo para las LEP de otoño ha sido evidente la separación del tratamiento con 70% de pastura. A su vez esta leche se asoció a trans-2-hexenal, compuesto que procede de la oxidación de los n-3.

Por otro lado se relacionaron los volátiles con los ácidos grasos especialmente aquellos parámetros indicadores de oxidación (Figura 3-46).



**Figura 3-46 AD de los compuestos volátiles y ácidos grasos en las muestras de LEP para Primavera y Otoño en los tratamientos 0, 35 y 70% alfalfa**

Las asociaciones no fueron tan evidentes como resultó para las leches crudas. No se observó una buena separación de las LEP para las diferentes estaciones ni dietas.

Nuevamente las herramientas quimiométricas permitieron observar asociaciones y relaciones entre tratamientos y variables y entre las variables entre sí aunque con menos especificidad que en la leche cruda.

#### 3.4.6 Productos Lácteos. Queso de pasta dura madurado.

Se eligió el modelo de un queso de 6 meses de madurado con el objeto de comprobar el efecto de la calidad de la leche cruda sobre los parámetros físico-químicos y sensoriales de un segundo producto lácteo.

Este modelo representa un desafío a la hipótesis de que la alimentación pastoril favorece la incorporación de antioxidantes y a su vez mejora la calidad del producto final, ya que la elaboración de quesos implica un proceso de cuajada, fermentación, concentración de materia grasa y madurado con el efecto de la adición de fermentos. De este modo, el

producto final sufre una transformación drástica respecto de la materia prima.

Para ello se elaboraron quesos a escala piloto en la planta de la EEA-Rafaela, con la leche procedente de los tres tipos de alimentación, A0, A35 y A70 y las dos estaciones del año según la Figura 2-4 (pág. 42) de materiales y métodos.

#### 3.4.6.1 Calidad de Queso.

Los parámetros de calidad lactológica no mostraron diferencias entre tratamientos ni estaciones (Tabla 3-30) excepto para la humedad en las dos estaciones.

**Tabla 3-30 Composición química del queso elaborado**

Variable	P0	P35	P70	O0	O35	O70	E	Trat	TxE
Grasa (%)	27,72	28,32	28,18	28,41	28,82	28,74	ns	ns	ns
Proteína Total (%)	31,80	31,43	31,49	31,85	31,28	31,87	ns	ns	ns
Humedad (%)	33,72	34,03	34,99	32,19	32,16	32,20	*	ns	ns
NaCl	1,04	1,12	1,18	1,22	1,23	1,21	*	ns	ns

( $p < 0,01$ )

#### 3.4.6.2 Vitamina E, beta caroteno y retinol y color.

Las tendencias observadas en leche cruda y LEP se mantienen en los quesos (Tabla 3-31) para los micronutrientes antioxidantes. Se observan mayores concentraciones de alfa tocoferol en las dietas con pasturas sólo en primavera.

El beta caroteno y consecuentemente el retinol, fueron significativamente más elevados en los quesos pastoriles que en los quesos del tratamiento sin alfalfa en ambas estaciones.

Como consecuencia del aumento del beta caroteno en el queso, se observó también un aumento significativo ( $p < 0,0001$ ) en el parámetro  $b^*$  del color en ambas estaciones. Este fenómeno se observa en la foto que ilustra los quesos obtenidos con las leches de cada tratamiento (Figura 3-47Figura 3-47 Quesos madurados de primavera de los tratamientos A0, A35 y A70) y

está descrito también en literatura (Calderón et al., 2006; Carpino et al., 2004; Martin et al., 2005b).

**Tabla 3-31 Medias y nivel de significancia obtenidos en primavera y otoño para las vitaminas y color analizadas mediante ANOVA en queso reggiano**

Variable	PRIMAVERA (Queso)					
	P0	P35	P70	T	CME <sup>1</sup>	
Alfa tocoferol (µg/g queso)	1,9272 b	3,0796 a	3,7784 a	****	0,349	
Gama tocoferol (µg/g queso)	0,3134 a	0,2164 b	0,1611 b	****	0,003	
Beta caroteno (µg/g queso)	0,0834 c	0,5545 b	0,7006 a	****	0,011	
Retinol (µg/g queso)	2,3141 b	4,358 a	3,8595 a	****	0,515	
L*	85,901	84,738	84,981	ns	1,074	
a*	4,1113 b	6,4313 a	5,9667 a	****	0,311	
b*	21,117 b	27,612 a	28,92 a	****	3,203	

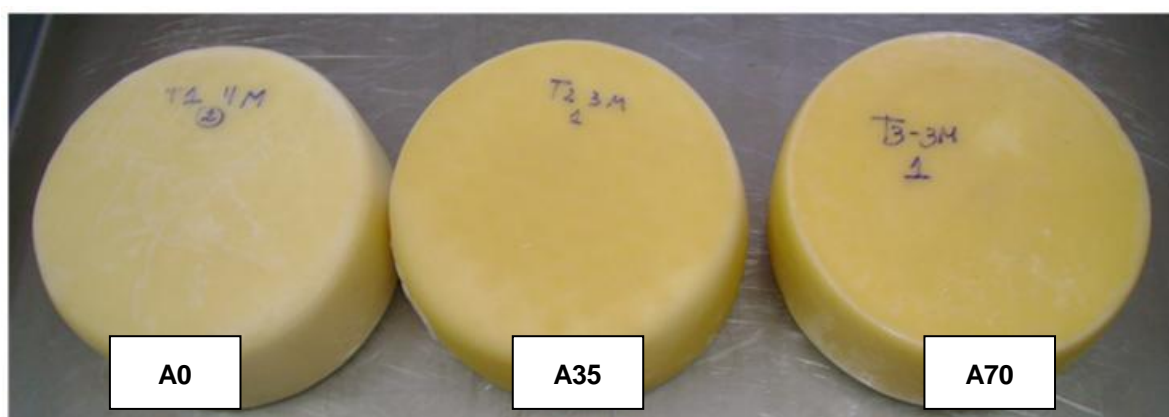
  

Variable	OTOÑO (Queso)					
	O0	O35	O70	T	CME <sup>1</sup>	
Alfa tocoferol (µg/g queso)	1,1832	1,8624	1,6997	ns	0,559	
Gama tocoferol (µg/g queso)	0,3651 a	0,1988 b	0,1431 c	****	0,002	
Beta caroteno (µg/g queso)	0,229 c	0,6235 b	0,8578 a	****	0,034	
Retinol (µg/g queso)	2,542 b	4,4484 a	4,9543 a	****	0,580	
L*	85,829	84,884	84,361	ns	1,298	
a*	3,4575 b	5,1975 a	5,4806 a	****	0,344	
b*	24,844 B	30,939 a	32,066 a	****	1,897	

Letras diferentes en distintas columnas indican efecto de Tratamiento

p<0,0001 (\*\*\*\*), p<0,001 (\*\*\*), P<0,01 (\*\*) y p<0,05 (\*)

<sup>1</sup>CME: cuadrado medio del error



**Figura 3-47 Quesos madurados de primavera de los tratamientos A0, A35 y A70**

### 3.4.7 Conclusiones del ensayo.

La inclusión de pastura de alfalfa en cantidades crecientes en la dieta de las vacas lecheras produjo por un lado, una menor concentración de determinados macronutrientes (GB y PT), un aumento de ciertos ácidos grasos esenciales y benéficos para la salud, un mejor perfil de vitaminas liposolubles y pigmentos naturales, incremento del poder antioxidante asociado a una menor presencia de compuestos volátiles indicadores de oxidación y la potencial mejora del perfil sensorial. Estos cambios se orientaron, en gran medida, hacia un sentido favorable considerando aspectos nutricionales y tecnológicos. Posiblemente la variabilidad de la calidad de la pastura (particularmente en primavera) limitó algunos cambios esperados.

Además, es interesante resaltar que en general las herramientas estadísticas hicieron posible la correcta separación en cuanto a los porcentajes altos (35 y 70%) y 0% de alfalfa en la dieta. El tratamiento quimiométrico de los datos permitió encontrar relaciones entre variables asociadas a la calidad de la leche cruda obtenida con diferentes proporciones de alfalfa en la dieta.

De acuerdo a los resultados expuestos hasta este punto, se propone que con aproximadamente un 50% de pastura en la dieta (ya sea pastoreo directo, corte y mezcla en raciones, etc,) se puede obtener leche con alto valor de antioxidantes y características diferenciales respecto a la obtenida por alimentación exclusiva en corrales, lo cual puede ser utilizado a nivel productivo mediante prácticas agronómicas para valorizar las leches con mayores niveles en vitaminas liposolubles y ácidos grasos potencialmente funcionales

Con estos resultados podemos concluir que la alimentación animal constituye una herramienta muy importante para modificar la calidad en micronutrientes de la leche cruda, que se traduce en productos lácteos como la leche en polvo y quesos que podrían ser diferenciados y valorizados por la presencia de estas moléculas.

### **3.5 Efecto de la dieta en la vida útil de leche entera en polvo.**

El objetivo de este ensayo fue continuar el estudio de las combinaciones anti y prooxidantes presentes en la leche respecto al rol protector de los antioxidantes naturales que se encuentran en los alimentos y su implicancia sobre la vida útil (bioquímica y sensorial) de la leche en polvo elaborada, la presencia de compuestos bioactivos y su funcionalidad en el producto.

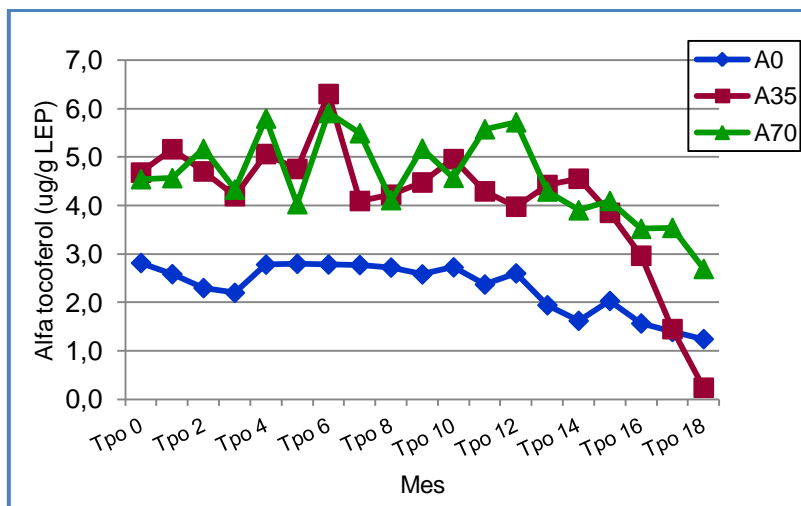
La calidad inicial de la materia prima es un factor fundamental para determinar la calidad de la leche en polvo. También hay otros factores que afectan la vida útil tales como las variables del proceso (temperaturas y tiempos de calentamiento), calidad del aire, contenido de humedad, material de empaque, exposición al oxígeno, adición de antioxidantes, exposición a la luz y temperatura de almacenamiento (Lloyd et al., 2009; Muir, 2011).

Se trabajó sobre las muestras de leche en polvo del ensayo de primavera. Las mismas fueron fraccionadas, envasadas con atmósfera modificada y conservadas a 20 °C durante 18 meses, como se indica en la sección de materiales y métodos.

#### **3.5.1 Vitamina E.**

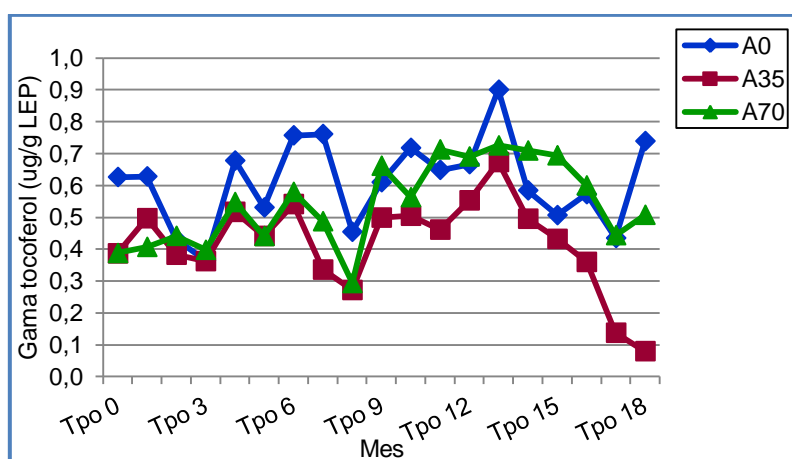
Como se indicó en el capítulo anterior, el alfa tocoferol de la leche en polvo (Figura 3-48) fue significativamente mayor para los tratamientos A35 y A70 ( $p < 0,0001$ ) que para A0. En el análisis de esta vitamina en función del tiempo se observó que durante el primer año disminuyó levemente ( $p < 0,01$ ) y que a partir de los 16 meses disminuyó significativamente a un ritmo más acelerado ( $p < 0,001$ ).





**Figura 3-48 Concentración de alfa tocoferol en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).**

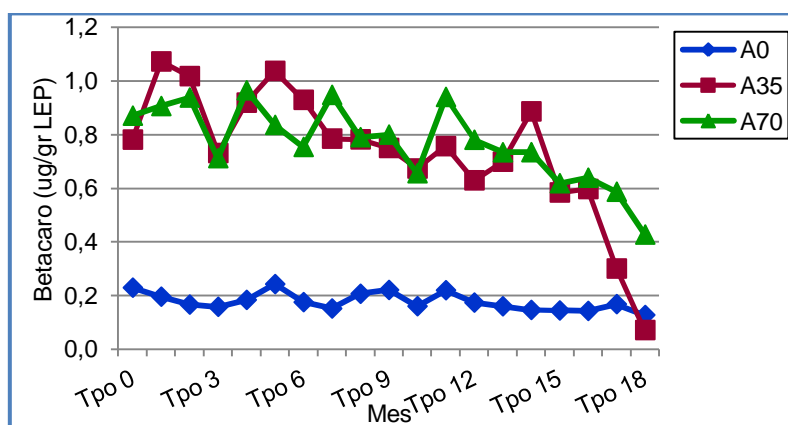
En el caso del gama-tocoferol (Figura 3-49), la concentración inicial fue mayor para el tratamiento A0 a causa de los derivados de soja presentes en la alimentación. Se observó cierta fluctuación pero sin una tendencia definida. Cabe destacar también que la concentración de este isómero es prácticamente la décima parte de la del isómero alfa, ya que los mamíferos incorporan este último isómero en mayor cantidad, como se discutió en las secciones anteriores.



**Figura 3-49 Concentración de gama tocoferol en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).**

### 3.5.2 Beta caroteno.

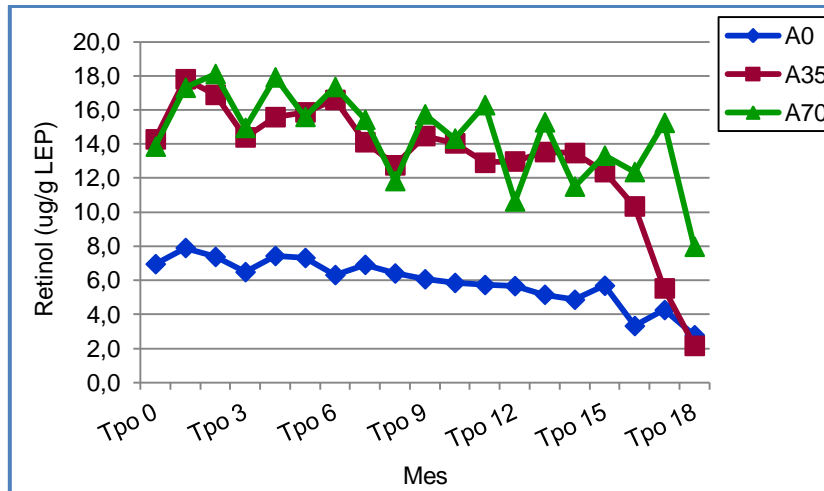
En los ensayos anteriores se demostró que las dietas pastoriles aportaron concentraciones significativamente mayores de este compuesto ( $p < 0,00001$ ) a la leche cruda respecto las dietas de silo y esto se mantuvo en la leche en polvo. Cuando se analizó el comportamiento durante los 18 meses de vida útil (Figura 3-50), se observó que hasta el mes 12 hubo una disminución gradual que se hizo significativamente distinta en el mes 17 y 18 para los tratamientos A35 y A70 ( $p < 0,001$ ). En el tratamiento A0 no se observó esta disminución, posiblemente debido a que los valores de beta caroteno ya se encuentran en concentraciones basales y por lo tanto no sería evidente la degradación de este compuesto.



**Figura 3-50 Concentración de beta caroteno en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).**

### 3.5.3 Retinol.

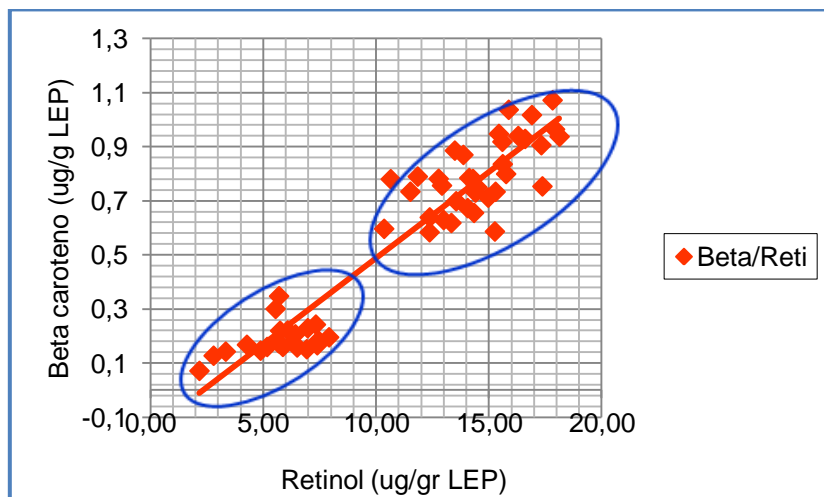
El comportamiento del retinol fue similar al beta caroteno, en donde los tratamientos se diferenciaron bien, observándose dos grupos, A35 y A70 mayores que A0 ( $p < 0,0001$ ). Respecto a la concentración en función del tiempo, durante el primer año bajó gradualmente, hasta que en el mes 17 se observó una disminución brusca. En este caso, los valores de A0, además de los de A35 y A70 también disminuyeron en forma significativa ( $p < 0,001$ ) como se ilustra en la Figura 3-51.



**Figura 3-51 Concentración de retinol en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).**

Como se observa en la Figura 3-52, se obtuvo una buena correlación entre la concentración de beta caroteno y de retinol en la leche en polvo durante la vida útil (0,944), similar a la observada en la leche fluida.

Esto indica que ambos compuestos se comportaron de manera similar, obteniendo dos grupos netamente separados por las dietas con pastura (superior) y la que no la contenía (inferior).



**Figura 3-52 Relación entre la concentración de beta caroteno y retinol en la leche en polvo.**

Cabe señalar que la concentración promedio de retinol natural en las leches pastoriles (A35 y A70) durante los primeros 12 meses de

almacenamiento, fue de 1500  $\mu$ gramos por cada 100 gramos de leche en polvo.

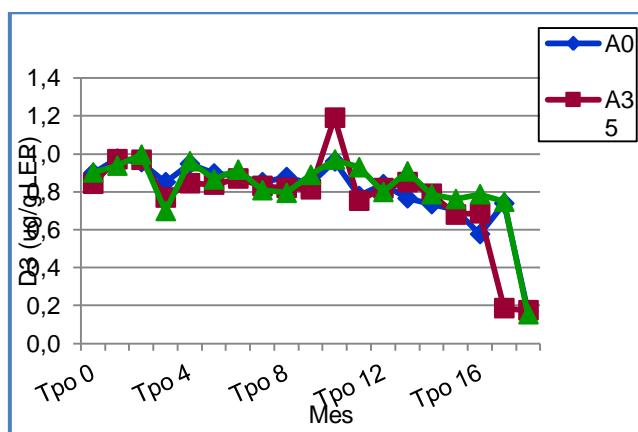
Esta concentración duplica la concentración indicada en las leches industriales fortificadas (606  $\mu$ g/100 g de LEP), por lo cual se puede considerar que las leches en polvo de estos ensayos se encuentran naturalmente fortificadas con vitamina A en las dosis utilizadas comercialmente.

### 3.5.4 Vitamina D<sub>3</sub>

Los niveles de esta vitamina fueron similares en los tres tratamientos, y sufrieron una degradación gradual hasta los 16 meses de almacenamiento, con un deterioro notable en los últimos dos meses, al igual que las vitaminas que se discutieron anteriormente (Figura 3-53).

Los niveles promedio se mantuvieron en alrededor de 9  $\mu$ gramos cada 100 g de LEP, superando ligeramente la dosis de fortificación indicada para leches comerciales.

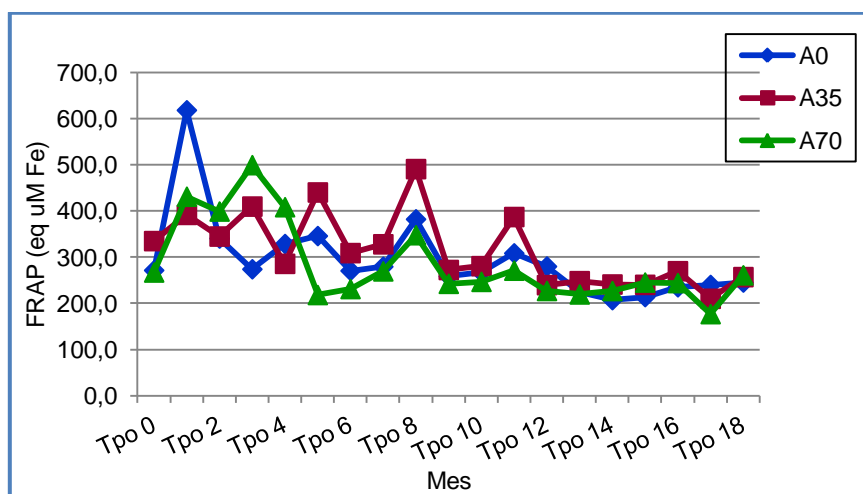
La ventaja de estas leches es que la vitamina D<sub>3</sub> natural corresponde al isómero biológicamente activo y puede aprovecharse en términos de plantear productos lácteos saludables.



**Figura 3-53 Concentración de D<sub>3</sub> en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa).**

### 3.5.5 Capacidad antioxidante.

No se observaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante de las leches medidas por FRAP. Este parámetro disminuyó a través del tiempo de la misma manera para todos los tratamientos ( $p < 0.0001$ ). La disminución fue gradual hasta los 12 meses y luego se mantuvo relativamente constante, como se observa en la (Figura 3-54). Los valores encontrados en el tiempo inicial fueron en promedio de  $342 \mu\text{M Fe}^{2+}$ , valor que bajó a niveles promedio de  $235 \mu\text{M Fe}^{2+}$  a partir del año de conservación.

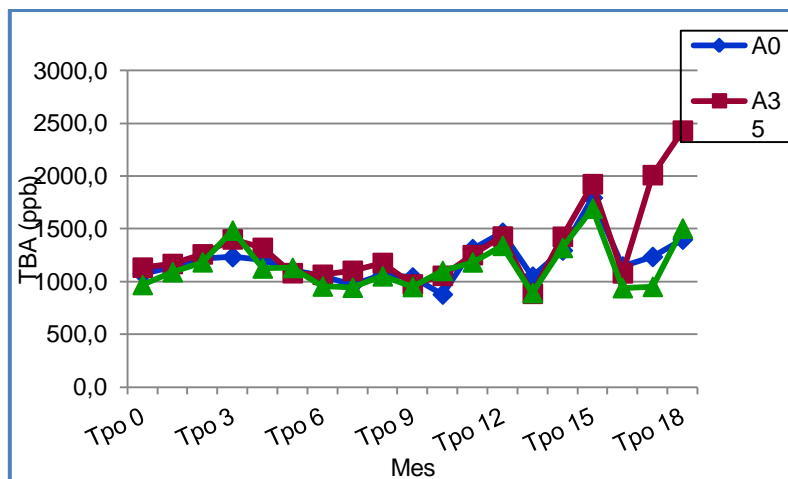


**Figura 3-54 Valor de FRAP en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa)**

La capacidad antioxidante de las LEP de este ensayo podría deberse a los productos de Maillard generados por combinación de lactosa y proteínas. Estos productos y algunos derivados de los mismos, poseen actividad antioxidante y reductora (Oh et al., 2013). Considerando que las LEP sufrieron calentamiento durante la pasteurización, evaporación y secado spray en la planta piloto, la capacidad antioxidante de las mismas no estaría relacionada con la dieta de los animales sino con el procesamiento y por lo tanto no se esperarían diferencias atribuibles a la dieta de las vacas.

### 3.5.6 Oxidación.

La oxidación lipídica medida por TBARS, aumentó en todos los tratamientos en forma similar (Figura 3-55).



**Figura 3-55 Valor de TBARS en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa)**

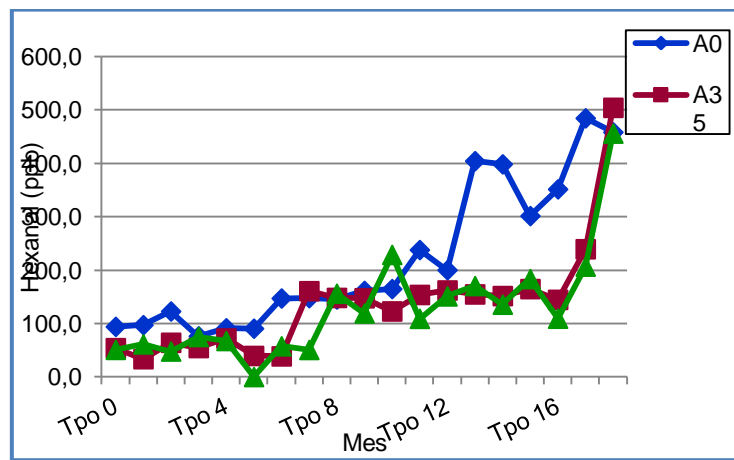
Fenaille et al. (2001) compararon varias metodologías para medir el malondialdehído formado como producto secundario en la oxidación de los lípidos (HPLC con detección UV, GC-MS y espectroscopía). Para el caso de la medición por espectroscopía establecieron que en el caso particular de los lácteos, hay un pico de absorbancia a 450 nm que corresponde a productos amarillos que interfieren con la medición a 532 nm e indicaron que podían ser otros productos de la oxidación de los lípidos tales como otros aldehídos, cetonas, etc. Los valores de TBA obtenidos por estos autores para la medición por espectroscopía fueron entre 800 y 1500 ppb, similares a los de nuestros ensayos. Por otro lado, Angulo et al. (1997) midieron la oxidación lipídica en muestras comerciales durante un año, con variaciones en la forma de conservación. En general los valores iniciales fueron de 0,2  $\mu\text{mol}/100\text{g}$  y aumentaron en las distintas condiciones llegando hasta 11,1  $\mu\text{mol}/100\text{g}$  en los casos más extremos para leche en polvo descremada. En el caso de la leche entera en polvo, los valores máximos de TBARS fueron 2,2  $\mu\text{mol}/100\text{g}$ . Estos valores son similares a los obtenidos en LEP para los registros de los tiempos finales presente ensayo de vida útil.

La oxidación de LEP es una continuación de la oxidación iniciada en la materia prima (Hedegaard et al., 2006; Karatapanis et al., 2006). Como se señaló en la introducción, el proceso es autocatalítico y la reacción de oxidación prosigue aun en empaques impermeables al oxígeno (Lillard,

1978). Aún en un producto como la leche en polvo con baja actividad de agua ( $a_w$ ), la oxidación continúa porque existe migración de compuestos hidrofóbicos que no dependen de la movilidad del agua (Thomas et al., 2004). También el efecto del calentamiento, como se señaló en el punto anterior, genera compuestos de oxidación.

### 3.5.7 Hexanal.

Como se observó en el capítulo anterior, el valor de hexanal en las LEP del tratamiento A0 fue mayor ( $p < 0,0001$ ) que los valores de A35 y A70 y se mantuvieron constantes hasta aproximadamente los 6 meses de almacenamiento. A partir de este tiempo A0 aumentó en mayor proporción que A35 y A70 ( $p < 0,0001$ ). Las LEP A35 y A70 se mantuvieron constantes entre los meses 8 y 16, en valores un poco más elevados que al inicio del almacenamiento y finalmente, la concentración de este aldehído aumentó considerablemente en los últimos dos meses como se ilustra en la Figura 3-56.



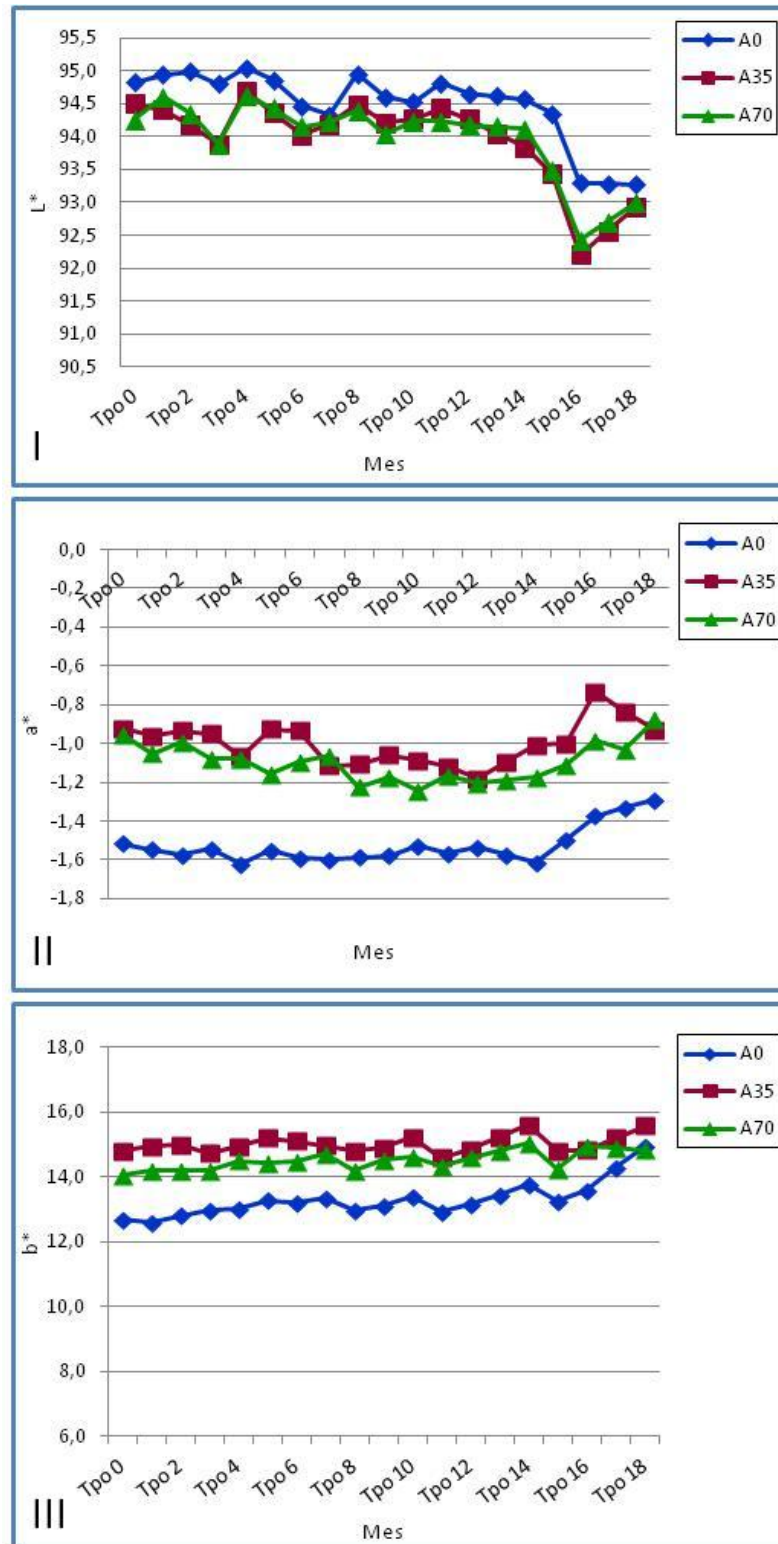
**Figura 3-56 Valor de Hexanal en LEP de los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa)**

### 3.5.8 Color.

Las leches en polvo de los tres tratamientos se diferenciaron entre sí por el color. Las LEP del tratamiento A0 mostraron valores de  $L^*$  mayores y de  $a^*$  y  $b^*$  menores que los de A35 y A70. Se observó que con el tiempo de almacenamiento y hasta los 14 meses no hubo variación del valor  $L^*$ . A los

15 meses A0 comenzó a disminuir y a los 16 meses la disminución fue más abrupta. A su vez, A35 y A70 también disminuyeron significativamente ( $p < 0,0001$ ) a partir de los 16 meses (Figura 3-57).





**Figura 3-57 Evolución de L\* (I), a\* (II) y b\* (III) durante la vida útil de LEP para los tratamientos A0 (0% alfalfa), A35 (35% alfalfa) y A70 (70% alfalfa)**

Para el valor a\* se observó una tendencia a aumentar ( $p < 0,05$ ) en los últimos meses del ensayo de vida útil (16-18), a la vez que disminuyó el L\*

de modo que el resultado visual fue el de LEP más oscuras en los tres tratamientos durante los últimos muestreos.

Esto no ocurre con el valor  $b^*$  en donde no se observan modificaciones con el tiempo de almacenamiento. Tal como se discutió en el capítulo anterior, el valor  $b^*$  se correlaciona positivamente con la concentración de beta caroteno y las muestras A35 y A70 son mayores. También  $L^*$  es mayor en las muestras A0 porque son más claras. Estas diferencias se observan durante todo el tiempo de almacenamiento, disminuyendo o aumentando de la misma manera para todos los tratamientos (no hay interacción entre tratamientos).

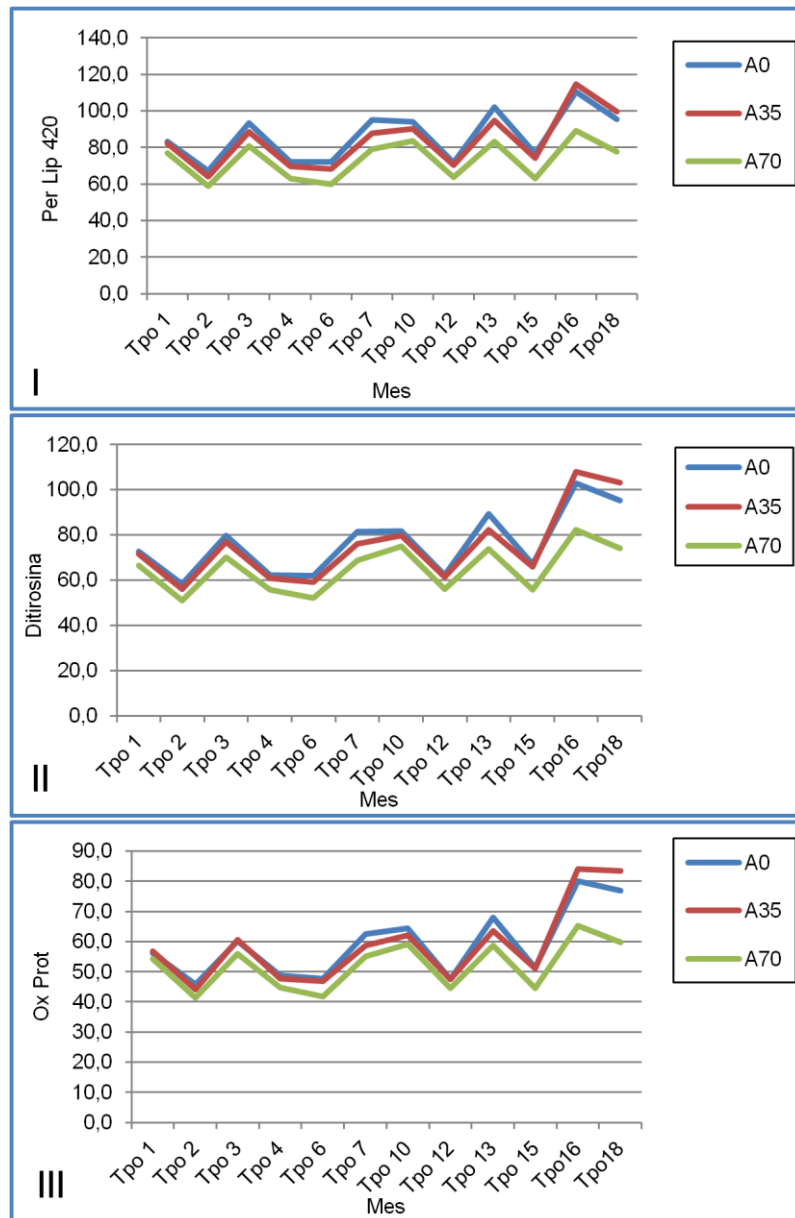
### 3.5.9 Uso de Fluorescencia de fase frontal para la determinación de calidad de leche en polvo.

Aunque los análisis fisicoquímicos o sensoriales son técnicas adecuadas, conllevan tiempo y reactivos químicos. Para la industria de los alimentos, es interesante desarrollar técnicas no invasivas ni destructivas de detección de oxidación (Botosoa et al., 2013) que las torne adecuadas para usar on-line en el procesamiento en las plantas alimentarias (Rouissi et al., 2008). En los productos lácteos, principalmente la riboflavina, la vitamina A, los aminoácidos aromáticos, los productos de reacción de Maillard, NADPH, las porfirinas, las clorofilas y los productos de oxidación de los lípidos son los que producen la emisión por fluorescencia (Andersen and Mortensen, 2008).

Se han propuesto distintas combinaciones de excitación/emisión para determinar el efecto del procesamiento de los productos lácteos tales como intensidad del tratamiento térmico, modificaciones en la estructura, cambios producidos por la inducción de la oxidación por luz, etc. con variados resultados. En general para determinar el grado de tratamiento térmico son muy contradictorios los resultados, pero en lo que se refiere a la oxidación por luz es un poco más efectivo.

En el transcurso del tiempo el comportamiento de las muestras medidas por fluorescencia de fase frontal durante el almacenamiento mostró diferencias significativas para los diferentes tratamientos y entre ellos.

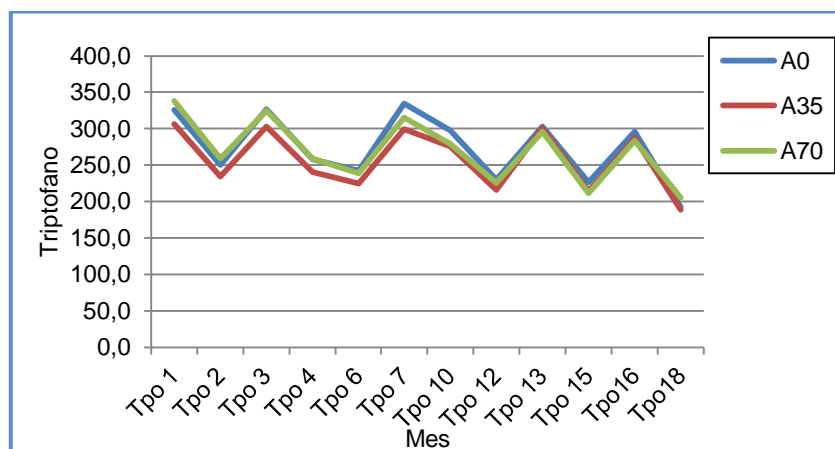
Como se observa en la Figura 3-58, las mediciones correspondientes a la región de peróxidos lipídicos (ex 340- en 420 nm), producción de ditirosina (ex 350- en 430 nm) y oxidación proteica (ex 350- en 450 nm), aumentaron en el transcurso del almacenamiento, con valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ) para el tratamiento A70 respecto de A0 y A35.



**Figura 3-58 Fluorescencia por fase frontal para variables de oxidación en LEP. I: Peróxidos lipídicos a 420nm, II: Ditirosina, III: Oxidación de Proteínas**

Un parámetro de deterioro proteico fue la pérdida de la señal de triptófano (ex 286- en 326 nm) (Figura 3-59), que disminuyó en todos los tratamientos

a lo largo del almacenamiento como también reportaron (Andersen and Mortensen, 2008).

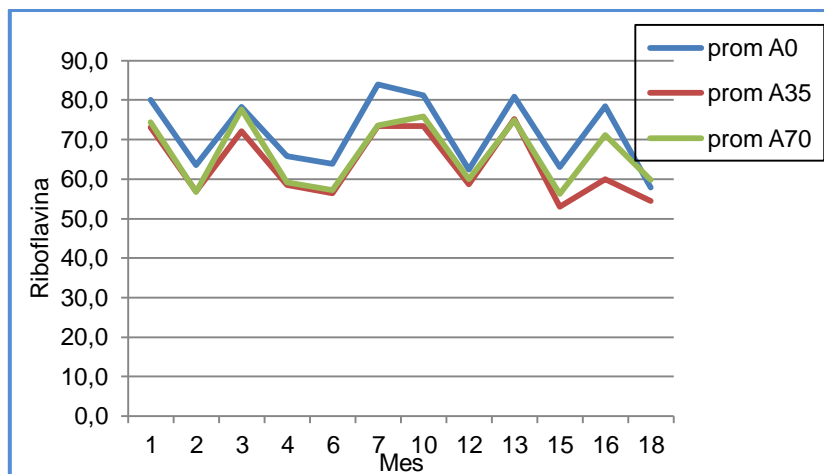


**Figura 3-59 Fluorescencia por fase frontal para Tryptofano**

Este trabajo muestra por primera vez el uso de la metodología no destructiva de determinación de fluorescencia de fase frontal para el seguimiento de la vida útil de leche en polvo.

Algunos parámetros como la vitamina E, no pueden medirse por esta metodología por la interferencia que presenta el triptófano. Ambos compuestos tienen máximos de excitación y emisión muy cercanos (ex 296- em 330 y ex 286- em 326 nm, para vitamina E y triptófano, respectivamente), y por lo tanto la presencia del mayoritario -en el caso de LEP las proteínas- enmascara al minoritario (tocoferol).

Sin embargo se pudo estimar la riboflavina (ex 445- em 520 nm) en los tres tratamientos (Figura 3-60), la cual deberá compararse con el método tradicional a fin de determinar la exactitud de estimación por esta metodología.

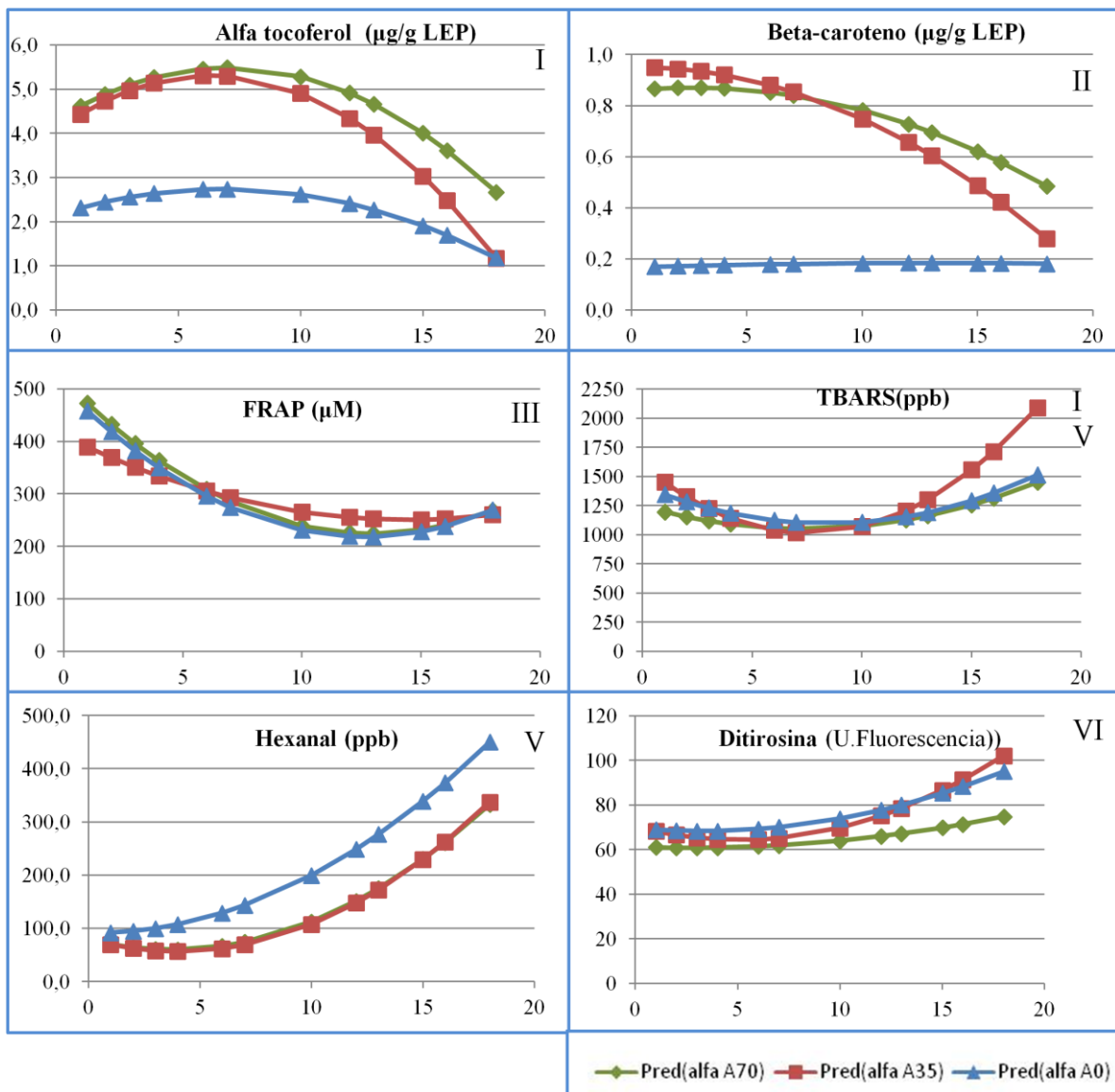


**Figura 3-60 Fluorescencia por fase frontal para Riboflavina**

Una aplicación interesante es que se pudo seguir el deterioro oxidativo de las muestras a lo largo del almacenamiento y como se muestra en los puntos siguientes, se pudo relacionar la fluorimetría con otros parámetros bioquímicos y sensoriales instrumentales de indicadores de oxidación.

### 3.5.10 Balance antioxidante.

La siguiente Figura 3-61, muestra los valores predichos mediante la aplicación de un modelo de regresión cuadrática para tres indicadores de actividad antioxidante (alfa tocoferol, beta caroteno y actividad antioxidante total por FRAP) y tres indicadores de oxidación (TBARS, hexanal de oxidación de lípidos y ditirosina por fluorescencia frontal como indicador de oxidación proteica). Como se observa en los paneles A y B el alfa tocoferol y beta caroteno de las LEP de los tres tratamientos se deterioraron con cinéticas similares en el transcurso del tiempo de almacenamiento para los tratamientos A35 y A70. Al mismo tiempo las ecuaciones mostraron una cinética inversa a la inducción de oxidación medida por los tres parámetros.



**Figura 3-61 Modelos de regresión cuadrática para I: alfa tocoferol; II: beta caroteno; III: FRAP; IV: TBARS; V: Hexanal y VI: Ditirosina**

Se compararon así los valores de alfa tocoferol con la inducción de oxidación. Se podría concluir que valores de alfa tocoferol mayores a 4 µg/g de leche mantendrían la oxidación en niveles inferiores a 1200 ppb TBARS y menores a 200 ppb de hexanal.

Esta relación se daría en condiciones teóricas según el modelo hasta los 13 meses en las leches de A35 y A70, mientras que en las A0, a los 10 meses ya se alcanzan valores de hexanal superiores a los 200 ppb. El modelo también muestra que la actividad antioxidante total se vio afectada por igual en los tres tratamientos, por lo tanto la presencia de antioxidantes

hidrofílicos (la mayoría de los que aportan al poder reductor del FRAP) no sería de gran aporte para la estabilidad oxidativa de la leche en polvo.

También predice que las leches del tratamiento A35 tienen menor estabilidad en el tiempo final de vida útil que las leches de A70, con lo cual, se refuerza la teoría de que un aporte de pastura de al menos 50% en la dieta, podría ayudar a alcanzar los niveles de estabilidad oxidativa y calidad integral en las leches y productos derivados.

En la Tabla 3-32, si se observan los mínimos de las funciones predichas para cada parámetro indicador de oxidación seleccionado se podría concluir que la producción de hexanal es un evento temprano que indica un aumento del deterioro oxidativo a partir del primer mes en leche A0 y de los 4 meses para leches pastoriles, mientras que el TBA, mayor indicador de degradación lipídica general, aumenta a partir de los 8 meses aproximadamente (un poco antes para leches pastoriles, probablemente por su mayor contenido en ácidos grasos con más de dos insaturaciones).

**Tabla 3-32 Ecuaciones de modelización de la oxidación para las leches A0, A35 y A70**

A0	A35	A70
TBA=1416,3-76,5*t+4,5*t <sup>2</sup> Mín= 8,5 meses	TBA=1590-152,2*t+10*t <sup>2</sup> Mín= 7,6 meses	TBA=1244,6-52,8*t+3,6*t <sup>2</sup> Mín= 7,6 meses
Hexanal=91,3-0,5*t+1,1*t <sup>2</sup> Mín= 0,2 meses	Hexanal=80-11,6*t+1,4*t <sup>2</sup> Mín= 4,1 meses	Hexanal=79,1-10,1*t+1,3*t <sup>2</sup> Mín= 3.9 meses
Ditirosina=69,6-0,8*t+0,1*t <sup>2</sup> Mín= 4 meses	Ditirosina=70,3-2,3*t+0,2*t <sup>2</sup> Mín= 5.75 meses	Ditirosina=61,3-0,3*t+0,06*t <sup>2</sup> Mín= 2.5 meses

Por otro lado la oxidación proteica sería un evento relativamente temprano en la leche en polvo, anterior al incremento de TBARS, aunque la velocidad de incremento sería menor en el tiempo, aunque ello no significa que sea un evento de menor importancia. Este fenómeno podría estar relacionado con la autooxidación de la riboflavina, que genera oxígeno singulete, altamente inestable, aunque este fenómeno se da con mayor frecuencia en relación con la iluminación de las leches, y estas muestras fueron conservadas en oscuridad. Como se observó para riboflavina medida





variables alfa tocoferol, beta caroteno y retinol, que a su vez correlacionaron negativamente con el tiempo de almacenamiento (pendientes negativas).

El tratamiento A35, se ubicó cerca del A70 y fue explicado por mayores valores de  $a^*$  y  $b^*$ :

Los parámetros asociados a una correlación positiva en el tiempo fueron el hexanal, la oxidación de proteínas por fluorescencia (medidas a oxidación de proteínas a ex 350- em 450 nm, ditirosina a ex 350- em 430 nm), TBARS, peroxidación lipídica por fluorescencia (peróxidos lipídicos ex 340- em 420 nm, peróxidos lipídicos de gatellier ex 386- em 475, perlip ex 360- em 435 nm) y algunos sensores de olor (nariz electrónica).

Nuevamente, la aplicación de métodos quimiométricos de análisis de variables, permitió diferenciar las leches de los tres tratamientos y el efecto del tiempo de almacenamiento.

Las correlaciones entre las diferentes variables entre sí y con el tiempo y tratamientos se ilustran en el anexo. Pero podemos mencionar por ejemplo una alta correlación positiva entre el alfa tocoferol con el beta caroteno ( $R=0,864$ ) y con el retinol ( $R=0,863$ ) y una correlación negativa con el hexanal ( $R=-0,636$ ) y con la ditirosina ( $R= -5,21$ ), reforzando los modelos de regresión cuadrática que describimos en el punto anterior. Además se observó una alta correlación positiva con los sensores que fueron negativos para el tiempo.

El comportamiento de las muestras en el tiempo correlacionó mayormente con los valores de olor, negativos para los sensores LY2G; LY2AA; LY2Gh y LY2gCTI con valores de  $R=-0,612$ ;  $-0,612$   $-0,603$  y  $-0,776$  respectivamente y positivamente con T301; T702; P301 y P302 con  $R= 0,479$ ;  $0,489$ ;  $0,469$ ;  $0,456$  respectivamente.

Una relación muy interesante que surge de este estudio es que el hexanal presentó correlaciones positivas con medidas de fluorescencia indicadoras de oxidación: perlip435 (medida a 435 mn emisión); oxprot (medida a 450 nm de emisión) y ditirosina con  $R=0,461$ ;  $0,452$  y  $0,456$  respectivamente: También correlacionó en forma negativa con los sensores LY2G ( $R= -0,776$ );

LY2AA (R= -0,787); LY2Gh (R= -0,779); y positiva con los sensores indicadores de tiempo de almacenamiento: LY2gCTI (R= 0,797); LY2gCT (R= 0,560); T301 (R= 0,612); T702 (R= 0,655); PA2 (R= 0,479); P301 (R= 0,694); P302 (R= 0,707).

En general se puede concluir que algunas medidas no destructivas como la fluorescencia de fase frontal y el olor por medio de una nariz electrónica podrían usarse para clasificar LEP de acuerdo a su estabilidad oxidativa.

### 3.5.12 Ensayo de discriminación de muestras.

El comportamiento oxidativo de las leches en polvo en general se mantuvo en valores relativamente estables durante el primer año de almacenamiento y el disparo de oxidación fue más evidente en los últimos seis meses.

Para tratar de identificar factores característicos que describan el efecto pastura, por medio de la diferenciación de las leches según la dieta y los parámetros de calidad de LEP, se realizó un análisis discriminante (AD) con todas las variables bioquímicas que demostraron ser significativamente distintas entre tratamientos (dietas) y también en el tiempo.

La Figura 3-63 muestra el resultado del AD de las muestras de leche en polvo en sus respectivos tratamientos evaluados entre 0 y 12 meses. El método de selección por pasos (*stepwise*) dejó las variables gama tocoferol, beta caroteno, retinol, L\*, a\* y hexanal como las de mayor peso para diferenciar los tratamientos.

Se obtuvieron dos funciones discriminantes canónicas estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) que explican, FD1 el 98,2% de la varianza total y FD2 el 1,8% restante. Estas funciones permitieron clasificar a cada muestra en su grupo de pertenencia (tratamientos) en un 81,0% de los casos originales y en un 76,8% luego de la validación cruzada.

Se obtuvieron las siguientes funciones discriminantes (coeficientes estandarizados):

$$DF1 = -0,373\text{gama} + 0,501\text{beta} + 0,472\text{retinol} - 0,424L^* + 0,486a^* + 0,517\text{hexanal}$$

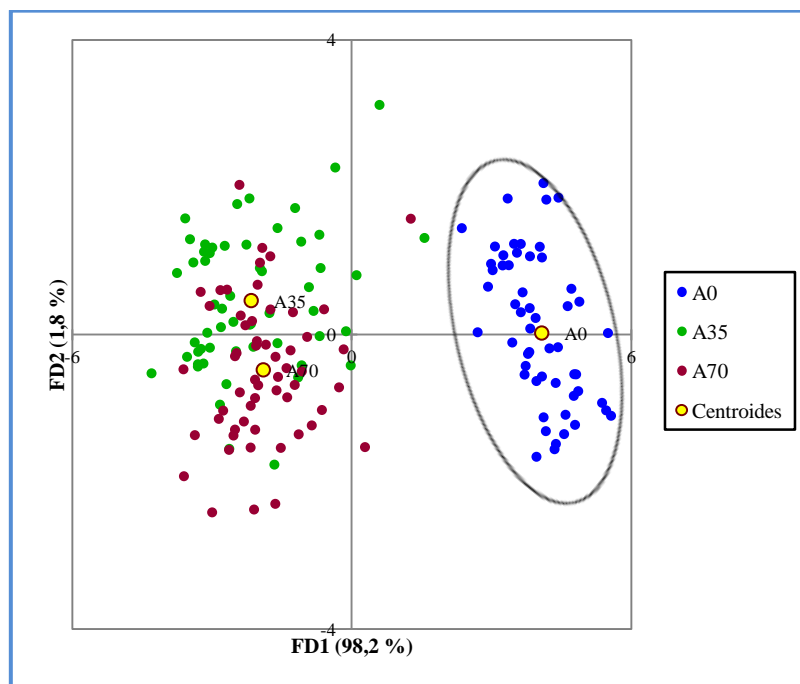
$$DF2 = -0,263\text{gama} - 0,286\text{beta} - 0,539\text{retinol} + 0,448L^* + 0,959a^* + 0,182\text{hexanal}$$

Consecuentemente, se pueden establecer las siguientes funciones de Fischer (Tabla 3-33)

**Tabla 3-33 Funciones discriminantes lineales de Fisher evaluadas por tratamiento entre 0 y 12 meses.**

	Tratamiento		
	A0	A35	A70
Gama tocoferol	1,659	-1,008	-0,651
Beta caroteno	-4,425	2,104	2,321
Retinol	-3,337	1,226	2,111
L*	2,773	-1,218	-1,555
a*	-3,614	2,891	0,723
Hexanal	-1,675	0,981	0,694
Constante	-9,394	-3,552	-3,032

En la Figura 3-63 se observan dos grupos claramente diferenciados en donde A35 y A70 se comportan de manera similar, debido a que presentan valores elevados de beta caroteno, retinol y a\*. A su vez A0 se diferenció porque presentó menores valores de estas variables y mayores de L\*.



**Figura 3-63 AD de las muestras de leche en polvo evaluadas de 0 a 12 meses para los tratamientos A0, A35 y A70**

Para el tiempo restante de vida útil (13 y 18 meses) se realizó el AD de las muestras de leche en polvo en sus respectivos tratamientos (Figura 3-64). En este caso, el método de selección por pasos (*stepwise*) optó por las variables TBA, gama tocoferol, retinol, a\* y hexanal como las de mayor peso para diferenciar los tratamientos.

Se obtuvieron dos funciones discriminantes canónicas estadísticamente significativas ( $p < 0.003$ ) que explican, FD1 el 92,1% de la varianza total y FD2 el 7,9% restante. Estas funciones permitieron clasificar a cada muestra en su grupo de pertenencia (tratamientos) en un 84,7% de los casos originales y en un 81,9% luego de la validación cruzada.

Se obtuvieron las siguientes funciones discriminantes (coeficientes estandarizados):

$$DF1 = 0,533TBA - 0,380\text{gamatoco} + 0,632\text{retinol} + 0,663a^* - 0,542\text{hexanal}$$

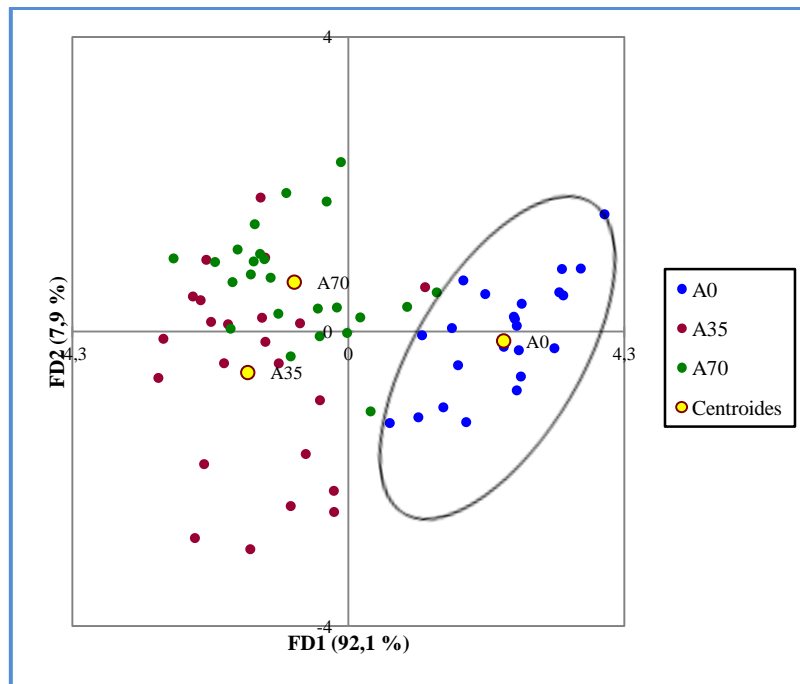
$$DF2 = -0,077TBA + 0,638\text{gamatoco} + 0,660\text{retinol} - 0,001a^* + 0,267\text{hexanal}$$

Consecuentemente, se pueden establecer las siguientes funciones de Fischer (Tabla 3-34).

**Tabla 3-34 Funciones discriminantes lineales de Fisher evaluadas por tratamiento entre 13 y 18 meses.**

	Tratamiento		
	A0	A35	A70
TBA	-1,329	0,914	0,414
Gamatocoferol	0,953	-1,077	0,124
Retinol	-2,040	0,797	1,243
a*	-2,301	1,497	0,804
Hexanal	1,601	-1,252	-0,348
Constante	-4,028	-2,486	-1,685

En este caso, el comportamiento de las muestras fue similar a lo que sucedió entre 0 y 12 meses. Sin embargo, se observó que hay una tendencia a que se separen los tratamientos A35 de A70. Esto podría deberse a que los valores de retinol para el tratamiento A35 disminuyeron y los de TBA aumentaron en mayor medida a que para A70.



**Figura 3-64 AD de las muestras de leche en polvo evaluadas de 13 a 18 meses para los tratamientos A0, A35 y A70**

Con el fin de establecer las diferencias en el período final del ensayo de vida útil, se realizó el AD de las muestras de leche en polvo discriminando los tiempos de almacenamiento entre 13 y 18 meses. El método de selección por pasos (*stepwise*) optó por las variables TBA, alfa tocoferol,  $D_3$  y  $L^*$  como las de mayor peso para diferenciar los tiempos.

Se obtuvieron tres funciones discriminantes canónicas estadísticamente significativas ( $p < 0.003$ ) que explican, FD1 el 64,9% de la varianza total, FD2 el 27,9% y FD3 el 7,0% restante. Estas funciones permitieron clasificar a cada muestra en su grupo de pertenencia (tiempos) en un 70,8% de los casos originales y en un 55,6% luego de la validación cruzada.

Se obtuvieron las siguientes funciones discriminantes (coeficientes estandarizados):

$$DF1 = 0,646TBA + 0,651\text{alfa} + 0,489D_3 + 0,901L^*$$

$$DF2 = 0,501TBA + 0,486\text{alfa} - 0,869D_3 + 0,647L^*$$

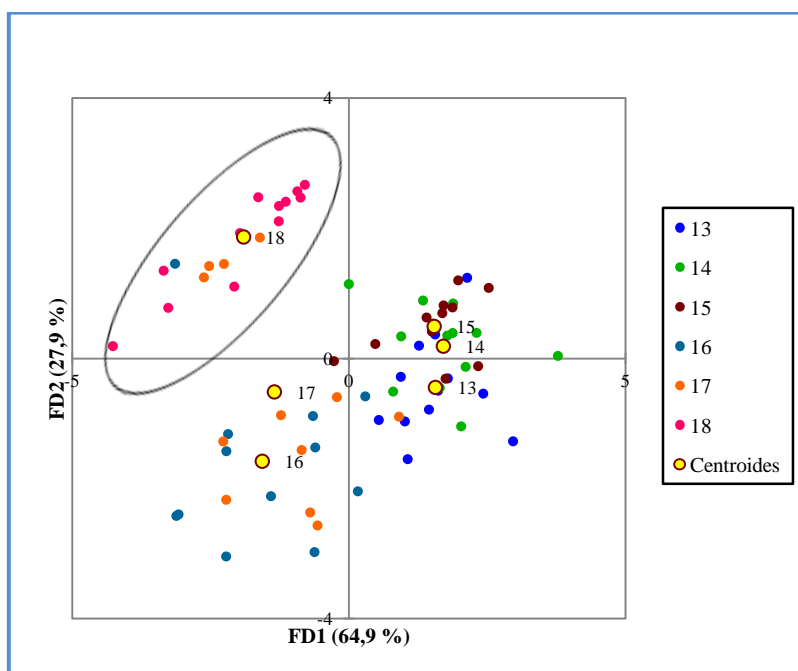
$$DF3 = 0,932TBA + 0,079\text{alfa} + 0,492D_3 - 0,423L^*$$

Consecuentemente, se pudieron establecer las siguientes funciones de Fisher (Tabla 3-35).

**Tabla 3-35 Funciones discriminantes lineales de Fisher evaluadas por tiempo entre 13 y 18 meses.**

	Tiempo (meses)					
	13	14	15	16	17	18
TBA	0,029	1,281	2,518	-2,080	-1,067	-0,680
Alfa tocoferol	0,811	1,253	1,470	-1,839	-1,343	-0,353
D <sub>3</sub>	1,201	0,989	1,236	0,999	-0,076	-4,348
L*	2,130	2,506	1,904	-3,601	-2,372	-0,566
Constante	-3,448	-3,278	-3,529	-4,272	-2,869	-5,380

A pesar de que no se observó una buena clasificación por tiempos, sí se diferencia un grupo que corresponde al tiempo 18 y que incluye a los tres tratamientos. Además, en este grupo quedaron incluidas las muestras del mes 17 para el tratamiento A0. Esto evidenció nuevamente la aparición de indicadores de oxidación que se produjeron antes en el tratamiento A0, diferenciado por valores mayores de TBA.



**Figura 3-65 AD de las muestras de leche en polvo evaluadas en el tiempo de 13 a 18 meses. Gráfico de las dos funciones de mayor peso (FD1 y FD2)**

En el ensayo discriminante, el método por pasos (stepwise) no seleccionó ninguna de las variables medidas por fluorescencia como significativas para la separación y clasificación de leches de los tratamientos A0, A35 y A70.

Sin embargo cuando se incluyeron para diferenciar los tiempos de almacenamiento, estos sí fueron seleccionados para la diferenciación de las muestras de leche en polvo por tiempos entre 0 y 12 meses. En esta ocasión, el método de selección por pasos optó por las variables TBA, gama tocoferol, D<sub>3</sub>, L\*, hexanal, peróxidos lipídicos con emisión a 420nm y oxidación de proteínas por fluorescencia como las de mayor peso para diferenciar los tiempos.

Se obtuvieron cinco funciones discriminantes canónicas estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$  para todas excepto la FD5 cuyo  $p < 0.01$ ) que explican, FD1 el 54,9% de la varianza total, FD2 el 25,4%, FD3 el 13,6%, FD4 el 4,1% y FD5 el 1,4% restante. Estas funciones permitieron clasificar a cada muestra en su grupo de pertenencia (tiempos) en un 88,5% de los casos originales y en un 81,3% luego de la validación cruzada.

Se obtuvieron las siguientes funciones discriminantes (coeficientes estandarizados):

$$FD1 = 0,871TBA + 0,285gama + 0,138D_3 + 0,599L^* - 0,420hexanal - 0,653perlip420 + 0,250oxprot$$

$$FD2 = 0,323TBA - 0,312gama + 0,296D_3 - 0,007L^* - 0,179hexanal + 0,325perlip420 + 0,677oxprot$$

$$FD3 = 0,149TBA + 0,118gama + 0,673D_3 + 0,105L^* + 0,878hexanal - 1,944perlip420 + 1,852oxprot$$

$$FD4 = 0,394TBA + 0,429gama - 0,673D_3 - 0,390L^* + 0,399hexanal + 1,017perlip420 - 0,955oxprot$$

$$FD5 = - 0,070TBA + 0,946gama + 0,011D_3 - 0,049L^* - 0,428hexanal - 0,266perlip420 + 0,391oxprot$$

Consecuentemente, se pudieron establecer las siguientes funciones de Fischer (Tabla 3-36).

**Tabla 3-36 Funciones discriminantes lineales de Fisher con las variables de fluorescencia y evaluadas por tiempo entre 13 y 18 meses.**

	Tiempo (meses)							
	1	2	3	4	6	7	10	12
TBA	10,165	0,558	-2,313	5,799	-3,917	-5,113	-4,261	-0,918
Gamatoco	0,861	-0,327	-1,678	1,529	0,993	-1,105	-1,302	1,029
D3	1,612	0,569	-1,460	0,213	-1,247	-0,968	2,335	-1,054
L*	2,506	1,419	-1,539	3,110	-0,950	-2,008	-1,567	-0,970
Hexanal	-2,772	-0,733	-1,932	-2,137	-0,675	0,745	4,194	3,309
PeroxLip420	-4,000	-4,054	11,164	-5,281	2,162	7,150	-5,555	-1,586
OxProt	5,538	-0,071	-6,551	1,764	-5,630	-3,265	10,381	-2,165
Constante	-14,025	-4,979	-7,266	-8,465	-5,926	-6,975	-10,695	-6,090

La clasificación fue buena pero con elevado número de funciones.

Por último se realizó el AD de las muestras de leche en polvo por tiempos entre 13 y 18 meses (Figura 3-66). El método de selección por pasos optó por las variables TBA, D<sub>3</sub>, L\* y peróxidos lipídicos a 420nm de emisión como las de mayor peso para diferenciar los tiempos.

Se obtuvieron tres funciones discriminantes canónicas estadísticamente significantes ( $p < 0,0001$ ) que explican, FD1 el 64,4% de la varianza total, FD2 el 29,5% y FD3 el 6,2% restante. Estas funciones permitieron clasificar a cada muestra en su grupo de pertenencia (tiempos) en un 93,8% de los casos originales y en un 93,8% luego de la validación cruzada.

Se obtuvieron las siguientes funciones discriminantes (coeficientes estandarizados):

$$FD1 = -0,039TBA + 1,057D_3 + 0,070L^* + 0,491perlip420$$

$$FD2 = 0,685TBA + 0,165D_3 + 0,607L^* - 0,713perlip420$$

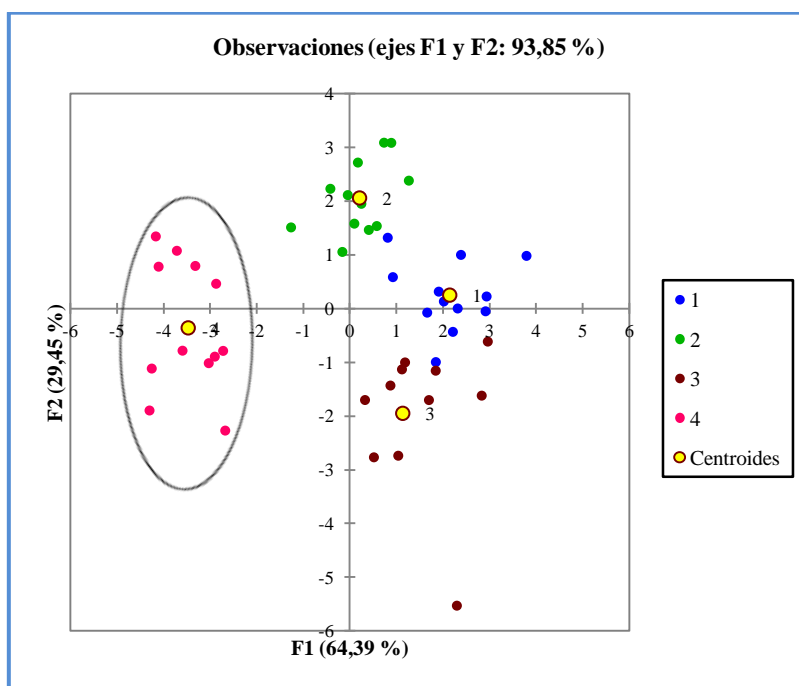
$$FD3 = -0,448TBA - 0,354D_3 + 0,796L^* + 0,236perlip420$$

Consecuentemente, se pueden establecer las siguientes funciones de Fischer (Tabla 3-37).



**Tabla 3-37 Funciones discriminantes lineales de Fisher con las variables de fluorescencia y evaluadas por tiempo entre 13 y 18 meses.**

	Tiempo (meses)			
	13	15	16	18
TBA	-0,420	2,196	-1,441	-0,335
D <sub>3</sub>	4,302	1,692	2,371	-8,365
L*	1,430	1,055	-2,205	-0,279
PeroxLip420	1,451	-2,022	2,402	-1,832
Constante	-4,127	-3,726	-4,113	-7,547



**Figura 3-66 AD de las muestras de leche en polvo evaluadas de 13 a 18 meses con las variables de fluorescencia. Gráfico de las dos funciones de mayor peso (FD1 y FD2)**

### 3.5.13 Conclusiones del ensayo.

Se concluye que fue posible discriminar las leches en polvo de acuerdo a la dieta de los animales, que la pastura de alfalfa confirió a la leche en polvo valores más elevados de antioxidantes naturales, que al encontrarse biolocalizados en el glóbulo graso, fueron efectivos para disminuir la

oxidación y los olores que distinguen a las leches con mayores niveles de oxidación.

Las LEP elaboradas con leches pastoriles con niveles de alfa tocoferol mayores a 4  $\mu\text{g/g}$  y beta caroteno mayores a 0,9  $\mu\text{g/g}$  mantuvieron bajos valores de oxidación medidos por TBARS y concentración de hexanal. El tratamiento quimiométrico de datos permitiría elegir variables, sensores y fluorocromos que se relacionan con la estabilidad oxidativa de la leche en polvo y que puede utilizarse la regresión cuadrática para estimar el deterioro del alfa tocoferol.

Si se quiere llegar a los 24 meses de vida útil con un nivel adecuado de alfa tocoferol/g LEP para asegurar valores de TBA y hexanal por debajo del deterioro oxidativo, se deberá partir de dietas con altos niveles de pastura o por medio de manejo de selección genética y dieta que asegure un mayor pasaje de tocoferol a la leche.

De otro modo, podría considerarse su adición, ya que esta práctica se realiza en la industria. Sin embargo, los resultados al adicionar vitamina E exógena a la leche pueden ser controversiales, ya que la misma se debería mezclar de modo de llegar al glóbulo de grasa, sin perturbar el equilibrio que pueda llevar a proteólisis o lipólisis y/o a un mal manejo que podría resultar prooxidante.

#### 4. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

- Determinación de niveles de antioxidantes y oxidación basal en leche cruda de tambos comerciales de la cuenca central argentina.

En esta primer parte del trabajo se pudo determinar que la variación en la oferta de alimentos y sistemas de producción modifica la composición de la leche de tambos comerciales en relación a la concentración de vitaminas y la capacidad antioxidante.

Se mostró que hubo una correlación entre la alimentación del ganado lechero con la concentración de estos compuestos de interés, que podrían servir para diferenciar la calidad de la leche.

No se contaba con información bien registrada y sistematizada de los niveles de antioxidantes y oxidación basal de leche cruda de tambos argentinos, siendo éste un gran avance para la determinación de la calidad de la leche en nuestro país, principalmente en la cuenca central.

- Descripción química de los alimentos usados en las dietas de vacas lecheras.

Se demostró que la composición de los alimentos en cuanto a la presencia y concentración de compuestos de interés como vitaminas antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados, compuestos liposolubles, etc. está ligada a la naturaleza de los mismos, la forma de conservación y preparación y en el caso de los forrajes, la especie utilizada.

Se vio que las pasturas modifican muy significativamente la presencia de determinados compuestos en leche y que muchos factores afectan estas modificaciones.

- Modificación en la concentración de antioxidantes naturales en leche mediante la inclusión de alfalfa en la dieta de vacas lecheras.

Se demostró que proveyendo pastura natural al ganado durante 20 días, se logró incrementar los niveles de compuestos bioactivos en la leche y que estos niveles perduraron durante el resto del ensayo.

Así, se obtuvo leche con características diferenciales, mayores niveles de vitaminas antioxidantes y precursores y con una capacidad antioxidante mejorada, por lo tanto menos susceptible a la oxidación, al maximizar la oferta de pasturas naturales.

Además en este ensayo se comprobó la expresión diferencial de genes asociados a la incorporación de vitaminas antioxidantes en los tejidos, y especialmente en células mamarias.

Estos resultados tomados en conjunto demuestran la posibilidad de modificar la calidad de la leche cruda en base a la alimentación, los factores ambientales y la genética, a fin de conseguir leches naturalmente enriquecidas en compuestos con potencial nutracéutico.

- Relación entre compuestos bioactivos de origen vegetal y calidad de la leche cruda y productos lácteos. Efecto de la dieta y la estación.

A través del manejo de la alimentación, se logró modelar la incorporación de los compuestos bioactivos, tocoferoles, carotenoides, retinol y ácidos grasos beneficiosos para la salud en forma de gradiente.

El modelo de incorporación de antioxidantes en las leches crudas, a partir de la oferta de estos compuestos en los alimentos, logró establecer que la modificación diferencial de las leches se consigue con el aporte de al menos 50% de pastura de alfalfa en la dieta.

Se demostró además que la estación del año influye sobre la incorporación de estos compuestos en la leche, no sólo por la calidad de las pasturas sino también por otros efectos fisiológicos o ambientales que influirían sobre el consumo de antioxidantes y susceptibilidad a la oxidación de la leche.

Se vio que las características de la leche cruda se transfieren a los productos lácteos elegidos como modelos -leche entera en polvo y quesos-, de modo que el planteo del manejo de la dieta para la obtención de productos lácteos diferenciales y potencialmente funcionales ha sido demostrado.

- Efecto de la dieta en la vida útil de leche entera en polvo.

El aumento de antioxidantes liposolubles, especialmente alfa tocoferol, beta caroteno y retinol en la leche en polvo, sirvió para preservarla de los efectos de la oxidación. La degradación de los antioxidantes resultó inversamente proporcional al incremento de la oxidación proteica y lipídica en las leches conservadas en condiciones piloto de almacenamiento a 20 °C. Estos antioxidantes naturales al encontrarse biolocalizados en el glóbulo graso, fueron efectivos para disminuir la oxidación y los olores que distinguen a las leches con mayores niveles de oxidación.

El tratamiento quimiométrico de datos permitiría elegir variables, sensores y fluorocromos que se relacionan con la estabilidad oxidativa.

La metodología basada en las mediciones no destructivas como la determinación de olor por medio de sensores y la fluorescencia de fase frontal podría ser útil para la detección rápida de deterioro oxidativo en leche en polvo (y otros productos asociados como fórmulas) a nivel de la industria. La presencia de alrededor de 10 mg/kg de leche entera en polvo de alfa tocoferol permitiría extender la vida útil de la misma hasta 24 meses.

- Perspectivas.

Este trabajo presenta por primera vez datos referentes a la diferenciación de leches y productos lácteos de acuerdo a su potencial nutracéutico y antioxidante en leches de Argentina.

Estos resultados pueden utilizarse para valorizar producciones que utilizan el sistema pastoril como la base de la producción lechera. A su vez, permitirían la diferenciación y valorización de la leche y sus derivados como un tipo de producción natural y amigable con el ambiente, elementos valorados por consumidores a nivel local e internacional.

Las herramientas analíticas generadas en el presente trabajo podrían ser aplicadas como herramientas de trazabilidad en los productos nutricionalmente mejorados.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler S.A., Dahl A.V., Jensen S.K., Thuen E., Gustavsson A.M., Steinshamn H. (2013a) Fatty acid composition, fat-soluble vitamin concentrations and oxidative stability in bovine milk produced on two pastures with different botanical composition. *Livestock Science* 154:93-102. DOI: 10.1016/j.livsci.2013.03.013.
- Adler S.A., Jensen S.K., Govasmark E., Steinshamn H. (2013b) Effect of short-term versus long-term grassland management and seasonal variation in organic and conventional dairy farming on the composition of bulk tank milk. *J Dairy Sci* 96:5793-810. DOI: 10.3168/jds.2012-5765.
- Al-Mabruk R.M., Beck N.F.G., Dewhurst R.J. (2004) Effects of Silage Species and Supplemental Vitamin E on the Oxidative Stability of Milk. *Journal of Dairy Science* 87:406-412. DOI: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73180-X](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73180-X).
- Aladedunye F., Przybylski R. (2013) Frying stability of high oleic sunflower oils as affected by composition of tocopherol isomers and linoleic acid content. *Food Chem* 141:2373-8. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.061.
- Alves S.P., Cabrita A.R., Fonseca A.J., Bessa R.J. (2008) Improved method for fatty acid analysis in herbage based on direct transesterification followed by solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 1209:212-9. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.08.114.
- Amamcharla J.K., Metzger L.E. (2014) Modification of the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay to determine the susceptibility of raw milk to oxidation. *International Dairy Journal* 34:177-179. DOI: 10.1016/j.idairyj.2013.09.004.
- Andersen C.M., Mortensen G. (2008) Fluorescence Spectroscopy A Rapid Tool for Analyzing Dairy Products. *J. Agric. Food Chem* 56:720–729.
- Angulo A.J., Romera J.M., Ramirez M., Gil A. (1997) Determination of Cholesterol Oxides in Dairy Products. Effect of Storage Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:4318-4323. DOI: 10.1021/jf970431+.
- Baldi A. (2005) Vitamin E in dairy cows. *Livestock Production Science* 98:117-122. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.004>.
- Baldi A., Pinotti L. (2008) Bioactive components of milk.
- Baró Rodríguez L., Lara Villoslada F., Corral Román E. (2010) Tratado de nutrición / Nutrition Treatise: Nutrición humana en el estado de salud / Human Nutrition in Health Status. Tomo II. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Editorial Medica Panamericana SA.
- Barrefors P., Granelli K., Appelqvist L.A., Bjoerck L. (1995) Chemical Characterization of Raw Milk Samples with and Without Oxidative Off-Flavor. *J Dairy Sci* 78:2691-2699.
- Benzie I.F.F., Strain J.J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 239:70-76.
- Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N., Nardone A. (2002) Markers of Oxidative Status in Plasma and Erythrocytes of Transition Dairy Cows During Hot Season1.

Journal of Dairy Science 85:2173-2179. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74296-3.

- Berry S.D., Davis S.R., Beattie E.M., Thomas N.L., Burrett A.K., Ward H.E., Stanfield A.M., Biswas M., Ankersmit-Udy A.E., Oxley P.E., Barnett J.L., Pearson J.F., van der Does Y., MacGibbon A.H.K., Spelman R.J., Lehnert K., Snell R.G. (2009) Mutation in Bovine  $\beta$ -Carotene Oxygenase 2 Affects Milk Color. *Genetics* 182:923-926. DOI: 10.1534/genetics.109.101741.
- Besle J.M., Viala D., Martin B., Pradel P., Meunier B., Berdague J.L., Fraisse D., Lamaison J.L., Coulon J.B. (2010) Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *J Dairy Sci* 93:2846-56. DOI: 10.3168/jds.2009-2939.
- Bhat Z.F., Bhat H. (2011) Milk and dairy products as functional foods: A review. *International Journal of Dairy Science* 6:1-12.
- Biolatto A., Grigioni G., Irurueta M., Sancho A.M., Taverna M., Pensel N. (2007) Seasonal variation in the odour characteristics of whole milk powder. *Food Chemistry* 103:960-967. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.050>.
- Boelrijk A.E.M., de Jong C., Smit G. (2003) 7 - Flavour generation in dairy products, in: G. Smit (Ed.), *Dairy Processing*, Woodhead Publishing. pp. 130-154.
- Boland M. (2003) 3 - Influences on raw milk quality, in: G. Smit (Ed.), *Dairy Processing*, Woodhead Publishing. pp. 42-67.
- Botosoa E.P., Chèné C., Karoui R. (2013) Use of front face fluorescence for monitoring lipid oxidation during ageing of cakes. *Food Chemistry* 141:1130-1139. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.059>.
- Bovolenta S., Spanghero M., Dovier S., Orlandi D., Clementel F. (2008) Chemical composition and net energy content of alpine pasture species during the grazing season. *Animal Feed Science and Technology* 146:178-191. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2008.06.003.
- Bretschneider G., Salado E. (2010) Sistemas de producción lecheros: no es cuestión de encerrar vacas y chau; hay que analizar bien todo, *Producir XXI*, Buenos Aires. pp. Sitio Argentino de Producción Animal.
- Butler G., Nielsen J.H., Slots T., Seal C., Eyre M.D., Sanderson R., Leifert C. (2008) Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high- and low-input conventional and organic systems: seasonal variation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88:1431-1441. DOI: 10.1002/jsfa.3235.
- Buttery R.G., Kamm J.A., Ling L.C. (1982) Volatile components of alfalfa flowers and pods buttery. *J. Agric. Food Chem* 30:739-742.
- Buttriss J.L., Diplock A.T. (1984) [15] High-performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues, *Methods in Enzymology*, Academic Press. pp. 131-138.
- Calderón F., Chauveau-Duriot B., Martin B., Graulet B., Doreau M., Nozière P. (2007a) Variations in Carotenoids, Vitamins A and E, and Color in Cow's Plasma and Milk During Late Pregnancy and the First Three Months of Lactation. *Journal of Dairy Science* 90:2335-2346. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-630>.
- Calderón F., Chauveau-Duriot B., Pradel P., Martin B., Graulet B., Doreau M., Nozière P. (2007b) Variations in Carotenoids, Vitamins A and E, and Color in Cow's Plasma and Milk Following a Shift from Hay Diet to Diets Containing Increasing

- Levels of Carotenoids and Vitamin E. *Journal of Dairy Science* 90:5651-5664. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0264>.
- Calderón F., Tornambé G., Martin B., Pradel P., Chauveau-Duriot B., Nozière P. (2006) Effects of mountain grassland maturity stage and grazing management on carotenoids in sward and cow's milk. *Animal Research* 55:533-544. DOI: 10.1051/animres:2006031.
- Carpino S., Horne J., Melilli C., Licitra G., Barbano D.M., Van Soest P.J. (2004) Contribution of native pasture to the sensory properties of ragusano cheese. *J. Dairy Sci* 87:308–315.
- Castillo A.R., Taverna M.A., Páez R.R., Cuatrin A., Colombatto D., Bargo F., García M.S., García P.T., Chavez M., Beaulieu A.D., Drackley J.K. (2006) Fatty acid composition of milk from dairy cows fed fresh alfalfa based diets. *Animal Feed Science and Technology* 131:241-254. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2006.05.022.
- Celestino E.L., Iyer M., Roginski H. (1997) The effects of refrigerated storage of raw milk on the quality of whole milk powder stored for different periods. *International Dairy Journal* 7:119-127. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(96\)00041-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(96)00041-6).
- Cole M., Covington J.A., Gardner J.W. (2011) Combined electronic nose and tongue for a flavour sensing system. *Sensors and Actuators B: Chemical* 156:832-839. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2011.02.049>.
- Chapman K.W., Whited L.J., Boor K.J. (2002) Sensory Threshold of Light-Oxidized Flavor Defects in Milk. *Journal of Food Science* 67:2770-2773. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08813.x.
- Chauveau-Duriot B., Doreau M., Nozière P., Graulet B. (2010) Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. *Anal Bioanal Chem* 397:777-90. DOI: 10.1007/s00216-010-3594-y.
- Chen J., Lindmark-Månsson H., Gorton L., Åkesson B. (2003) Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *International Dairy Journal* 13:927-935. DOI: 10.1016/s0958-6946(03)00139-0.
- Chilliard Y., Ferlay A., Doreau M. (2001) Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow diet on milk fat secretion and composition. *Livestock Production Science* 70 70:31-48.
- Chinnadurai K., Tyagi A. (2011) Conjugated Linoleic Acid: A Milk Fatty Acid with Unique Health Benefit Properties.
- Day E.A., Lillard D.A. (1960) Autoxidation of Milk Lipids. I. Identification of volatile Monocarbonyl Compounds from Autoxidized Milk Fat<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science* 43:585-597. DOI: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(60\)90209-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(60)90209-5).
- de Rijke Y.B., Bredie S.J.H., Demacker P.N.M., Vogelaar J.M., Hak-Lemmers H.L.M., Stalenhoef A.F.H. (1997) The Redox Status of Coenzyme Q10 in Total LDL as an indicator of in vivo oxidative modification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17:127-133.
- Debier C., Pottier J., Goffe C., Larondelle Y. (2005) Present knowledge and unexpected behaviours of vitamins A and E in colostrum and milk. *Livestock Production Science* 98:135-147. DOI: 10.1016/j.livprodsci.2005.10.008.



- Descalzo A.M., Rossetti L., Grigioni G., Irueta M., Sancho A.M., Carrete J., Pensel N.A. (2007) Antioxidant status and odour profile in fresh beef from pasture or grain-fed cattle. *Meat Sci* 75:299-307. DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.07.015.
- Descalzo A.M., Rossetti L., Páez R., Grigioni G., García P.T., Costabel L., Negri L., Antonacci L., Salado E., Bretschneider G., Gagliostro G., Comerón E., Taverna M.A. (2012) Differential Characteristics of Milk Produced in Grazing Systems and Their Impact on Dairy Products, *Milk Production – Advanced Genetic Traits, Cellular Mechanism, Animal Management and Health*, INTECH. pp. 368.
- Dewhurst R.J., Shingfield K.J., Lee M.R.F., Scollan N.D. (2006) Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology* 131:168-206. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2006.04.016.
- Dewhurst R.J., Wadhwa D., Borgida L.P., Fisher W.J. (2001) Rumen acid production from dairy feeds. 1. Effects on feed intake and milk production of dairy cows offered grass or corn silages. *J. Dairy Sci.* 84:2721–2729.
- Duncan S.E., Webster J.B. (2010) *Oxidation and protection of milk and dairy products* Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Cambridge, UK.
- Elgersma A., Ellen G., van der Horst H., Boer H., Dekker P.R., Tamminga S. (2004) Quick changes in milk fat composition from cows after transition from fresh grass to a silage diet. *Animal Feed Science and Technology* 117:13-27. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2004.08.003.
- Elgersma A., Ellen G., van der Horst H., Muuse B.G., Boer H., Tamminga S. (2003) Comparison of the fatty acid composition of fresh and ensiled perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), affected by cultivar and regrowth interval. *Animal Feed Science and Technology* 108:191-205. DOI: 10.1016/s0377-8401(03)00134-2.
- FAO/WHO. ( 2002) *Human Vitamin and mineral requirements* WORLD HEALTH ORGANIZATION
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, Rome, Italy.
- Fenaille F., Mottier P., Turesky R.J., Ali S., Guy P.A. (2001) Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *Journal of Chromatography A* 921:237-245. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00883-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00883-4).
- Ferlay A., Martin B., Lerch S., Gobert M., Pradel P., Chilliard Y. (2009) Effects of supplementation of maize silage diets with extruded linseed, vitamin E and plant extracts rich in polyphenols, and morning v. evening milking on milk fatty acid profiles in Holstein and Montbéliarde cows. *animal* 4:627. DOI: 10.1017/s1751731109991224.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations F. (2011) *Codex Alimentarius*, in: W. H. Organization (Ed.), *Milk and milk products*, Rome, Italy.
- Fox P.F. (2003) 2 - The major constituents of milk, in: G. Smit (Ed.), *Dairy Processing*, Woodhead Publishing. pp. 5-41.
- Gatellier P., Gomez S., Gigaud V., Berri C., Bihan-Duval E.L., Santé-Lhoutellier V. (2007) Use of a fluorescence front face technique for measurement of lipid

- oxidation during refrigerated storage of chicken meat. *Meat Science* 76:543-547. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.01.006>.
- Haddad G.S., Loewenstein M. (1983) Effect of Several Heat Treatments and Frozen Storage on Thiamine, Riboflavin, and Ascorbic Acid Content of Milk<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science* 66:1601-1606. DOI: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81980-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81980-8).
- Hair J.F., Anderson R.E., Tatham R.L., Black W.C. (1999) *Análisis discriminante múltiple y regresión logística* Prentice Hall, Madrid.
- Harrison E.H., Hussain M.M. (2001) Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J Nutr* 131:1405-8.
- Havemose M.S., Weisbjerg M.R., Bredie W.L.P., Nielsen J.H. (2004) Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. *International Dairy Journal* 14:563-570. DOI: 10.1016/j.idairyj.2003.11.005.
- Hayes K., Pronczuk A., Perlman D. (2001) Vitamin E in fortified cow milk uniquely enriches human plasma lipoproteins. *The American Journal of Clinical Nutrition* 74:211-218.
- Hedegaard R.V., Kristensen D., Nielsen J.H., Frøst M.B., Østdal H., Hermansen J.E., Kröger-Olsen M., Skibsted L.H. (2006) Comparison of Descriptive Sensory Analysis and Chemical Analysis for Oxidative Changes in Milk. *Journal of Dairy Science* 89:495-504. DOI: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72112-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72112-9).
- Hemme T. (2009) IFCN Dairy Report 2009, in: I. F. C. N. IFCN Dairy Report 2009 (Ed.), Research Center, Kiel, Germany.
- Hidiroglou M., Batra T.R. (1996) Plasma and tissue concentrations of vitamin E following supplementation of two forms of vitamin E in sheep. *Small Ruminant Research* 21:83-87. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0921-4488\(96\)00869-3](http://dx.doi.org/10.1016/0921-4488(96)00869-3).
- Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-1856. DOI: 10.1021/jf030723c.
- Hulshof P.J.M., van Roekel-Jansen T., van de Bovenkamp P., West C.E. (2006) Variation in retinol and carotenoid content of milk and milk products in The Netherlands. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:67-75. DOI: 10.1016/j.jfca.2005.04.005.
- Irurueta M., Biolatto A., Grigioni G., Sancho A.M., Chavéz M., Páez R., Taverna M., Pensel N. (2005) Electronic nose and SPME-GAS chromatography for the study of the odor profile of whole milk powder. *Anales de la Asociación Química Argentina* 93:75-80.
- Ishibashi S., Perrey S., Chen Z., Osuga J.-i., Shimada M., Ohashi K., Harada K., Yazaki Y., Yamada N. (1996) Role of the Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor Pathway in the Metabolism of Chylomicron Remnants: A QUANTITATIVE STUDY IN KNOCKOUT MICE LACKING THE LDL RECEPTOR, APOLIPOPROTEIN E, OR BOTH. *Journal of Biological Chemistry* 271:22422-22427. DOI: 10.1074/jbc.271.37.22422.
- Johnson D.S., Duncan S.E., Bianchi L.M., Chang H.H., Eigel W.N., O'Keefe S.F. (2015) Packaging modifications for protecting flavor of extended-shelf-life milk from light. *J Dairy Sci* 98:2205-14. DOI: 10.3168/jds.2014-8857.

- Karatapanis A.E., Badeka A.V., Riganakos K.A., Savvaidis I.N., Kontominas M.G. (2006) Changes in flavour volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time. *International Dairy Journal* 16:750-761. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.06.008>.
- Karoui R., Dufour E., De Baerdemaeker J. (2007a) Monitoring the molecular changes by front face fluorescence spectroscopy throughout ripening of a semi-hard cheese. *Food Chemistry* 104:409-420. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.09.020.
- Karoui R., Dufour É., De Baerdemaeker J. (2007b) Front face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools for monitoring the oxidation of semi-hard cheeses throughout ripening. *Food Chemistry* 101:1305-1314. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.01.028.
- Kaushik S., Wander R., Leonard S., German B., Traber M. (2001) Removal of fat from Cow's milk decreases the vitamin E contents of the resulting dairy products. *Lipids* 36:73-78. DOI: 10.1007/s11745-001-0670-3.
- Kono N., Arai H. (2015) Intracellular Transport of Fat-Soluble Vitamins A and E. *Traffic* 16:19-34. DOI: 10.1111/tra.12231.
- La Terra S., Marino V.M., Manenti M., Licitra G., Carpino S. (2010) Increasing pasture intakes enhances polyunsaturated fatty acids and lipophilic antioxidants in plasma and milk of dairy cows fed total mix ration. *Dairy Science & Technology* 90:687-698. DOI: 10.1051/dst/2010100.
- Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P. (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* 46:244-282. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2007.05.002>.
- Lerch S., Ferlay A., Graulet B., Cirié C., Verdier-Metz I., Montel M.C., Chilliard Y., Martin B. (2015) Extruded linseeds, vitamin E and plant extracts in corn silage-based diets of dairy cows: Effects on sensory properties of raw milk and uncooked pressed cheese. *International Dairy Journal* 51:65-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.07.006>.
- Li Y., Zhang L., Wang W. (2012) Formation of aldehyde and ketone compounds during production and storage of milk powder. *Molecules* 17:9900-11. DOI: 10.3390/molecules17089900.
- Lillard D.A. (1978) Chemical Changes Involved in the Oxidation of Lipids in Foods, *Lipids as a Source of Flavor*, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. pp. 68-80.
- Lucas A., Rock E., Chamba J.-F., Verdier-Metz I., Brachet P., Coulon J.-B. (2006) Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest. *Lait* 86:21-41.
- Luna P., Juárez M., de la Fuente M.A. (2005) Validation of a Rapid Milk Fat Separation Method to Determine the Fatty Acid Profile by Gas Chromatography. *Journal of Dairy Science* 88:3377-3381. DOI: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73021-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73021-6).
- Lloyd M.A., Hess S.J., Drake M.A. (2009) Effect of nitrogen flushing and storage temperature on flavor and shelf-life of whole milk powder. *J Dairy Sci* 92:2409-22. DOI: 10.3168/jds.2008-1714.

- Mansbridge R.J., Blake J.S. (1997) Nutritional factors affecting the fatty acid composition of bovine milk. *British Journal of Nutrition* 78:S37-S47. DOI: 10.1079/BJN19970133.
- Marino V.M., Schadt I., Carpino S., Caccamo M., La Terra S., Guardiano C., Licitra G. (2014) Effect of Sicilian pasture feeding management on content of alpha-tocopherol and beta-carotene in cow milk. *J Dairy Sci* 97:543-51. DOI: 10.3168/jds.2013-7005.
- Martin B., Cornu A., Kondjoyan N., Ferlay A., Verdier-Metz I., Pradel P., Rock E., Chilliard Y., Coulon J., Berdagué J.L. (2005a) Milk indicators for recognizing the types of forages eaten by dairy cows Martin 2005, in: J. F. Hocquette and S. Gigli (Eds.), *Indicators of milk and beef quality*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. pp. 127-136.
- Martin B., Verdier-Metz I., Buchin S., C. H., Coulon J.B. (2005b) How do the nature of forages and pasture diversity influence the sensory quality of dairy livestock products. *Animal Science* 81:205 - 212. DOI: 10.1079/.
- McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A., Sinclair L.A., Wilkinson R.G. (2010) *Animal Nutrition*.
- McDowell L.R. (2006) Vitamin nutrition of livestock animals: Overview from vitamin discovery to today. *Canadian Journal of Animal Science* 86:171-179. DOI: 10.4141/A05-057.
- Mountousis I., Dots V., Stanogias G., Papanikolaou K., Roukos C., Liamadis D. (2011) Altitudinal and seasonal variation in herbage composition and energy and protein content of grasslands on Mt Varnoudas, NW Greece. *Animal Feed Science and Technology* 164:174-183. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2011.01.007.
- Muir D.D. (2011) The stability and shelf life of milk and milk products:755-778. DOI: 10.1533/9780857092540.3.755.
- Müller C.E., Möller J., Jensen S.K., Udén P. (2007) Tocopherol and carotenoid levels in baled silage and haylage in relation to horse requirements. *Animal Feed Science and Technology* 137:182-197. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2006.10.007.
- Nozière P., Graulet B., Lucas A., Martin B., Grolier P., Doreau M. (2006a) Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology* 131:418-450. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2006.06.018.
- Nozière P., Grolier P., Durand D., Ferlay A., Pradel P., Martin B. (2006b) Variations in Carotenoids, Fat-Soluble Micronutrients, and Color in Cows' Plasma and Milk Following Changes in Forage and Feeding Level. *Journal of Dairy Science* 89:2634-2648. DOI: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72340-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72340-2).
- NRC. (2001) *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition*, 2001 NATIONAL ACADEMY PRESS Washington, D.C.
- Oh N.S., Lee H.A., Lee J.Y., Joung J.Y., Lee K.B., Kim Y., Lee K.W., Kim S.H. (2013) The dual effects of Maillard reaction and enzymatic hydrolysis on the antioxidant activity of milk proteins. *Journal of Dairy Science* 96:4899-4911. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6613>.
- Oldfield D.J., Teehan C.M., Kelly P.M. (2000) The effect of preheat treatment and other process parameters on the coffee stability of instant whole milk powder. *International Dairy Journal* 10:659-667.

- Özer B.H., Kirmaci H.A. (2010) Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology* 63:1-15. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2009.00547.x.
- Páez R., Descalzo A., Cuatrin A., Comerón E.A., Salado E.E., Campos S., Robledo M., Audero G.I. (2007) Modificación de la calidad de leche por la dieta ofrecida. 2 Composición de ácidos grasos y estabilidad oxidativa, *Revista Argentina de Produccion Animal*.
- Pagan J.D., Kane E., Nash D. (2005) Form and source of tocopherol affects vitamin E status in thoroughbred horses, *Pferdeheilkunde* 21, Equine Nutrition Conference Hannover 2005.
- Pariza M.W., Park Y., Cook M.E. (2001) The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research* 40:283-298. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00008-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00008-X).
- Pecetti L., Tava A., Felicioli A., Pinzauti M., Piano E. (2002) Effect of three volatile compounds from lucerne flowers on their attractiveness towards pollinators. *Bulletin of Insectology* 55:21-27.
- Poulsen N.A., Rybicka I., Poulsen H.D., Larsen L.B., Andersen K.K., Larsen M.K. (2015) Seasonal variation in content of riboflavin and major minerals in bulk milk from three Danish dairies. *International Dairy Journal* 42:6-11. DOI: 10.1016/j.idairyj.2014.10.010.
- Prache S., Cornu A., Berdagué J.L., Priolo A. (2005) Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research* 59:157-168. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2005.05.004.
- Prache S., Kondjoyan N., Delfosse O., Chauveau-Duriot B., Andueza D., Cornu A. (2009) Discrimination of pasture-fed lambs from lambs fed dehydrated alfalfa indoors using different compounds measured in the fat, meat and plasma. *Animal* 3:598-605. DOI: 10.1017/S1751731108003881.
- Prache S., Priolo A., Grolier P. (2003) Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep: its significance for the traceability of grass-feeding. *J Anim Sci* 81:360-7.
- Prandini A., Sigolo S., Tansini G., Brogna N., Piva G. (2007) Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *Journal of Food Composition and Analysis* 20:472-479. DOI: 10.1016/j.jfca.2007.03.001.
- Rafalowski R., Żegarska Z., Kuncewicz A., Borejszo Z. (2014) Oxidative stability of milk fat in respect to its chemical composition. *International Dairy Journal* 36:82-87. DOI: 10.1016/j.idairyj.2014.01.002.
- Rimpiläinen V., Kaipio J.P., Depree N., Young B.R., Wilson D.I. (2015) Predicting functional properties of milk powder based on manufacturing data in an industrial-scale powder plant. *Journal of Food Engineering* 153:12-19. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2014.12.010.
- Rodrigues F., Almeida I., Sarmiento B., Amaral M.H., Oliveira M.B.P.P. (2014) Study of the isoflavone content of different extracts of *Medicago* spp. as potential active ingredient. *Industrial Crops and Products* 57:110-115. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.03.014.
- Romeu-Nadal M., Chávez-Servín J.L., Castellote A.I., Rivero M., López-Sabater M.C. (2007) Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas. *Food Chemistry* 100:756-763. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.10.037.

- Rossetti L., Sancho A.M., Langman L., Comerón E., Grigioni G.M., Biolatto A., Descalzo A.M. (2010) Antioxidant status and odour profile in milk from silage of lucerne-fed cows. *The Australian Journal of Dairy Technology* 65:3-9.
- Rouissi H., Dridi S., Kammoun M., De Baerdemaeker J., Karoui R. (2008) Front face fluorescence spectroscopy: a rapid tool for determining the effect of replacing soybean meal with scotch bean in the ration on the quality of Sicilo-Sarde ewe's milk during lactation period. *European Food Research and Technology* 226:1021-1030. DOI: 10.1007/s00217-007-0627-7.
- Sawyer L., Kontopidis G. (2000) The core lipocalin, bovine beta-lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta* 1482:136-48.
- Schwartz H., Ollilainen V., Piironen V., Lampi A.-M. (2008) Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis* 21:152-161. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2007.07.012>.
- Smet K., Raes K., De Block J., Herman L., Dewettinck K., Coudijzer K. (2008) A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. *International Dairy Journal* 18:520-530. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.11.012.
- Stapelfeldt H., Nielsen B.R., Skibsted L.H. (1997) Effect of heat treatment water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. *International Dairy Journal* 7:331-339.
- Stocker A. (2004) Molecular mechanisms of vitamin E transport. *Ann N Y Acad Sci* 1031:44-59. DOI: 10.1196/annals.1331.005.
- Tava A., Pecetti L. (1997) Volatiles from *Medicago sativa* complex flowers. *Phytochemistry* 45:1145-1148. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00119-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00119-2).
- Taverna M.A. (2005) Informe final PNL 2001-2005, INTA.
- Thomas M.E., Scher J., Desobry-Banon S., Desobry S. (2004) Milk powders ageing: effect on physical and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:297-322. DOI: 10.1080/10408690490464041.
- Traber M.G. (2013) Vitamin E: Metabolism and Requirements, in: B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Human Nutrition* (Third Edition), Academic Press, Waltham. pp. 383-389.
- Traber M.G., Arai H. (1999) Molecular mechanisms of vitamin E transport. *Annu Rev Nutr* 19:343-55. DOI: 10.1146/annurev.nutr.19.1.343.
- Tsuchihashi H., Kigoshi M., Iwatsuki M., Niki E. (1995) Action of  $\beta$ -Carotene as an Antioxidant against Lipid Peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 323:137-147. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1995.0019>.
- van Aardt M., Duncan S.E., Marcy J.E., Long T.E., O'Keefe S.F., Nielsen-Sims S.R. (2005) Aroma Analysis of Light-Exposed Milk Stored With and Without Natural and Synthetic Antioxidants. *J. Dairy Sci.* 88:881-890.
- Viallon C., Martin B., Verdier-Metz I., Pradel P., Garel J.-P., Coulon J.-B., Berdagué J.-L. (2000) Transfer of monoterpenes and sesquiterpenes from forages into milk fat. *Lait* 80 80:635-641.
- Wardencki W., Chmiel T., Dymerski T. (2013) 7 - Gas chromatography-olfactometry (GC-O), electronic noses (e-noses) and electronic tongues (e-tongues) for in

vivo food flavour measurement, in: D. Kilcast (Ed.), Instrumental Assessment of Food Sensory Quality, Woodhead Publishing. pp. 195-229.

Whiting C.M., Mutsvangwa T., Walton J.P., Cant J.P., McBride B.W. (2004) Effects of feeding either fresh alfalfa or alfalfa silage on milk fatty acid content in Holstein dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 113:27-37. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2003.11.004.

Whitting L.A., Horwitt M.K. (1964) Effect of degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency-induced creatinuria. *J Nutrition* 82:19-33.

Wold S., Sjöström M., Eriksson L. (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58:109-130. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1).