

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

**Estudios de estabilidad en preparados
de base láctea suplementados con
diferentes fuentes de ácidos grasos
poliinsaturados de cadena larga.**

Jorge Luis Chávez-Servín, 2007



II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

1. Importancia de la alimentación en las primeras etapas de la vida

1.1 Intrauterina

En el embarazo se producen toda una serie de cambios importantes en el metabolismo con el objeto de lograr un aporte adecuado de nutrientes desde la madre hacia el feto, además de incrementar los depósitos de lípidos maternos durante los primeros meses de la gestación para cubrir las necesidades de energía al final del embarazo y durante la lactancia. Normalmente en los países desarrollados, la mayoría de las mujeres embarazadas sanas, son capaces, sin influencia externa, de aportar a su organismo la energía extra que asegura un crecimiento y un desarrollo adecuado del feto.

Durante la primera mitad de la gestación existe una fase anabólica que se caracteriza por un aumento de la capacidad materna para almacenar proteínas y energía en forma de grasa, cuando las necesidades fetales son aún relativamente pequeñas. La fase catabólica ocurre durante la segunda mitad de la gestación. Durante este periodo la madre utiliza como combustible energético lípidos en lugar de la glucosa.

Durante la gestación, el feto acumula los elementos requeridos para el crecimiento, oxida los sustratos energéticos transportados desde la madre y elimina productos metabólicos hacia la madre (Georgieff, 2007). Durante la última mitad del embarazo también acumula depósitos de energía para cubrir las necesidades neonatales. La dieta fetal está constituida por una elevada cantidad de hidratos de carbono, cantidades adecuadas de sustancias nitrogenadas y muy baja cantidad de grasas, con la excepción de ácidos grasos insaturados, que últimamente están recibiendo mucho interés científico debido a las funciones que tienen éstos en el feto (Shoji, 2007). El metabolismo de los lípidos en el feto incluye la incorporación de ácidos grasos estructurales como fosfolípidos, la esterificación en triacilglicéridos, el depósito en tejido adiposo y su oxidación. Los lípidos fetales derivan en primer lugar de los ácidos grasos de la madre

que cruzan vía placenta, y en segundo lugar, de un incremento gradual de la síntesis endógena a medida que avanza la gestación. Los ácidos grasos esenciales LA y ALA y sus derivados de cadena larga, AA y DHA deben ser aportados desde la circulación materna a través de la placenta, para la formación de triacilglicéridos y fosfolípidos. De la misma forma que la madre recibe los ácidos grasos esenciales a partir de la dieta, el feto los debe recibir de la madre. Por eso es importante la buena alimentación de la madre, para asegurar un buen suministro de todos los nutrientes que el feto requiere, como lo es el caso del ácido docosahexaenóico (DHA) que actualmente es objeto de numerosas investigaciones (Vidailhet, 2007).

Los ácidos grasos libres que entran en la circulación fetal, desde la placenta son utilizados para el desarrollo del cerebro, para su incorporación a los lípidos estructurales de los tejidos, para su almacenamiento en forma de triacilglicéridos en el tejido adiposo, especialmente durante el último trimestre de la gestación, y para su utilización como fuente de energía. Sobre el último trimestre del embarazo, hay un 35% de incremento en el nivel de DHA en la retina, y los niños nacidos pretérmino es más probable que sean más susceptibles de cualquier reducción en la disponibilidad del DHA para acumularlo en la retina. Esta susceptibilidad en niños pretérmino puede explicar la alteración marcada en los electroretinogramas a las 6 semanas de edad postnatal comparando con niños nacidos a término. Lo que sugiere que la función retinal puede ser alterada por el nivel de los PUFA n-3 suministrados en la dieta por al menos las 6 primeras semanas de vida (Jeffrey, 2001; Singhal, 2007).

1.2 Alimentación después de nacer

El papel de la alimentación sobre el crecimiento y el desarrollo del recién nacido, ha adquirido cada vez una mayor relevancia, sobre todo a partir de los años setenta en los que se recuperó la lactancia natural como método fundamental de alimentación del recién nacido, dejando a un lado la moda, incentivada entre otros, por intereses económicos que habían originado su abandono en la década de los años cincuenta y sesenta. Actualmente existe numerosa literatura científica que demuestra las ventajas de la lactancia materna y la interdependencia de ésta con el estado de nutrición de la madre (Yuhás, 2006). Asimismo la industria de preparados para lactantes ha continuado

perfeccionando los preparados para lactantes, mejorando su composición para hacerlos lo más cercanos posibles a la leche humana. Entre las ventajas de la lactancia materna podemos mencionar de manera general las siguientes:

- 1.- La leche materna es un fluido dinámico, de composición variable de acuerdo a las necesidades del bebé y contiene todos los nutrientes que éste necesita.
- 2.- Es apropiada microbiológicamente y cómoda de administrar.
- 3.- Siempre esta disponible, sin errores de preparación y sin necesidad de instrumentos.
- 4.- Es un alimento económico.
- 5.- Existe un beneficio psicológico para la madre y el hijo.
- 6.- Es más digerible y fácil de asimilar.
- 7.- Menor riesgo de sensibilización alérgica.
- 8.- Aumenta las defensas inmunitarias.
- 9.- Crea una flora intestinal más fisiológica.
- 10.- Menor morbilidad y mortalidad infantil.
- 11.- Prevención de enfermedades posteriores de la vida.

Además existen sustancias en la leche materna que efectúan funciones diferentes a las nutritivas. Por ejemplo:

- a. Síntesis de lactosa que se lleva a cabo en la glándula mamaria por acción de la lactoalbúmina.
- b. Protección directa contra agentes microbianos: lactoferrina, inmunoglobulina A, oligosacáridos con funciones antiparasitarias, amino-azúcares con función antibacteriana y lípidos con funciones antivirales y antiparasitarias.
- c. Propiedades anti-inflamatorias: inmunoglobulina A, lactoferrina.
- d. Promoción del crecimiento: factor de crecimiento epidérmico.
- e. Presencia de leucocitos (linfocitos B y T, macrófagos y polimorfonucleares) que participan en la síntesis de enzimas, en los procesos de fagocitosis y en la regulación de la respuesta inmune.

Asimismo para la madre se han descrito otras ventajas, como: menor frecuencia de cáncer de mama por la protección de las inmunoglobulinas sobre el pecho materno. La involución uterina es más rápida y mayor, y también, de anticoncepción, ya que la

amenorrea es de unos 11 meses más de 3 a 5 meses en las que ya no están en periodo de lactancia.

No obstante la lactancia materna no siempre es posible debido a diversas causas, como por ejemplo incidencias maternas como malformaciones (amastia, atelia, micromastia), o simplemente pseudo-inversión del pezón, grietas del pezón, hipogalactia, infecciones como galactoforitis, linfagitis y mastitis, u otro tipo de infecciones generales por parte de la madre que pueden llegar a interrumpir la lactancia temporal o incluso definitivamente. Hay situaciones que pueden poner a la madre o al hijo en riesgo de enfermedad y que no son evitables, en estos casos la lactancia materna esta contraindicada (Tabla 1), y el recién nacido debe ser alimentado con un preparado para lactante.

Tabla 1. Contraindicaciones para la lactancia materna (Tojo, 2001)

Absolutas	Relativas
Cáncer materno	Estreptococos B neonatal
Tuberculosis	Infecciones maternas agudas
Drogadicción	Enfermedades orgánicas graves
Fármacos maternos	Viriasis (HBV, CMV, VIH, HTLV-1)
Metabolopatías	Fibrosis quística (madre homocigótica)
Malformaciones	Psicopatías maternas
	Epilepsia materna no controlada

1.3 Recomendaciones nutricionales

La **recomendación** nutricional se define como la cantidad aconsejable de un nutriente, que con base en el conocimiento científico, se ha juzgado adecuada para cubrir con seguridad las necesidades de las personas sanas. Mientras que los **requerimientos** nutricionales se apoyan en diversas evidencias:

a) estudios en sujetos sometidos a dietas bajas o deficientes de algún nutriente, seguido por la corrección del déficit con una cantidad conocida del mismo,

- b) estudios de balance que miden la relación entre la ingesta y las pérdidas,
- c) mediciones bioquímicas de saturación tisular y/o adecuación de función molecular en relación a la ingesta de nutrientes,
- d) ingesta en lactantes alimentados exclusivamente al pecho materno,
- e) observaciones epidemiológicas del estado de nutrición de poblaciones en relación a la ingesta y
- f) en algunos casos, extrapolación de información en animales de experimentación.

Sin embargo, no siempre existe un acuerdo entre los expertos en los criterios para determinar el requerimiento fisiológico de un nutriente. El requerimiento nutricional en el recién nacido, puede ser aquel que mantendrá un crecimiento y desarrollo satisfactorio. Para ciertos nutrientes, el requerimiento puede ser la cantidad que previene la falla de una función específica y/o el desarrollo de un signo de deficiencia. Las recomendaciones nutricionales no se refieren a los requerimientos mínimos ni al nivel óptimo de un nutriente, sino que proporcionan un nivel de seguridad y adecuación.

Debido a que, en condiciones normales, la leche materna se considera suficiente para cubrir los requerimientos nutricionales de un lactante sano los primeros cuatro a seis meses de vida, el cálculo de las recomendaciones nutricionales se dirige principalmente a recién nacidos y lactantes que no reciben exclusivamente leche materna. Los cálculos se basan en el supuesto de que se trata de madres sanas, bien alimentadas y que proporcionan diariamente un promedio de 750 ml de leche durante este período. La tabla 2 muestra las recomendaciones nutricionales para recién nacidos de acuerdo con la dosis diaria recomendada (RDA) la ESPGHAN y la normativa de la Unión Europea (UE).

Tabla 2. Recomendaciones internacionales sobre nutrición de recién nacidos (Tojo, 2001; 2006/141/CE)

Nutrientes	RDA (0-6 meses)	ESPGHAN	Normativa UE
Energía	110 kcal/kg/día	110-130 kcal/kg/día	60-70 kcal/100 ml
Proteínas	2.2 g/kg/día	1.8-2.8 g/100 kcal	1.8-3 g/100 kcal
Lípidos		4.4-6 g/100 kcal	4.4-6 g/100 kcal
Ácido linoleico		0.5-1.2 g/100 kcal	300-1200 mg/100 kcal
Ácido linolénico			>50 mg/100 kcal
LA/ALA		5-15	5-15
n-3		< 1% total ác. grasos	< 1% total ác. grasos
n-6		< 2% total ác. grasos	< 2% total ác. grasos
Hidratos de carbono	7-14 g/100Kcal	8-12 g/100 kcal	9-14 g/100 kcal
Lactosa		3-12 g/100 kcal	>4.5 g/100 kcal
Vitamina A	250 UI/kg/día	75-150 µg/100 kcal	60-80 µg/100 kcal
Vitamina D	50 UI/kg/día	1-2 µg/100 kcal	1-2.5 µg/100 kcal
Vitamina E	0.5 UI/kg/día	0.6-10 mg/100 kcal	0.5-5 mg/100 kcal
Vitamina K	0.5-1 µg/kg/día	> 4 µg/100 kcal	4-25 µg/100 kcal
Tiamina	50 µg/kg/día	> 40 µg/100 kcal	60-300 µg/100 kcal
Riboflavina	60-70 mg/kg/día	> 60 µg/100 kcal	80-300 µg/100 kcal
Niacina	80-90 µg/kg/día	> 0.25 µg/100 kcal	300-1500 µg/100 kcal
Piridoxina	50 µg/kg/día	35 µg/100 kcal	35 µg/100 kcal
Pantoténico	300 µg/100 kcal	300 µg/100 kcal	400-2000 µg/100 kcal
Biotina	1.5 µg/100 kcal	1.5 µg/100 kcal	1.5-7.5 µg/100 kcal
Ácido fólico	3.5-4 µg/100 kcal	> 4 µg/100 kcal	10-50 µg/100 kcal
Vitamina B ₁₂	0.05 µg/kg/día	> 0.15 µg/100 kcal	0.1-0.5 µg/100 kcal
Vitamina C	5 mg/kg/día	> 8 mg/100 kcal	10-30 mg/100 kcal
Sodio	20 mg/kg/día	23-40.5 mg/100 kcal	20-60 mg/100 kcal
Potasio	83.3 mg/kg/día		60-160 mg/100 kcal
Cloro	30 mg/kg/día		50-160 mg/100 kcal
Calcio	66.6 mg/kg/día	> 60 mg/100 kcal	50-140 mg/100 kcal
Fósforo	50 mg/kg/día	30-50 mg/100 kcal	25-90 mg/100 kcal
Ca/P		1.2/2	1-2
Magnesio	7 mg/kg/día	6 mg/100 kcal	5-15 mg/100 kcal
Hierro		0.1-0.2 mg/100 kcal	0.3-1.3 mg/100 kcal
Zinc	> 0.7 mg/100 kcal	0.3 mg/100 kcal	0.5-1.5 mg/100 kcal
Cobre	65-100 µg/kg	30 µg/100 kcal	35-100 µg/100 kcal
Manganeso	50-100 µg/kg	5 µg/100 kcal	1-100 µg/100 kcal
Selenio			1-9 µg/100 kcal
Molibdeno			
Cromo			
Iodo		5 µg/100 kcal	10-50 µg/100 kcal

2. Lactancia materna versus preparados para lactantes

2.1 Composición de la leche materna

En la leche humana existen más de 200 componentes reconocidos, durante los siete primeros días posparto, a la leche producida se le denomina calostro, el cual destaca por su alto contenido en proteínas como factores inmunológicos (Ballabio, 2007). Después de la primera semana, la leche va cambiando su composición y dos a tres semanas después tiene las características de la leche madura (Manso, 2007). Sin embargo, como nacen niños a término y pretérmino, los estudios de las últimas décadas muestran que la composición de la leche humana varía según la edad de gestación. La leche prematura tiene mayor cantidad de proteínas y menor cantidad de lactosa, como si se adaptara a las condiciones fisiológicas del recién nacido. No obstante, se sabe que los niños prematuros alimentados por su propia madre, requieren para alcanzar una velocidad de crecimiento semejante a la intrauterina, de suplementos con proteínas, minerales y algunos oligoelementos.

Hidratos de carbono. El principal hidrato de carbono de la leche humana es la lactosa. Su concentración es de alrededor de 70 g/l y ejerce hasta 70% de la presión osmótica. A diferencia de los lípidos, su concentración prácticamente no varía a pesar de las modificaciones dietéticas y de las condiciones nutritivas de la madre. Existen otros oligosacáridos cuya función está asociada a mecanismos de defensa del niño contra la infección. Además se encuentran: glucosa libre, glucoproteínas, glucolípidos, *N*-acetilglucosamina y ácido siálico, los cuales se hallan presentes a nivel global en concentraciones de 12 a 24 g/l.

Proteínas. Las proteínas de la leche humana se clasifican en caseína y proteínas del suero. Las caseínas de la leche humana son beta y kappa caseína y no contiene alfa y gama que son exclusivamente bovinas. De las proteínas del suero, la proteína por excelencia por su calidad nutritiva es la α -lactoalbúmina, en tanto que la β -lactoalbúmina es prerrogativa de la leche de vaca y su calidad nutritiva está orientada a los bovinos. Sin embargo, es importante mencionar que la leche humana contiene compuestos nitrogenados que no son proteínas pero que son importantes tanto por su

cantidad como por su función y representan alrededor de 25% del nitrógeno total y lo integran: aminoácidos libres, péptidos, *N*-acetilazúcares, urea, factores de crecimiento y nucleótidos cuyo papel en la respuesta inmunológica ha adquirido relevancia en los últimos años.

Lípidos. La cantidad de lípidos contenidos en la leche humana es de alrededor de 35-45 g/l, y constituyen la mayor fuente energética de la misma (40-55%). Son transportados dentro del glóbulo de grasa cuya membrana está compuesta principalmente de proteínas, fosfolípidos y colesterol (100-150 mg/l), en tanto que el interior del glóbulo de grasa lo constituyen principalmente triacilglicéridos. El contenido de grasa se aproxima al 98% de triacilglicéridos y 2% de colesterol, ésteres de colesterol y fosfolípidos. Además existen más ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como el ácido araquidónico (AA) y el docosahexaenóico (DHA) en la leche materna que en la leche de vaca (García, 2007). La digestión y la absorción de los ácidos grasos procedentes de la grasa de la leche de vaca es menos eficaz que la de los lípidos de la leche materna debido a que la actividad de la lipasa intestinal produce 1-, 3-monoacilgliceroles en vez de 2-monoacilgliceroles, en particular, ácido palmítico, que son las formas que se absorben más eficazmente en el intestino de los lactantes. Parece ser que la concentración de lípidos en la leche humana está asociada al tipo de lípidos ingeridos por la madre y con la conformación de lípidos de sus reservas en el tejido adiposo. Además, cuando la dieta es pobre y las reservas escasas, la cantidad que contiene la leche materna disminuye como sucede en mujeres con alimentación deficiente.

Vitaminas y nutrientes inorgánicos. Existen en la leche humana vitaminas tanto hidrosolubles como liposolubles y, al parecer, se transfieren directamente de la dieta y las reservas de la madre. Las vitaminas A, D, B₆ y B₁₂ tienen una dependencia especial de la dieta de la madre. Esto significa que su ausencia en la dieta o en reservas maternas pone en riesgo al lactante de presentar deficiencias.

En cuanto a los nutrientes inorgánicos, algunos como el calcio, fósforo y magnesio, desarrollan una transferencia estrictamente regulada de la sangre a la leche y no se espera que a mayor ingesta de estos minerales se traduzca en mayores concentraciones en la leche. En cambio, algunos electrólitos como el sodio, potasio y cloro no tienen esta regulación estricta sino que son secretados en la glándula mamaria y alcanzan una concentración en la leche de 7, 15 y 12 meq/l, respectivamente. En general el contenido

de minerales y electrolitos de la leche de vaca es al menos tres veces superior al de la leche materna. Gran parte de estos constituyentes se asocian a las fosfoproteínas presentes en la caseína. La concentración de hierro en la leche humana (0.5 mg/l) es bastante constante y se comporta en forma independiente de la reserva materna. De la cantidad descrita se absorbe aproximadamente 50% vs. 4-7% del hierro procedente de la leche de vaca. El zinc y el cobre tienen concentraciones altas en el calostro y declinan sin relación con las reservas maternas.

Se requieren diversas modificaciones para obtener, a partir de la leche de vaca, una fórmula para lactantes cuya composición sea similar a la de la leche materna, por lo que es importante conocer las diferencias entre ambas (Tabla 3). El proceso implica normalmente utilizar suero desmineralizado como ingrediente base, y ajustar la relación caseína/suero mediante adición de leche descremada y caseína. Luego se puede añadir lactosa (con o sin maltodextrinas para incrementar el contenido de hidratos de carbono), vitaminas y minerales, junto con mezclas de aceites normalmente de origen vegetal.

2.2 Alimentación con preparados para lactantes

Durante el siglo pasado, el recurso de la alimentación láctea con biberón u otros utensilios despertó el interés entre la población europea. Sin embargo, desde entonces fue reconocido el riesgo insuperable de infección del lactante alimentado con este método. Forsyth en 1910 pensaba que la leche de vaca como alternativa de la leche materna era una realidad y que el pecho materno no era esencial para el lactante (Kuhn, 2002). Desde entonces, se han visto muchos cambios en la alimentación del lactante, desde la mejora extraordinaria de las leches industrializadas y fórmulas modificadas, pasando por las grandes controversias sobre su uso en población con condiciones higiénicas deplorables, hasta el resurgimiento a partir de la década de los setenta de la alimentación con leche materna, que en la actualidad se considera insuperable por la gran cantidad de propiedades nutritivas, inmunológicas y psico-afectivas que hasta la fecha no han logrado los preparados para lactantes (Raiten, 2007). La composición y el uso de los sustitutos de la leche materna sólo han empezado a regularse y armonizarse a niveles nacionales e internacionales en los últimos 30 años (Anonymous, 1976;

96/4/CE; Falk, 1998; Raiten, 1998; Raiten, 1999; Gibson, 2000; Dary, 2002; Klein, 2002; Sievers, 2003; Fanaro, 2005; 2006/141/CE).

Tabla 3. Composición representativa de la leche de vaca y la leche materna madura. Adaptada de: (Tojo, 2001)

	Leche Materna	Leche de Vaca
Valor energético (kcal/100 ml)	62-75	68-70
Proteínas (g/l)	10.7	33
Caseínas (%)	40-50	77-82
Seroproteínas (%)	50-60	18-20
N no proteico (% N total)	15-25	6
Lípidos (g/l)	42	38
Hidratos de Carbono (g/l)	74	48
Sodio (mg/l)	150	350-900
Potasio (mg/l)	600	1100-1700
Calcio (mg/l)	352	1100-1300
Magnesio (mg/l)	29	90-140
Fósforo (mg/l)	150	900-1000
Cloro (mg/l)	430	900-1100
Hierro (µg/l)	760	300-600
Cobre (µg/l)	380	100-600
Zinc (mg/l)	3	2-6
Vitamina A (µg/l)	600	270-360
Vitamina D (µg/l)	0.1	0.2
Vitamina E (µg/l)	3.5	0.9
Vitamina K (µg/l)	15	10-85
Tiamina (µg/l)	160	300-600
Riboflavina (µg/l)	310	1500-2300
Ácido nicotínico (mg/l)	2.3	0.6-1.3
Piridoxina (µg/l)	59	210-720
Vitamina B ₁₂ (µg/l)	0.1	3
Ácido fólico (µg/l)	52	50
Vitamina C (mg/l)	38	20
Ácido pantoténico (mg/l)	2.6	2-5
Biotina (µg/l)	7.6	10-13

En la Unión Europea la composición de las fórmulas para lactantes, y las de las fórmulas de continuación, está regulada por Directivas y enmiendas elaboradas en desde 1991. La Directiva de 1991 permitía a los estados miembros de la unión europea presentar propuestas de enmienda a la composición de las fórmulas para lactantes, y desde 1991 se ha autorizado la inclusión de nucleótidos, selenio y ácidos grasos de cadena larga (Schlimme, 1999; Tojo, 2001). La Unión Europea (2006/141/CE) regula

más de 50 componentes de los preparados para lactantes y establece los límites superiores de la mayoría de éstos, lo que supone una normativa más rigurosa que la de la “Food and Drugs Administration” de Estados Unidos.

Existen tres recomendaciones generales para utilizar la alimentación con fórmula:

- a. Sustitución en lactantes cuyas madres no pueden o no desean amamantar.
- b. Suplementación para lactantes cuyas madres desean interrumpir la lactancia.
- c. Complementación cuando la producción de leche materna es insuficiente.

Asimismo pueden existir indicaciones médicas mayores para sustituir la lactancia materna:

- a. Enfermedades infecciosas como: listeriosis neonatal, hepatitis B materna, SIDA, varicela, tosferina, tuberculosis activa y lesiones herpéticas o sifilíticas en el pecho materno.
- b. Precaución extrema en enfermedades metabólicas, toxemia, uso de drogas, tirotoxicosis materna con tratamiento antitiroideo.

La leche humana es un complejo y completo alimento, específico para el recién nacido, que en condiciones normales le provee de todos los nutrientes requeridos para el perfecto desarrollo durante los primeros 4-6 meses de vida, y por tanto, debe constituir el método de elección de alimentación del lactante. No obstante como se ha comentado anteriormente existen diversas situaciones, aunque excepcionales, que pueden contraindicar la lactancia materna. En este caso se ha de recurrir a los preparados para lactantes. Éstos han sido diseñados y regulados por diferentes comités, para asegurar que las necesidades nutricionales de los lactantes sean cubiertas. La UE (2006/141/CE) realiza las siguientes definiciones:

Lactantes: los niños que tengan menos de 12 meses

Niños de corta edad: los niños entre uno y tres años de edad

Preparados para lactantes: Los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes durante los primeros meses de vida que satisfagan por sí

mismos las necesidades nutritivas de estos lactantes hasta la introducción de una alimentación complementaria apropiada.

Preparados de continuación: los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes cuando se introduzca una alimentación complementaria apropiada que constituyan el principal elemento líquido de una dieta progresivamente diversificada de estos lactantes.

2.3 Papel de los lípidos en el crecimiento, el desarrollo y en la salud

La leche humana suministra a los niños lactantes aproximadamente el 50% de la energía ingerida como lípidos (considerando la leche madura), la mayoría de los ácidos grasos son incluidos en forma de triacilglicéridos (98-99%). Una mínima cantidad, esta integrada por los fosfolípidos, monoacilglicéridos, diacilglicéridos y colesterol. De acuerdo con la literatura, el promedio del contenido de lípidos en la leche humana debe cambiar de 2 g/dl en el calostro, a 5 g/dl en la leche madura. Estos valores además son afectados por muchas variables que hacen particularmente difícil la interpretación de los estudios que tienen por objetivo la medición del contenido y composición de los lípidos en la leche humana (García, 2007; Quinn, 2007). El contenido total de lípidos de la leche humana, se incrementa durante la toma y con el estado de lactación, es influenciado por la edad gestacional al nacimiento, los hábitos alimenticios y el ritmo diurno de la madre, y puede decrecer con paridad en casos de desórdenes metabólicos maternos (Jensen, 1996). La edad postconcepcional y algunos desórdenes metabólicos maternos, inclusive, los hábitos dietarios de la madre pueden afectar también la composición de la grasa en la leche materna. Los principales factores dietarios que determinan la composición lipídica de la leche humana son los hidratos de carbono y los LC-PUFA ingeridos. Se ha visto que las mujeres que habitualmente tienen un elevado consumo de pescado, tienen niveles incrementados de LC-PUFA n-3 sin modificaciones importantes de AA (Innis, 1988). También cuando mujeres lactantes se suplementaron con dosis farmacológicas de DHA, los niveles de DHA en su leche incrementaron correlacionadamente (Makrides, 1996). Parece ser que los niveles de LC-PUFA n-3 en la leche humana son más dependientes del suministro dietario que los LC-PUFA de la serie n-6 (Yuhás, 2006). Durante el embarazo, los almacenes maternos y la ingesta

dietaria de ácidos grasos n-3 son muy importantes para asegurar que el feto tenga cantidades adecuadas de n-3 al tiempo de nacer. Todos los PUFA, incluyendo el DHA, son transferidos a través de la placenta, a la sangre del feto. Además, el DHA en el tejido adiposo, puede ser movilizado como ácido graso libre enlazado a la albúmina y estar disponible para el desarrollo fetal vía transporte placentario (Connor, 2000).

Los ácidos grasos n-3, no sólo son nutrientes esenciales, sino que pueden modular muchas enfermedades (Sinclair, 2007). El DHA es un componente vital de los fosfolípidos de las membranas celulares, y es especialmente rico en el cerebro, la retina y los espermatozoides, en los que el DHA constituye aproximadamente el 36.4% del total de ácidos grasos (Judge, 2007). Los ácidos grasos n-3 son necesarios para la concepción desde el embarazo, la infancia e indudablemente durante toda la vida. Una característica importante es su papel en la prevención y modulación de ciertas enfermedades:

1. Enfermedad coronaria, apoplejía.
2. Deficiencia de ácidos grasos esenciales en la infancia, problemas en el desarrollo del cerebro y la retina.
3. Desórdenes autoinmunitarios (ejemplo: lupus, neuropatía).
4. Enfermedad de Crohn
5. Cáncer de pecho, colon y próstata.
6. Hipertensión leve
7. Artritis reumatoide.

La evidencia más fuerte, de la relación entre los ácidos grasos n-3 y la enfermedad, es la relación inversa entre la cantidad de éstos en la dieta, en sangre y en tejidos, con la ocurrencia de enfermedades del corazón y sus múltiples complicaciones. Las dietas altas en grasas saturadas y colesterol son nocivas para la enfermedad coronaria, mientras que los ácidos grasos n-3 provenientes del pescado, son protectores y previenen la muerte por enfermedades del corazón, (Connor, 2000):

- Previenen arritmias (taquicardia ventricular y fibrilación)
- Son precursores de prostaglandinas y leucotrienos
- Tienen propiedades antiinflamatorias

- Inhiben la síntesis de citocinas
- Estimulación endotelial derivada del óxido nítrico NO
- Son antitrombóticos
- Tienen propiedades hipolipidémicas con efectos en triacilglicéridos y VLDL
- Inhiben aterosclerosis

Hay dos periodos críticos para la adquisición de los ácidos grasos esenciales n-3, durante el desarrollo fetal y después de nacer, hasta que el desarrollo bioquímico en el cerebro y la retina se ha completado (Vidailhet, 2007). Como ya se ha dicho, el DHA es un importante constituyente de los fosfolípidos de la membrana de las estructuras neurales, usualmente ocupando la posición sn-2. Un ejemplo típico es la fosfatidiletanolamina, especialmente rica en cerebro y retina. Otros fosfolípidos en los que el DHA tiene una característica prominente incluye la fosfatidilcolina, o lecitina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, cerebrósidos y esfingomielina (Connor, 2000).

No es del todo sabido si es una necesidad en la dieta humana la ingesta de DHA, considerando que puede ser sintetizado a partir del ALA (Georgieff, 2007). Por lo que la pregunta de si el DHA debe ser proporcionado por los preparados para lactantes, además del ALA ha despertado mucho interés en los investigadores y muchos estudios al respecto se han desarrollado, en animales y en humanos. El DHA es ciertamente transferido a través de la placenta al feto durante el embarazo y esta siempre presente en la leche humana, incluyendo ALA. También la proporción adecuada en la dieta n-6/n-3 ha sido investigada, pues se sabe que un desequilibrio puede acentuar la deficiencia de los n-3 (Figura 1). Es generalmente recomendado que la proporción de ácidos grasos totales n-6/n-3 en los preparados para lactantes sea 10/1 o menos, con 4/1 ó 5/1 dado como el límite más bajo (Hernell, 1991; Billeaud, 1997; Jumpsen, 1997; Yeh, 1998; Fleith, 2005).

2.3.1 Papel de los LC-PUFA en el desarrollo visual y cerebral

Evidentemente existe una relación directa entre una buena nutrición y un desarrollo infantil óptimo, particularmente del cerebro. Afortunadamente el desarrollo cerebral es algo resistente a las deficiencias nutricionales. Para dos tipos de deficiencias como el

hierro y los LC-PUFA es fácil separar el papel de la deficiencia nutricional del de la psicosocial, aunque no del todo. El DHA es un componente esencial en el sistema nervioso y las altas concentraciones en el córtex cerebral y la retina indican su importancia en el desarrollo y mantenimiento de la función neural y visual, donde regula importantes funciones de la membrana como canales de iones, actividades de receptor y actividades enzimáticas proveyendo ultraestructuras específicas dentro de la bicapa de fosfolípidos (Xiang, 1999; Judge, 2007).

Los campos del comportamiento pueden en general ser categorizados como sensoriales, motores, motivacionales y de excitación, cognoscitivos y sociales. Diferencias en éstos ocurren debido a cambios en la estructura y la función cerebral. El DHA y AA son los mayores componentes estructurales en el cerebro que decrecen cuando se consumen dietas deficientes en ácidos grasos esenciales ALA y LA (Carlson, 2000; Sinclair, 2007). Al parecer los bebés a término son perfectamente capaces de sintetizar DHA de la serie n-3 y AA de la n-6 en cantidades suficientes para su desarrollo cerebral normal a partir de dietas que contengan los precursores de las dos serie en proporciones adecuadas. Para niños de bajo peso al nacer, el AA no parece ser necesario, y para el DHA la discusión permanece abierta (Vidailhet, 2007). El interés en los LC-PUFA creció en los años setenta cuando se demostraron las grandes cantidades de productos finales de los procesos de elongación y desaturación de las dos serie de ácidos grasos, específicamente el DHA de la serie n-3 y el AA de la serie n-6 en el cerebro de recién nacidos que murieron en accidentes o enfermedades agudas (Martinez, 1978; Ballabriga, 1978). Posteriormente, ha surgido mucha investigación al respecto y los resultados son contradictorios en torno a si es o no necesaria la suplementación de DHA y AA, o de sus precursores. Estudios electrofisiológicos y conductuales en roedores deficientes en ácidos grasos esenciales, mostraron efectos conductuales atribuibles a una acumulación más baja de lo normal de DHA y AA en el cerebro. Más recientemente han sido realizados estudios del mismo tipo en primates y luego en humanos (Carlson, 2000; Georgieff, 2007; Krabbendam, 2007; Innis, 2007).

Un estudio en niños de bajo peso al nacer, después de 7 años de seguimiento, mostró una diferencia en el coeficiente intelectual entre niños que recibieron de su madre la leche materna que entre aquellos que recibieron fórmula conteniendo sólo el precursor del AA (Lucas, 1992). Mientras tanto, en niños a término la evidencia es aún menos concluyente, y parece existir un consenso de que el niño es perfectamente capaz de sintetizar tanto el DHA como el AA en suficiente cantidad para el desarrollo normal del

cerebro, si la dieta contiene precursores de las dos series en proporciones adecuadas, a saber, 15% de los ácidos grasos como LA (n-6) y un 1.5% como ALA (Guesry, 1998).

En cuanto al desarrollo visual, estudios en animales y humanos han documentado diversos efectos y concentraciones de los LC-PUFA de la dieta en la función retinal y la visión. El elevado desarrollo visual asociado con incrementos en la ingesta de LC-PUFA, particularmente DHA, provee de evidencia fuerte de la importancia de estos ácidos grasos en la nutrición infantil (Singhal, 2007; Judge, 2007). Bebes de bajo peso al nacer que recibieron fórmulas excesivamente ricas en precursores sólo de AA, el cual es sabido que disminuye la síntesis de DHA (Figura 1), tuvieron una agudeza visual más baja que los niños de bajo peso alimentados con pecho y que los que recibieron precursores del DHA (Uauy, 1990; Mackrides, 1995).

Hay dos medidas primarias usadas para evaluar la eficacia de la suplementación de los preparados para lactantes con LC-PUFA, el electroretinograma y la agudeza visual (Neuringer, 2000).

El electroretinograma (ERG) es una medida de la función retinal, es un potencial eléctrico provocado por la luz. Este surge totalmente dentro de la retina, pero puede ser registrado en la superficie de la córnea. El ERG estándar en humanos es registrado con unos lentes de contacto que tienen un electrodo, después de la dilatación de la pupila con gotas para los ojos y la aplicación de una gota de anestésico tópico. Los estímulos son breves destellos de luz tipificados, presentados dentro de una bóveda difusora que provoca un estímulo del campo total, que es una luz de intensidad equilibrada a través de toda la retina. Un protocolo estandarizado para propósitos clínicos fue desarrollado (Marmor, 1989), y es posible obtener buenos registros de niños de aproximadamente 6 meses de edad. Un registro práctico de ERG requiere de un equipo considerable (incluyendo un fotoestimulador, preamplificadores fisiológicos, y un sistema computarizado para analizar las señales) y de experiencia personal.

Por otro lado la agudeza visual es la habilidad de resolución de detalle fino espacial en una imagen visual. Ya que el ERG estándar representa una respuesta sumatoria de toda la retina, y no provee de información acerca de la resolución espacial.

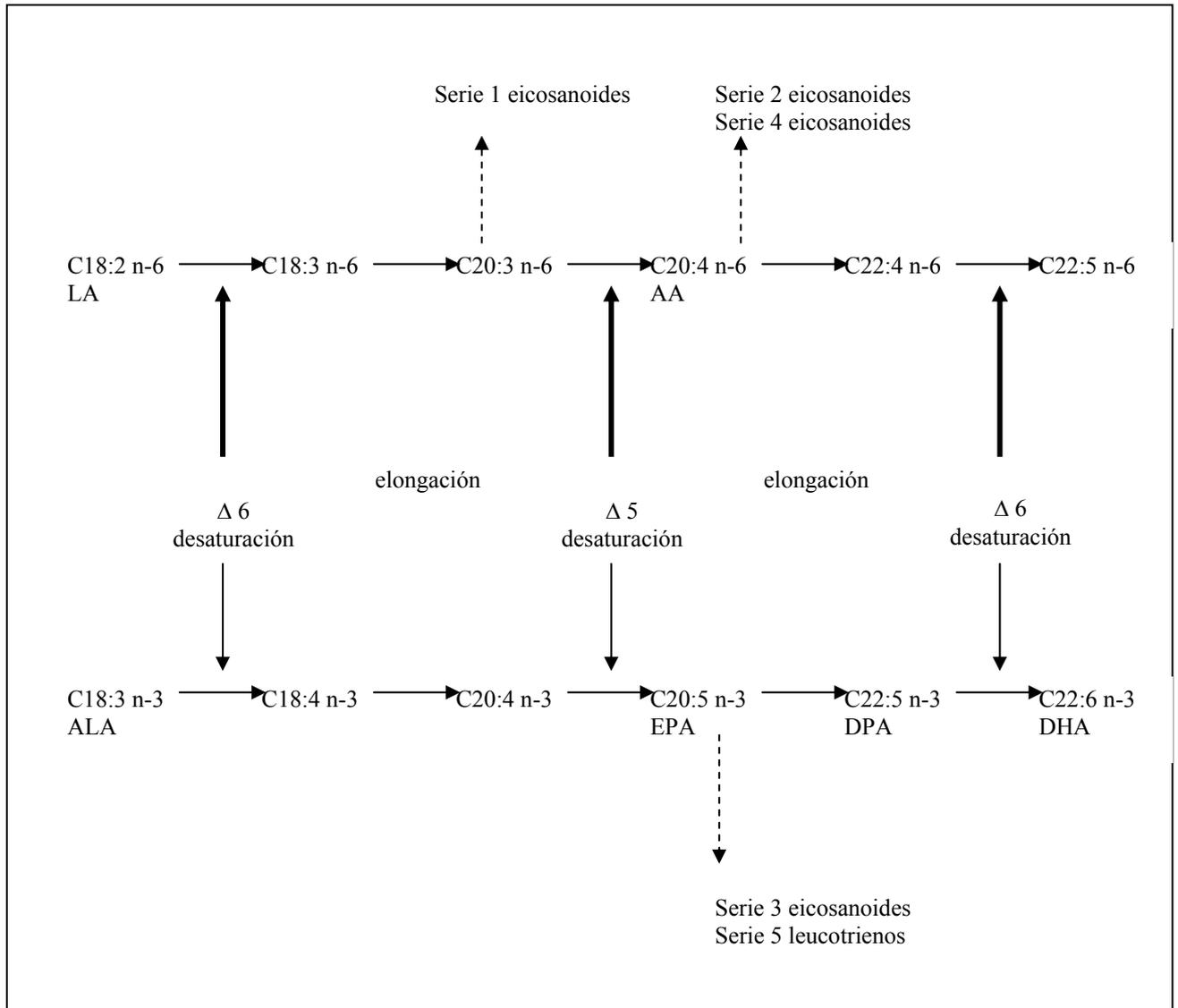


Figura 1. Precursores y síntesis de los ácidos grasos n-3 y n-6. De: (Guesry, 1998).

En los adultos, y también probablemente en los niños, una buena agudeza visual depende de la función de la fovea (Figura 2). El proceso de visión inicia cuando la luz es dirigida hacia la córnea y el cristalino sobre la capa de fotorreceptores en el fondo del ojo. La fovea contiene la densidad más alta de cono-receptores y es responsable de la alta agudeza visual. En la mayoría de la retina, la luz pasa a través de otras células de la capa de fotorreceptores. Sin embargo, en el centro de la fovea, estas células son desplazadas para permitir una vía de luz más clara para los conos y por lo tanto una imagen más aguda. La fovea representa menos del 1% de la superficie total de la retina, y por lo tanto hace negligible la contribución de un ERG, inclusive cuando las respuestas del cono se separen. Por lo que enfermedades de la retina que afecten selectivamente la fovea pueden degradar severamente la agudeza sin que pueda ser

medido por el ERG, mientras que para enfermedades que selectivamente afecten los bastones fotorreceptores es válido.

Existen varias maneras de evaluar la agudeza visual como por ejemplo identificar letras o formas ("optotipos"). No obstante esto no se puede realizar con niños pequeños. Lo que se realiza son pruebas de comportamiento y/o electrofisiológicas, de acuerdo con lo siguiente.

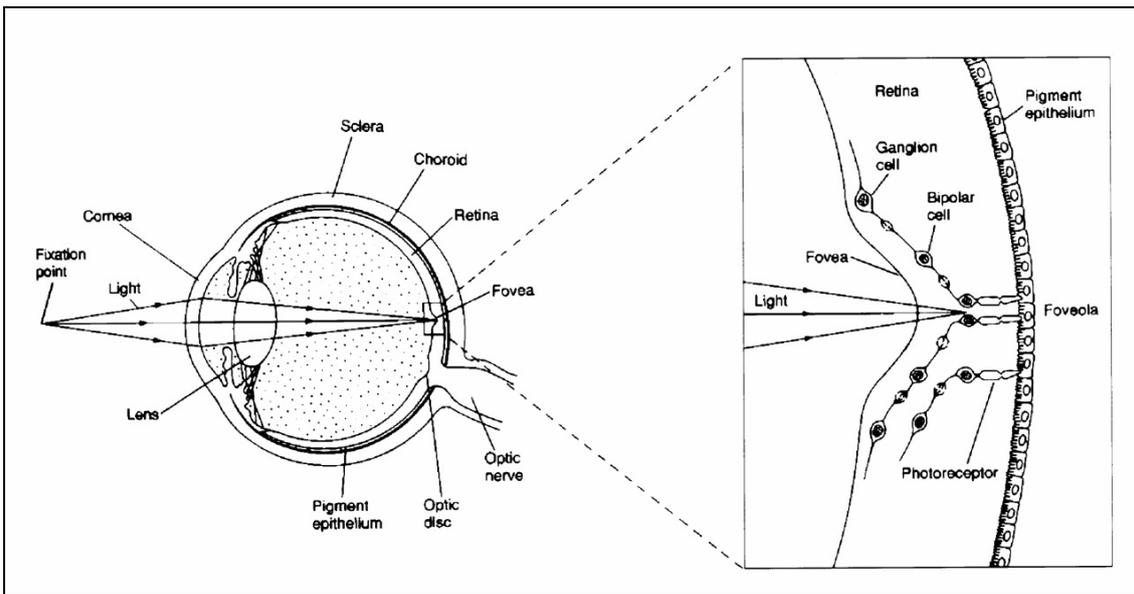


Figura 2. Proceso de visión. De: (Neuringer, 2000).

El examen de la agudeza visual se puede realizar por métodos, objetivos y subjetivos. Los primeros, se utilizan en los niños menores de 2 años y son técnicas en las que los niños apenas tienen que colaborar y por lo tanto la agudeza visual se analiza de manera indirecta y sin poder cuantificarla. Los métodos subjetivos se utilizan en los niños por encima de los 2 años y permiten una valoración directa de la agudeza visual.

Pruebas objetivas. En el prematuro de 30 semanas de edad gestacional, el reflejo del cierre y contracción palpebral que se provoca al intentar abrirlos siempre esta presente. En el 100% de los recién nacidos entre 35 y 37 semanas de gestación se observa el reflejo fotomotor, así como una contracción palpebral al intentar abrir los párpados acompañadas de movimientos en las extremidades. El recién nacido a término tiene el reflejo fotomotor, el reflejo del cierre palpebral por excitación nasal y ante la luz con un movimiento de la cabeza hacia atrás al intentar abrirlos (reflejo de Peiper). En la

primera semana la movilidad de los ojos es limitada y la apertura de los párpados es esporádica. En la segunda semana desaparece el reflejo de Peiper y aparece el reflejo de intentar quitar la mano del que intenta abrirle los párpados y el niño ya inmoviliza los ojos como si fijase la visión mejorando los movimientos coordinados de ellos. A las cuatro semanas aparece el reflejo de fijación, presenta ya una sinergia (coordinación) entre los movimientos de los ojos y la cabeza y ya cierra los ojos de manera espontánea si se le acerca un objeto y empieza a aumentar los desplazamientos oculares cuando se le presenta un objeto que le llame la atención. Entre el primer y segundo mes de vida ya se tiene que tener la capacidad de fijación y seguimiento de objetos y si esta presente indica una buena capacidad visual. La agudeza visual en un niño recién nacido a término no es mayor de un 5 % (20/400) que irá aumentando con la edad.

Existen métodos para explorar la agudeza visual como es el test de las bolas calibradas de Sheridan pero quizás el más práctico aunque no se pueda cuantificar la visión es apreciar la diferencia de visión entre un ojo y otro mediante la oclusión de uno de ellos mientras se estudia el comportamiento del niño. Luego tapar el otro ojo y comparar si el comportamiento es el mismo que con el otro.

Pruebas subjetivas. Las pruebas subjetivas permiten la valoración directa de la agudeza visual. Se consigue mediante la utilización de diferentes tests. Cada uno de los signos contenidos en los test se denomina "optotipo". Estos pueden ser de dibujos, direccionales, geométricos y letras. En los niños más pequeños el aprendizaje previo al examen es de suma importancia y lo pueden realizar los padres mostrándoles imágenes de referencia. Utilizando los test direccionales en un niño de 3 años la agudeza visual debe ser del 10/10. Pero dependiendo del tipo del test, los márgenes de la agudeza visual que se alcanzan con cada uno de ellos para cada edad varían considerablemente, de tal manera que una agudeza visual de 10/10 sólo se alcanzará a los 6 años con el test de los optotipos de letras.

Para conocer la visión en los niños más exactamente podemos emplear el nistagmus optocinético, los potenciales visuales evocados (VEP), el método de la mirada preferencial (método conductual) y examen por visuscopio. El VEP es una prueba electrofisiológica que mide la sensibilidad del córtex, pero esta es también dependiente de la retina y de la vía retinocortical. Por lo que si un déficit intenso es producido por una disfunción retinal, será reflejado en la información transmitida de la retina al córtex.

Mientras que el VEP refleja los estados iniciales del proceso cortical de un estímulo visual, las medidas conductuales (de comportamiento) de la agudeza visual proveen la medida más directa de lo que un niño puede percibir.

La agudeza visual es sólo una de las varias habilidades que pueden ser evaluadas en la visión infantil, pero otras determinaciones útiles son la sensibilidad al contraste blanco / negro, la hiperagudeza de localización, la binocularidad (2 ojos) y la visión en color.

Las membranas de los fotorreceptores de la retina, contienen grandes cantidades de DHA, en la mayoría de los fosfolípidos de las membranas de los discos, éste ácido graso se encuentra en un 50-60% del total de los ácidos grasos (Fliesler, 1983). Se ha demostrado que éste alto contenido de DHA es importante para la máxima actividad fotoquímica de la rodopsina, el pigmento visual de los bastones (Figura 3). Por lo que el borde de la rodopsina, rodeada de fosfolípidos ricos en DHA es más fácilmente que sea activado por la luz y que comience la secuencia de los eventos bioquímicos que se conducen a una señal neuronal (Wiedmann, 1988). Además de los altos niveles encontrados de DHA en la retina, también se ha observado su conservación activa en este tejido. La retina posee un sistema eficiente de conservación y reciclaje que ayuda a preservar el DHA retinal durante periodos prolongados de baja ingesta de ácidos grasos n-3. Todo ello sugiere que éste ácido graso tiene una función importante en la retina y el proceso visual (Jeffrey, 2001; Singhal, 2007).

En resumen, la retina contiene células responsables de capturar la luz y translucirla a los conos y bastones. Los bastones tienen una alta sensibilidad a bajos niveles de iluminación, pero no prevén la visión en color o alta resolución espacial. Los conos proveen las bases para la visión en color y la habilidad de ver sobre un amplio rango de intensidades de luz en el día. Los conos están apretadamente empaquetados dentro de la fovea, que provee las bases para la alta agudeza visual. Las células fotorreceptoras contienen distintos compartimentos, el interno y el externo. El segmento interno contienen los componentes necesarios para el metabolismo celular, mientras el segmento externo contiene fotopigmentos que absorben los fotones de la luz. El segmento externo de los bastones contiene miles de discos apilados verticalmente que son ricos en DHA y el fotopigmento rodopsina (Figura 3).

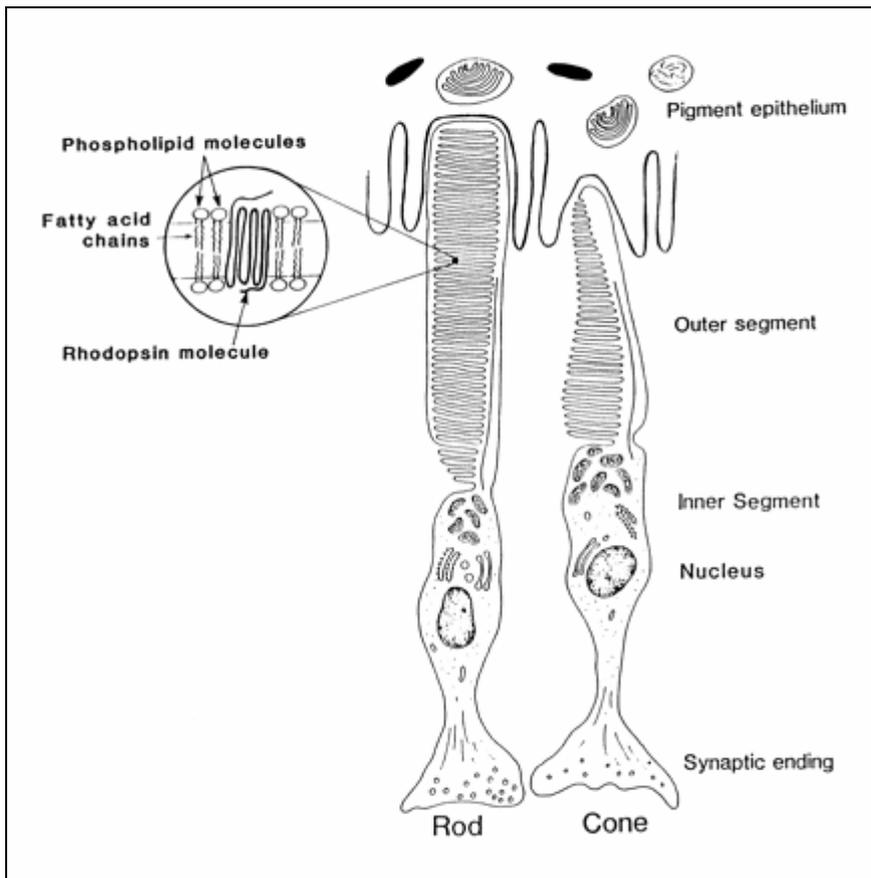


Figura 3. Estructura de los conos y bastones en los que se aprecia la molécula de rodopsina. De: (Neuringer, 2000).

Dentro de la retina, el DHA es incorporado primariamente en glicerofosfolípidos estructurales en la membrana celular. El DHA en humanos representa del 8 al 20% de los ácidos grasos totales en la retina y del 38 al 92% de los PUFA en la retina (Jeffrey, 2001).

Los ácidos grasos de la serie n-3 han mostrado la influencia que tienen, tanto en el VEP como en las medidas conductuales. Por lo tanto, el sitio de su efecto parece que es dentro de la retina o una vía siguiente y que incluye el córtex visual primario, o ambos, pero el sitio no se ha determinado realmente a partir de la información actualmente disponible (Neuringer, 2000).

Diversos estudios han provisto de evidencia de un “periodo crítico” durante el desarrollo de la retina cuando un inadecuado suministro de DHA en la retina resulta en una disfunción retinal permanente que no puede ser normalizada aún cuando el DHA retinal regrese a lo normal. La extensión de estos periodos críticos con respecto a la

edad o al estado de desarrollo de la retina debe ser aún determinado (Jeffrey, 2001; Singhal, 2007; Judge, 2007).

2.4 Suplementación con LC-PUFA

El papel de los LC-PUFA en la nutrición infantil está siendo ampliamente investigado por sus implicaciones en el crecimiento y desarrollo (Giovannini, 1995; Georgieff, 2007; Krabbendam, 2007). Los ácidos grasos más representativos de los LC-PUFA son el AA, y el DHA, los cuales son derivados de los precursores de 18 carbonos, el LA, y el ALA, respectivamente. Los ácidos grasos n-3, como el ALA existen en varios alimentos naturales como por ejemplo en el aceite de soja y de colza, mientras que el DHA principalmente se encuentra en pescados, algas marinas, mariscos, y también se obtiene de aceites sintetizados por microorganismos unicelulares SCO (CraigSchmidt, 1996; Alessandri, 1998; Xiang, 1999; Merritt, 2003).

Mientras que el AA puede ser fácilmente sintetizado del LA (el más abundante de LC-PUFA como fuente en alimentos naturales), la síntesis del DHA del ALA experimenta una vía anabólica más larga y complicada que la del LA (Agostoni, 1999). La eficiencia por la cual aumentan en los niveles en sangre cuando son introducidos “preformados” en la dieta, no es totalmente operativa en niños nacidos pretérmino. Realmente, los niños suministrados con DHA a través de la leche humana han mostrado niveles más altos de esta molécula en las principales estructuras del sistema nervioso central. La adición de DHA en fórmulas para niños pretérmino han resultado en mejoras en las respuestas neurofuncionales en los bebés, mientras que los beneficios de la suplementación dietaria de LC-PUFA de niños a término alimentados con fórmulas, aún no es concluyente (Makrides, 2000; Vidailhet, 2007; Georgieff, 2007).

Una cuestión crucial para la comunidad científica, se refiere a la cantidad y clases de ácidos grasos n-3 que deberían ser incluidos en los preparados para lactantes. Las recomendaciones nutricionales y de salud sobre el uso de los PUFAs datan de 1975, cuando la Organización de Alimentación y Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Salud (OMS) recomendaron que los preparados para lactantes deberían imitar la composición de la leche humana. Desde entonces diversas recomendaciones nutricionales relativas al uso del DHA y AA han sido propuestas (Tabla 4). Es por

supuesto y completamente aceptado que los preparados para lactantes deben contener cantidades adecuadas de n-6. En este contexto la historia de los preparados para lactantes es de interés. Pero hoy en día el debate es si los niños pueden desarrollarse óptimamente si se les provee con los ácidos esenciales (linoleico y linolénico), o si es importante además de los ácidos grasos esenciales, la adición de LC-PUFA n-3, básicamente DHA y LC-PUFA n-6, básicamente AA. Este potencial de mejorar los preparados para lactantes, debe hacerse similar al contenido de ácidos grasos en la leche humana (Connor, 2000). Mientras tanto la apuesta en la industria alimentaria es adicionar AA y DHA a los preparados infantiles.

Debido a la importancia que recientemente tiene la adición de LC-PUFA, no sólo a los preparados para lactantes, sino en general en toda la industria alimentaria y farmacéutica, la tecnología busca diversas fuentes de estos ácidos grasos. Los microorganismos han sido considerados como una fuente de producción alternativa, aparte de los animales y la agricultura. No obstante, debido al parecido con los aceites vegetales y grasas animales, es inevitable que tienen que competir con las fuentes tradicionales de lípidos, si se producen comercialmente.

Es claro que con el bajo costo de los aceites vegetales y grasas animales, no se había avanzado mucho en la obtención de aceites de los microorganismos que suponen un coste elevado. No obstante si los microorganismos son capaces de sintetizar aceites en cantidad, que contengan ácidos grasos específicos, que no se encuentran en cantidad en las otras fuentes, su potencial se verá muy acentuado, como esta ocurriendo actualmente. Los PUFAs de más de 18 carbonos, no pueden ser sintetizados por las plantas superiores en ninguna cantidad significativa, debido a que no contienen las enzimas específicas. Por otro lado, el aceite de pescado, es notablemente rico en EPA, DPA y DHA, pero estos aceites imparten olores y sabores indeseables, y su utilización satisfactoria requiere la eliminación del colesterol y pequeñas cantidades de impurezas potencialmente tóxicas (como contaminantes). Otra limitante para usar el aceite de pescado como fuente de PUFA, es la variación en la calidad del aceite y la presencia de ácidos grasos con propiedades antagónicas al AA como el EPA.

Tabla 4. Hechos clave en las recomendaciones relacionadas al uso de DHA y AA como suplementos dietarios.

Año	Suceso
1975	La FAO y la OMS recomendaron que los preparados para lactantes deben imitar la composición de la leche humana.
1991	La ESPGHAN recomendó que los preparados para lactantes para niños pretérmino y a término, deberían incluir AA y DHA.
1992	La Fundación Británica de Nutrición recomendó que los preparados para lactantes para niños pretérmino y a término, deberían incluir AA y DHA.
1993	Una junta del comité de expertos de la FAO y la OMS recomendaron que los preparados para lactantes para niños pretérmino y a término, deberían incluir AA y DHA.
1995	Una extensiva revisión de las reglamentaciones fue realizada por el Ministerio de Salud en Holanda, la cual permitió a los fabricantes de preparados para lactantes usar suplementos comerciales específicos de DHA y AA en los preparados para lactantes.
1995	Un panel independiente de expertos en Estados Unidos (USA) concluyó que suplementos específicos de AA y DHA, pueden tener el estatus de “Generalmente considerado como seguro (GRAS)” para su uso en fórmulas para niños pretérmino y a término.
1996	Un panel independiente de expertos en Estados Unidos concluyó que un aceite específico que contenía DHA podía ser considerado como GRAS para su uso en adultos, incluyendo mujeres embarazadas y lactantes.
1999	Una reunión patrocinada por el Instituto Nacional de Salud (NIH) de USA y la Sociedad Internacional para el Estudio de Ácidos Grasos y Lípidos en Washington DC recomendó que los preparados para lactantes sean suplementadas con DHA y AA.
2002	La agencia de Salud del gobierno de Canadá realizó una crítica favorable de una presentación que apoya el uso de aceites SCO DHASCO® y ARASCO® para preparados para lactantes en Canadá.
2003	Las normas alimentarias de Nueva Zelanda Australia concluyeron que los aceites SCO DHASCO® y ARASCO® son seguros para su uso en preparados para lactantes.
Hoy	Diversos fabricantes de fórmulas utilizan varios tipos de suplementos de AA y DHA para sus preparados para lactantes.

El contenido total de ácidos grasos n-3 depende considerablemente de la estación y localización geográfica de los sitios de pesca, así como de las especies y variedades de peces utilizados, de su fuente de alimentación, etc. Además se presume que los PUFA n-3 serán ampliamente utilizados en fármacos profilácticos de tal forma que la producción actual de pescado marino, podría ser insuficiente para satisfacer las demandas mundiales.

Los microorganismos, como alternativas de producción de los aceites vegetales y grasas animales han sido ampliamente investigados. Ciertos hongos, bacterias marinas, microalgas heterotróficas y fototróficas y musgos, contienen varios tipos de PUFAs, y pueden representar diversas fuentes de ellos. La diversidad de especies microbianas puede facilitar la selección de cepas que producen aceites con un tipo de ácido graso predominante.

En los últimos años se ha llevado a cabo una extensiva investigación y desarrollo para la producción de PUFAs con la intención de mejorar la competitividad económica de los lípidos de origen microbiano, denominados como aceites sintetizados por microorganismos unicelulares [SCO], en comparación con otras fuentes (plantas y animales). Se ha puesto énfasis en incrementar el valor del producto, utilizando substratos más económicos, buscando y desarrollando cepas que sean mucho más eficientes y reduciendo el número de pasos necesarios para la recuperación del aceite producido por las células microbianas. Someter a una revisión el potencial de los microorganismos para la producción de PUFA es el primer paso para futuros estudios y usos prácticos. Estas cepas pueden ser utilizadas a escala laboratorio para optimizar el proceso. Debido a que la biosíntesis lipídica microbiana debe tener un gran control, modelos matemáticos que determinen la relación entre la disponibilidad de varios tipos de nutrientes y concentraciones de aceites, y su composición en las células, han sido aplicados al proceso, para lograr la máxima producción de PUFAs (Kennedy, 1993). Dos procesos básicos han sido desarrollados para la producción microbiana de PUFAs: fermentación sumergida y fermentación en estado sólido. Simultáneamente con las pruebas de fermentación, análisis toxicológicos para las cepas y sus metabolitos deben ser llevadas a cabo para determinar la seguridad del producto (Streekstra, 1997; Wibert, 1997; Merritt, 2003). El éxito relativo a la producción de aceite de origen microbiano SCO ha originado un interés floreciente en el desarrollo de procesos de fermentación y ha hecho posible diversos procesos para conseguir niveles de producción comercial (Lawson, 1988). No obstante, dos principales problemas persisten, económicos y de comercialización. A pesar de que la manipulación de la composición del aceite microbiano es un campo de la biotecnología que se encuentra en un rápido crecimiento, el suministro de lípidos de origen microbiano es aún insuficiente para satisfacer la demanda industrial. Por lo tanto, estrategias alternativas (por ejemplo, métodos de mutación, técnicas de ingeniería molecular, el uso de inhibidores, estructurar la

composición de los ácidos grasos microbianos por tratamientos enzimáticos del aceite preexistente), deben ser combinadas con las fermentaciones clásicas. La tabla 5 muestra las principales fuentes microbianas de PUFA.

Ácido araquidónico. La habilidad para acumular AA a un nivel industrial, es observado principalmente en el género *Mortierella* (Amano, 1992; Eroshin, 1996), aunque otras cepas han sido también estudiadas. La producción de AA por hongos puede ser mejorada sustancialmente modificando las condiciones de cultivo donde la concentración de AA en el aceite varía entre un 30-70%, con un 70-90% del AA formado, esterificado en forma de triacilglicérido. Actualmente la variedad de hongo más ampliamente utilizada comercialmente hablando es la *Mortierella alpina*, donde se logró la mayor síntesis de AA y la mayor productividad (Totani, 1988; Stredanska, 1993).

Ácido docosahexaenóico. El DHA existe en varios hongos marinos, de los cuales el *Thraustochytrium aureum* acumula más del 50% de este ácido graso en el aceite. Desafortunadamente, el contenido de aceite de este hongo es sólo del 10-15% y las células crecen lentamente con bajo rendimiento. Además, la fragilidad de las células a altos contenidos de PUFA intracelular, hacen el desarrollo del proceso de fermentación difícil (Iida, 1996). La cepa llamada *Schizochytrium* SR21 es tolerante a la agitación mecánica de más de 500 rpm, esta cepa crece en condiciones ligeramente modificadas produciendo DHA y DPA convirtiéndola en una buena fuente de estos ácidos grasos. Además, la alta proporción de DHA y DPA en el aceite y el relativamente bajo nivel o ausencia de otros PUFAs, simplifica los procesos subsecuentes para la obtención de estos ácidos grasos.

Otras fuentes microbianas de DHA que incluyen hongos, microalgas y bacterias psicrófilas han sido revisadas (Singh, 1997). Un método interesante para obtener una alta producción de DHA (39% en aceite; 25% en biomasa) por fermentación semicontinua heterotrófica fue reportado en el alga marina *Cryptocodinium cohnii*. A partir de ello se han llevado a cabo más investigaciones en esta microalga dinoflagelada (Jiang, 1999; Jiang, 2000; Ratledge, 2001).

Tabla 5. Principales fuentes microbianas de ácidos grasos poliinsaturados. Certik et al (1999)

PUFAs	Fuentes convencionales	Fuentes microbianas
GLA (C18:3 n-6) ác. gama linoléico	Plantas (<i>Oenothera biennis</i> enotera u onagra, <i>Borago officinalis</i> , grosellero negro o <i>Ribes nigrum</i>)	Hongos (<i>Mucor circinelloides</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Mortierella isabellina</i> , <i>Mortierella ramanniana</i> , <i>Cunninghamella echinulata</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Cunninghamella japonica</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Thamnididium elegans</i>), Algas (<i>Spirulina platenses</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>)
DGLA (C20:3 n-6) ácido dihomo gamma linoléico	Leche humana, tejidos animales, pescado (caballa atlántica: <i>Scrombus de Scomber</i>), algas (<i>Pogonatum urnigerum</i>)	Hongos (<i>Mortierella</i> spp., especialmente <i>Mortierella alpina</i> , <i>Conidiobolus nanodes</i> , <i>Saprolegnia ferax</i>)
AA (C20:4 n-6) ác. araquidónico	Tejidos animales, pescado (<i>brevoortia</i> , <i>clupea</i>), algas (<i>ctenidium molluscum</i>)	Hongos (<i>Mortierella</i> spp., especialmente <i>Mortierella alpina</i> , <i>Conidiobolus nanodes</i> , <i>Entomophthora exitalis</i> , <i>Blastocladiella emersonit</i>), algas (<i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Sargassum salicifolium</i> , <i>Euglena gracilis</i>)
ETrA (C20:3 n-9) ácido eicosatrienoico	Tejidos animales	Hongos (<i>Mortierella alpina</i>)
EPA (C20:5 n-3) ác. eicosapentaenoico	Pescado (arenque), marisco (cangrejo azul, ostra, langosta, mejillón)	Hongos (<i>Mortierella alpina</i> , <i>Mortierella elongata</i> , <i>Phythium irregulare</i> , <i>Phythium ultimum</i>), algas (<i>Chlorella minutissima</i> , <i>Chlorella minutissima</i> , <i>Monodus subterraneus</i> , <i>Polysiphonia latifolium</i> , <i>Porhydium cruentum</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Amphidinium carteri</i> , <i>Thalassiosira pseudonana</i>), bacteria (<i>Shewanella putrefaciens</i>)
ETA (C20:4 n-3) ác. Eicosatetraenoico	Tejidos animales	Hongos (<i>Mortierella alpina</i>)
DPA (C22:5 n-3) docosapentaenoico	Pescado	Hongos (<i>Schyzochytrium</i> sp.)
DHA (C22:6 n-3) ác. docosahexaenóico	Pescado (atún, arenque, bacalao, sardina, salmón), marisco (cangrejo azul, mejillón, langosta, ostra)	Hongos (<i>Thraustochytrium aureum</i> , <i>Thraustochytrium roseum</i> , <i>Schyzochytrium</i> SR21, <i>Schyzochytrium aggregatum</i>), algas (microalga MK8805, <i>Cryptocodinium cohnii</i> , <i>Gyrodinium nelson</i> , <i>Amphidinium carteri</i> , <i>Gonyaulax polyedra</i>), bacteria (<i>Vibrio</i> spp., <i>Rhodopseudomonas</i> spp.)

El DHA de *Cryptocodinium cohnii* ha sido usado en gran parte del mundo para los preparados para lactantes y el AA de la *Mortierella alpina* ha sido incorporado en fórmulas para niños pretérmino en Europa, y su uso se sigue extendiendo (Arterburn, 2000; Ward, 2005).

Se estima que el mercado mundial de los preparados para lactantes mueve cerca de 10 billones de euros al año. El AA y DHA han sido usados para la fortificación de éstas en muchas partes del mundo. Una gran cantidad de compañías han comercializado preparados para lactantes que contienen aceites sintetizados por microorganismos unicelulares (SCO), en más de 30-60 países del mundo. Algunos preparados para lactantes utilizan LC-PUFA proveniente del aceite de pescado o de los fosfolípidos del huevo.

El mercado de AA y DHA de microorganismos ha recibido una clara aceptación en la fabricación de preparados para lactantes. La mayoría del DHA para este propósito viene del alga *Cryptocodinium cohnii*, como aceite unicelular DHA (DHASCO®), que contiene 40-50% de DHA pero no de EPA u otro LC-PUFA. Mientras que el aceite unicelular AA (ARASCO®) viene de *Mortierella alpina* y contiene 40-50% de AA y cantidades mínimas de otros LC-PUFAs (Ward, 2005). La utilización de aceite SCO en los preparados para lactantes, incrementa el coste del producto un 10-20%. Debido a que la producción de preparados para lactantes es muy competitiva en precios, el incremento en el precio puede retardar la aceptación en el mercado de estos productos, especialmente si los expertos difieren en la verdadera necesidad y eficacia de suplementar las fórmulas con estos aceites SCO.

Los aceites SCO son muy sensibles a la oxidación y se consideran no muy compatibles para la incorporación directa en la mayoría de los líquidos y alimentos secos del mercado. Por lo que encontrar métodos que aseguren la estabilidad de estos aceites en los productos alimenticios y evaluar la estabilidad de los productos que los contienen es esencial. Un método ya introducido en la práctica comercial es el microencapsulado del aceite, por ejemplo la microencapsulación del aceite de pescado. El aceite de pescado microencapsulado (MFO) es un polvo seco libre de aglomeraciones, que consiste en pequeñas partículas esféricas echas de aceite de pescado rico en DHA, distribuido en una matriz de almidón alimentario. Para prevenir la oxidación e incrementar la estabilidad y durabilidad de los LC-PUFA, principalmente del DHA, éstos se recubren

con caseinato y sacarosa, y se estabilizan con palmitato de ascorbilo, ascorbato de sodio y tocoferoles como antioxidantes. Aún así la estabilidad de esta materia prima debe evaluarse en las formulaciones de base láctea, ya que podría afectar la estabilidad y durabilidad en el producto final. Este tipo de microencapsulado podría extenderse a los aceites SCO.

Debido al gran potencial en el mercado de los SCO, muchas compañías han indicado su interés, desarrollando procesos, comprando licencias, fabricando o comercializando productos, patentando, etc. Además un hecho industrial clave ocurrió cuando Martek adquirió Omegatech, que era en ese tiempo el principal productor competitivo de DHA de aceites derivados de microorganismos. En la Tabla 6 se presenta una lista parcial de las compañías que se han dedicado a la investigación, desarrollo, fabricación o comercialización de PUFAs SCO o productos que los contienen.

2.5 Reglamentación de los preparados para lactantes

En el caso de la legislación española, existen los Reales Decretos por los que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y preparados de continuación que son básicamente transposiciones de las normativas de la Comunidad Europea (2006/141/CE: anexo B de esta tesis). Por otro lado, diversas organizaciones formadas por expertos en nutrición infantil como la Academia Americana de Pediatría (AAP), la Sociedad Pediátrica Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición (ESPGHAN) y el comité del Códex Alimentarius (FAO/OMS), emiten una serie de recomendaciones dietéticas y estándares para preparados para lactantes. Estas recomendaciones contienen los mínimos niveles de la mayoría de los componentes necesarios para cubrir los requerimientos nutricionales del lactante. También incluyen los límites superiores con el objeto de evitar el efecto tóxico del exceso de nutrientes relacionado con la limitada capacidad de muchos lactantes de digerirlos, metabolizarlos, regularlos y excretarlos.

Tabla 6. Lista parcial de compañías que están investigando, desarrollando, produciendo o comercializando aceites sintetizados por microorganismos unicelulares PUFAs o productos que los contienen.

Compañías

Aventis S.A.	Nestle S.A.
Aspen Pharmacare	Novartis Nutrition S.A.
BASF A.G.	Nutritiva
Friesland Brands A.G.	Nutrinova Celanese A.G.
Gist-brocades	Pasteur Milk
Heinz-Wattie's Limited	PBM Products, LLC
Hoffmann-LaRoche A.G.	Pronova
Jamieson	Ross Products (División de Abbott)
Laboratorios Ordesa	Royal Numico
Maarbarot	Semper AB
Martek Inc.	Suntory Ltd.
Materna Ltd.	Synutra, Inc.
Mead Jonson Nutritionals	Takaso Rubber
Medici Medical	Walmart
Nagase and Co.	Wyeth

La ESPGHAN es más estricta que la AAP, y por esta razón existen menos preparados para lactantes disponibles en Europa. Esta política tiene la ventaja de evitar la confusión en la madre y en el médico al escoger una fórmula. Asimismo el comité del *códex alimentarius* FAO/OMS está básicamente dirigido a países en vías de desarrollo que carecen de reglamentación propia.

3. Principales reacciones de deterioro de los preparados para lactantes

Durante la manipulación de la leche de vaca, principal componente para la fabricación de preparados para lactantes, se emplean distintas condiciones de procesamiento que pueden alterar las características físicas y químicas de estos productos. Por ejemplo, la leche se sujeta a diferentes procesos que implican una transferencia de calor, como la pasteurización, la deshidratación, la esterilización y la concentración, en los cuales pueden suceder muchos cambios químicos catalizados por las condiciones de temperatura empleadas. Los esfuerzos mecánicos, durante el transporte de fluidos o en la homogenización, también inducen ciertas modificaciones en los constituyentes de la leche que se reflejan en la calidad global del producto. En general la leche es sensible al calor, al frío, a esfuerzos mecánicos, a la luz, al oxígeno, por lo que durante la fabricación de productos lácteos se debe cuidar la influencia de cualquiera de estos factores para evitar reacciones de deterioro en detrimento de la calidad. De todos estos factores, los tratamientos térmicos son lo que mayor efecto tienen e inducen los cambios más importantes en los componentes de la leche.

A continuación se comentan los aspectos más relevantes de los principales compuestos que intervienen en las reacciones fisicoquímicas de los alimentos procesados, básicamente se explica qué son y debido a su naturaleza cuales son las principales modificaciones a los que están sujetos los hidratos de carbono, lípidos y proteínas en la tecnología alimentaria.

3.1 Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono son los nutrientes más abundantes que se encuentran en la naturaleza y su requerimiento en el ser humano es de aproximadamente el 60% en relación a las proteínas y los lípidos. Los hidratos de carbono pueden ser monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Por definición, los hidratos de carbono son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas y sus derivados. Los monosacáridos son los monómeros o unidades básicas con las que se forman los oligo y los polisacáridos.

La unión química de pocos monosacáridos (2 a 6 aproximadamente) da como resultado los oligosacáridos. Por otro lado la nomenclatura de los hidratos de carbono es confusa, pues al igual que muchos otros compuestos químicos, se les designó originalmente con nombres triviales que indican el origen de dónde provienen, como la lactosa, que es el azúcar de la leche, la fructosa de las frutas, etc.

La lactosa es el principal hidrato de carbono de la leche de vaca y está considerado por algunos como el único, no obstante también se encuentran pequeñas cantidades de glucosa, galactosa, sacarosa, cerebrosidos y algunos aminoazúcares derivados de la hexosamina.

Un disacárido se produce por la condensación de dos monosacáridos a través de un enlace químico covalente, con la consecuente pérdida de una molécula de agua, aunque también se pueden obtener por la hidrólisis de los polisacáridos. La unión entre dos monosacáridos se efectúa a través de un enlace C-O-C, llamado enlace glucosídico, que puede ser hidrolizado por enzimas o por ácidos en ciertas condiciones de temperatura. En caso de que los dos monosacáridos de un disacárido estén unidos a través de sus respectivos carbonos anoméricos, se forman azúcares no reductores. El ejemplo más común es la sacarosa, mientras que si un carbono anomérico se encuentra libre es un azúcar reductor, como en el caso de la lactosa.

La sacarosa (no reductor) es un azúcar formado por la unión de una molécula de glucosa (reductor) y una de fructosa (reductor) a través de un enlace glucosídico β -(1-4), debido a que la glucosa y la fructosa están unidas a través de sus respectivos grupos carbonilo anoméricos, la sacarosa es un azúcar no reductor ya que no tiene ningún carbonilo libre activo (Figura 4). La sacarosa se hidroliza en presencia de enzimas llamadas invertasas, o en presencia de ácidos diluidos upara dar una mezcla equimolar de glucosa y fructosa que tienen diferentes propiedades fisicoquímicas siendo esto muy importante para la industria y tecnología de los alimentos al aplicar tratamientos térmicos en la fabricación de alimentos que contengan este azúcar.

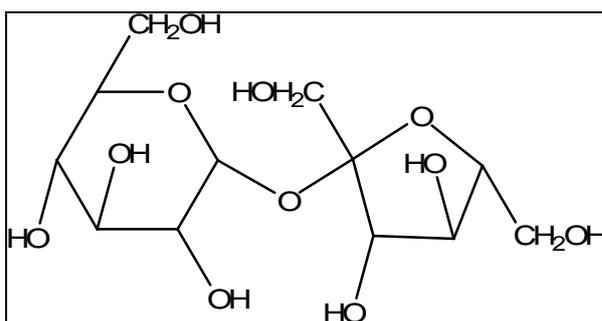


Figura 4. Estructura de la sacarosa.

La lactosa es un disacárido que se encuentra exclusivamente en la leche de los mamíferos y está constituida por una molécula de galactosa y una de glucosa unidas por un enlace glucosídico β -(1-4). El carbono anomérico de la glucosa está por tanto libre, por lo que la lactosa es un azúcar reductor (Figura 5). La lactosa puede fácilmente interaccionar con proteínas y producir pigmentos a través de la reacción de Maillard.

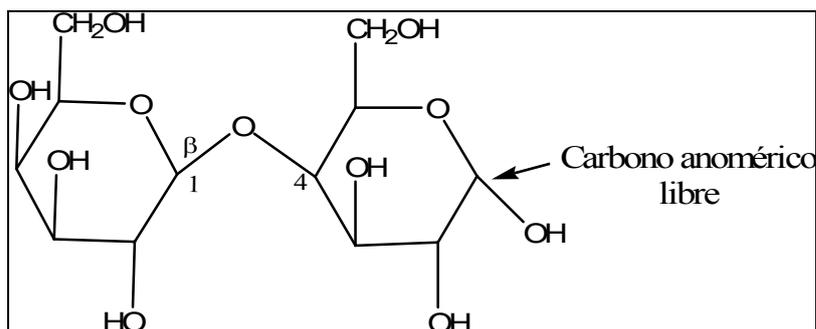


Figura 5. Estructura de la lactosa.

Las reacciones a las que están propensos los hidratos de carbono son muy variadas. Los cambios químicos que pueden sucederles se deben a reacciones de oxidación y de reducción, a la acción de ácidos, álcalis y al calor (Badui, 1999). El grupo aldehído o cetona de los monosacáridos sufre las reacciones características de estos grupos, entre las cuales la más importante en alimentos es la condensación de grupos amino de las proteínas con los carbonilo del azúcar, en las reacciones de pardeamiento no enzimático.

En **condiciones alcalinas** se pueden inducir varias reacciones químicas en los monosacáridos, que dependen de la intensidad del tratamiento y de la concentración del álcali. A bajas concentraciones pueden causar una isomerización, y a medida que

aumenta la concentración del álcali suceden reacciones de β -eliminación, y finalmente reacciones de oxidación que transforman el azúcar en su forma de ácido. Por ejemplo en condiciones alcalinas débiles (0.05 N), la glucosa se puede tautomerizar formando un enol, que por arreglo de Lobry de Bruyn-Alberda van Eckenstein, se epimeriza en manosa y fructosa. En términos generales, la enolización de los aldehídos produce cetonas, como es el caso de la transformación de la glucosa en fructosa.

Una reacción muy característica de los hidratos de carbono está basada en el poder reductor que le confiere su grupo aldehído o cetona. En condiciones alcalinas, los azúcares presentan reacciones de isomerización, fragmentación y de óxido-reducción que resultan en la producción de una mezcla muy compleja de moléculas con propiedades altamente reductoras.

Por otro lado en **condiciones ácidas**, las hexosas se pueden deshidratar formando derivados furánicos, como el hidroximetilfurfural (HMF), que puede posteriormente descomponerse y formar otros compuestos. Por otra parte las pentosas se deshidratan produciendo 2-furaldehído. La formación de sustancias furánicas tiene mucha importancia en la industria alimentaria, ya que además de producir olores desagradables, intervienen en reacciones de polimerización con la formación de pigmentos pardos. Este mecanismo forma parte de las reacciones de pardeamiento no enzimático que sufren los alimentos durante su producción.

Los ácidos también pueden causar hidrólisis de los enlaces glucosídicos de los oligosacáridos y polisacáridos. La facilidad y el grado de hidrólisis depende de varios factores, entre ellos: del pH, del tipo de enlace glucosídico, del tipo de monosacárido, de la matriz en la que se encuentran, etc.

Finalmente el **efecto del calor** sobre los azúcares está directamente relacionado con varias reacciones que conducen a la producción de diferentes pigmentos en los alimentos. La temperatura acelera considerablemente todas las reacciones que le suceden a los hidratos de carbono en condiciones tanto ácidas, como básicas. La presencia de compuestos nitrogenados, el pH y otros factores son decisivos para que los azúcares se vean afectados por la temperatura en una cierta forma y produzcan pigmentos por medio de diversos mecanismos.

3.1.1 Reacciones de Pardeamiento

Las reacciones de pardeamiento son muy importantes en los alimentos, ya que también su sabor, su olor y su textura pueden ser afectados. Este es uno de los principales problemas que se tienen durante el procesamiento y el almacenamiento de productos deshidratados o de bajo contenido de humedad, como lo son las fórmulas de base láctea en polvo. El pardeamiento se puede presentar a través de cuatro mecanismos principales que se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Reacciones de pardeamiento.

Mecanismo	¿O ₂ necesario?	¿Grupos amino necesarios?	pH óptimo
Caramelización	no	no	alcalino/ácido
Oxidación ác. ascórbico	sí	no	Ligeramente ácido
Polifenol oxidasa	sí	no	Ligeramente ácido
Reacción de Maillard	no	sí	alcalino

Caramelización. La caramelización o pirólisis se presenta cuando los azúcares son calentados por encima de su temperatura de fusión, en la que los monosacáridos forman enoles como paso inicial de la reacción. Esta reacción se favorece por la presencia de ácidos carboxílicos, por algunos metales y por pH alcalinos, aunque también puede efectuarse en condiciones ácidas. Este tipo de reacción no se produce en la fabricación de las formulaciones de base láctea.

Oxidación del ácido ascórbico. El ácido ascórbico es la lactona γ de un ácido hexurónico que contiene una estructura enol entre los carbonos 2 y 3. Este compuesto es muy inestable y rápidamente se oxida en presencia de oxígeno, transformándose en ácido dehidroascórbico, que a su vez puede pasar a furfural por el mecanismo de Strecker, con la consecuente liberación de CO₂ (Figura 6). Durante la oxidación del ácido ascórbico, que depende directamente del pH y la temperatura del sistema, se han identificado más de 15 compuestos diferentes provenientes de esta reacción. El furfural formado por esta ruta puede igualmente polimerizarse y producir pigmentos pardos.

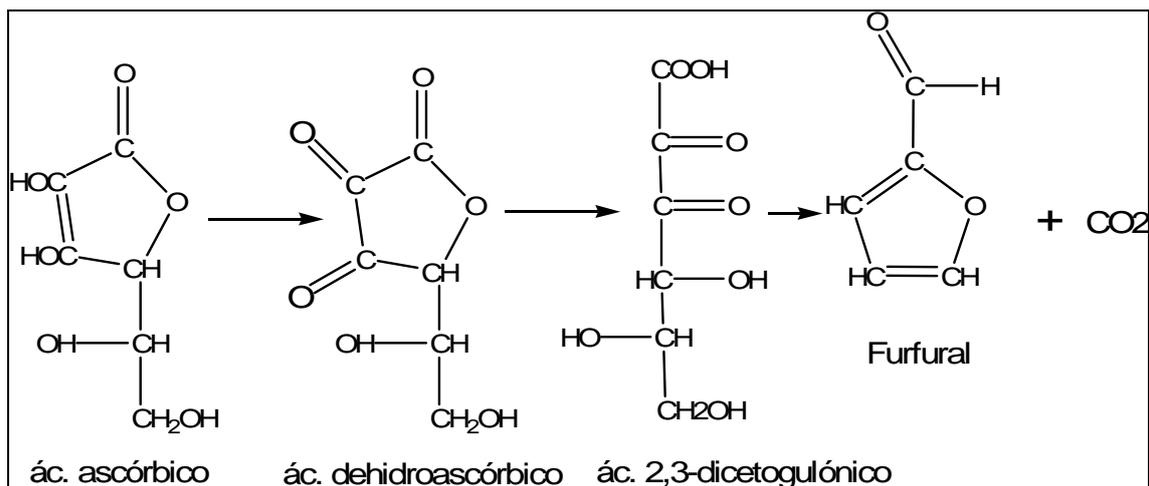


Figura 6. Formación de furfural a partir del ácido ascórbico.

Estas reacciones de oxidación se presentan en frutos en los que no hay muchos grupos amino con los cuales el ácido ascórbico pueda interaccionar, por lo que no es el caso de las formulaciones de base láctea. Estas reacciones implican pérdidas de vitamina C y la producción de pigmentos indeseables. La oxidación se puede prevenir evitando la exposición del producto al oxígeno.

3.1.1.1 Reacción de Maillard

Se conoce con el nombre de reacción de Maillard a aquella que se lleva a cabo entre un grupo aldehído o cetona, proveniente de los azúcares reductores, y grupos amino de aminoácidos o proteínas. Este tipo de reacción de pardeamiento es el que sucede más frecuentemente cuando los alimentos se calientan a temperaturas altas, o cuando se almacenan por periodos muy largos y va acompañando además por una reducción de la solubilidad de las proteínas, una baja en el valor nutricional y la producción de sabores amargos. Estas reacciones fueron originalmente observadas por el químico francés Maillard en 1912, pero no fue sino hasta 1953 cuando se descubrió el mecanismo de las complejas interacciones que inducen a este tipo de pardeamiento no enzimático (Hodge, 1955). La reacción de Maillard está resumida a continuación y se efectúa en una secuencia de tres pasos:

A) Paso inicial (no hay producción de color)

- 1) Condensación azúcar amino para formar una glucosilamina-*N*-sustituida. Es una reacción reversible.

- 2) Reordenación de Amadori. La glucosilamina se transforma a una cetosimina o aldosaamina.
- B) **Paso intermedio** (formación de colores amarillos muy ligeros y producción de olores desagradables).
- 3) Deshidratación de azúcares. Se forman derivados del furfural, reductonas o dehidroreductonas, dependiendo del pH y de la actividad de agua del sistema.
 - 4) Fragmentación de azúcares. Se forman compuestos α -hidroxicarbonilos, glucoaldehído, gliceraldehído, piruvaldehído, acetol, acetoína, diacetilo, etc.
 - 5) Degradación de Strecker. Aminoácidos más dehidrorreductonas formadas en el paso intermedio de la reacción, forman aldehídos con un átomo de carbono menos, más CO₂.
- C) **Paso final** (formación de pigmentos)
- 6) Condensación alcohólica de compuestos intermediarios para formar pigmentos insaturados con propiedades fluorescentes.
 - 7) Polimerización de aldehídos con aminas.

Paso inicial. Los azúcares que intervienen en la condensación inicial azúcar-amino deben tener un grupo carbonilo libre, es decir que disacáridos como la lactosa y la maltosa son capaces de interaccionar, mientras que la sacarosa, como azúcar no reductor no presenta esta reacción a menos que sea hidrolizada previamente a sus correspondientes monosacáridos. Por eso en la fabricación de fórmulas de base láctea, este tipo de reacciones cobra especial interés, ya que existen toda una serie de factores que la hacen propensa a sufrir las complejas reacciones de Maillard. La reacción de Maillard se favorece a pH ligeramente alcalinos, además a medida que aumenta la temperatura se favorece esta reacción. También la actividad de agua desempeña un papel muy importante en estas reacciones, ya que los alimentos con bajos valores son más propensos al pardeamiento, como lo es el caso de las formulaciones de base láctea en polvo.

La condensación entre el grupo amino de los aminoácidos o de las proteínas con el grupo carbonilo de azúcares reductores, como la glucosa, forma una base de Schiff que se cicla para dar la correspondiente glucosilamina-N-sustituída. (Figura 7).

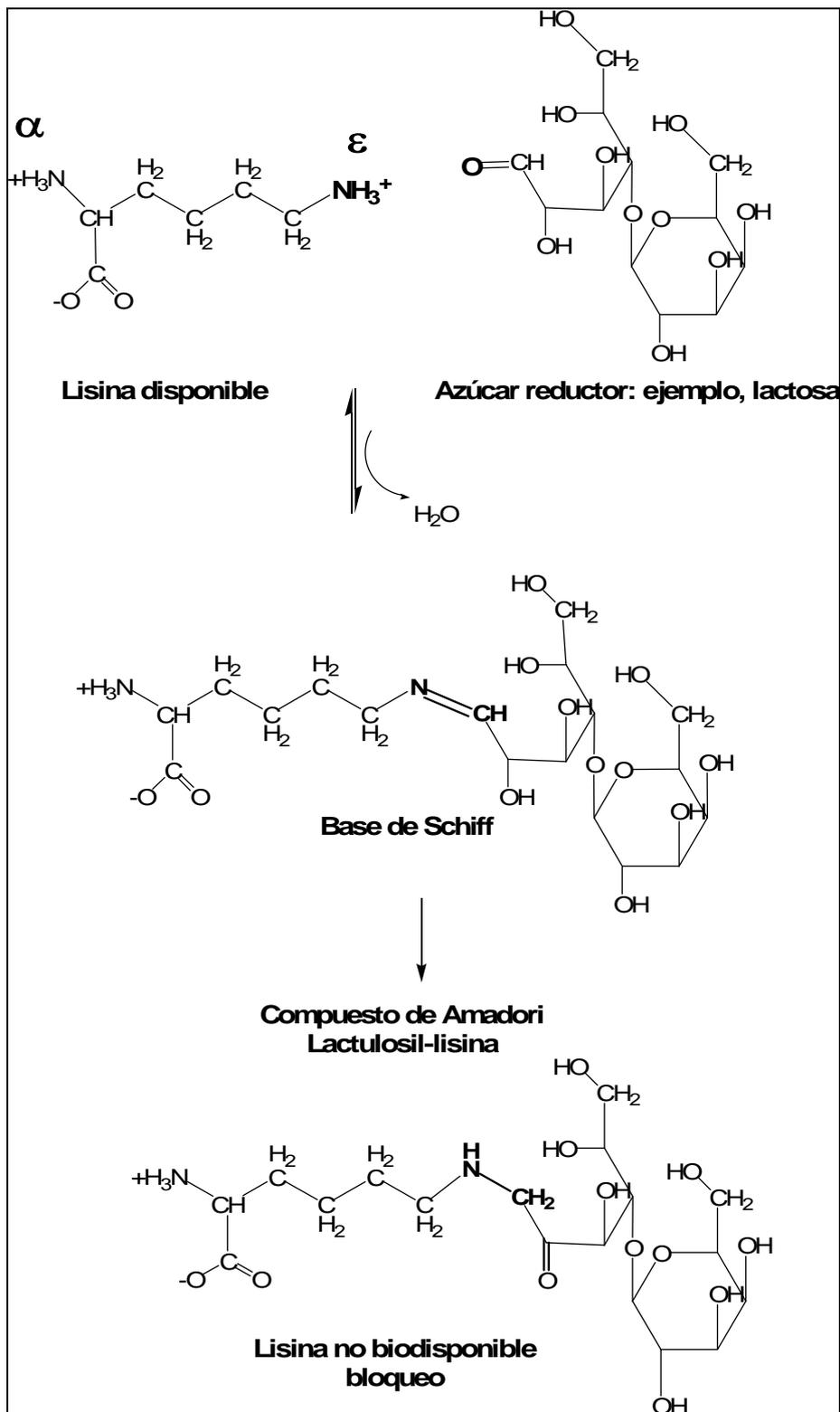


Figura 7. Producción de la Base de Schiff (condensación lactosa-grupo ϵ -amino) y Reordenación de Amadori.

Este primer paso tiene mucha importancia ya que el grupo ϵ -amino de la lisina reacciona fácilmente, lo cual repercute en la disponibilidad biológica de este aminoácido en las proteínas que intervienen. La lisina es un aminoácido indispensable y se debe vigilar el contenido de ésta en alimentos infantiles como los preparados para lactantes, ya que pueden ser la única fuente de este aminoácido.

El siguiente paso en las reacciones de pardeamiento es la reordenación de Amadori en el cual la glucosilamina se isomeriza, pasando de aldosa a cetosa (Figura 7). Se ha comprobado que en este paso se forman diferentes compuestos que dependen de las condiciones de pH y temperatura de la reacción. La reordenación de Amadori produce derivados 1-amino-1-desoxi-2-cetosa que se generan a través de varios pasos que no imparten ningún color al alimento.

Paso intermedio. El paso intermedio de este mecanismo implica la eliminación del grupo amino del derivado 1-amino-1-desoxi-2-cetosa a través de reacciones de deshidratación, ciclización, fragmentación o condensación. Existen básicamente tres rutas principales a través de las cuales se puede efectuar esta eliminación:

- 1) En **condiciones ácidas** hay deshidratación y ciclización de las hexosas y pentosas que induce la producción de hidroximetilfurfural y furfural, respectivamente, con la posible regeneración de la amina. Estos dos compuestos cíclicos son incoloros, pero a través de una subsiguiente oxidación producen pigmentos amarillos.
- 2) En **condiciones alcalinas**, la forma 2-ceto se equilibra con la forma glucosídica del 1,2-enol, que a través de una reordenación, se transforma en el 2,3-enol. Este compuesto está sujeto a reacciones de deshidratación y oxidación que hacen que se produzcan reductonas y dehidrorreductonas. Estas últimas se combinan con aminoácidos en una reacción que induce la formación de CO_2 , aldehídos y cetonas a través de un mecanismo conocido con el nombre de degradación de Strecker.

- 3) La degradación térmica del derivado de Amadori en forma directa, produce compuestos de degradación térmica como aldehídos, cetonas, alcoholes y ácidos de 3 ó 4 átomos de carbono. Estas sustancias son de bajo peso molecular e influyen en las propiedades de sabor y olor de los alimentos que han sufrido las reacciones de Maillard.

Paso final. El último paso es propiamente la formación de los pigmentos pardos llamados melanoidinas, cuyo mecanismo no se conoce totalmente pero que implica la polimerización de muchos de los compuestos formados en la segunda fase de la reacción. Los cambios que suceden están directamente influenciados por la presencia de grupos amino, con los cuales puede haber reacciones de copolimerización que inducen la formación de pigmentos hidrosolubles. La polimerización del furfural y del hidroximetilfurfural con aminas produce pigmentos pardos insolubles en agua.

Las reacciones de pardeamiento son visibles una vez que se producen pigmentos y se podrían observar en leches condensadas, deshidratadas y productos derivados de éstas, lo que indicaría un excesivo tratamiento térmico durante su fabricación. Por lo que la industria debe controlar los procesos de fabricación cuidadosamente. Una manera de detectar la existencia de reacciones de pardeamiento es mediante la presencia de furfurales, o bien compuestos volátiles que son típicos de estos mecanismos de reacción. La temperatura, el pH y el contenido de humedad del alimento desempeñan un papel muy importante en el control de las reacciones de pardeamiento no enzimático, de tal forma que se pueden inhibir a temperaturas bajas y pH controlados. El envasado con gases inertes y/o atmósferas controladas ayuda a eliminar el oxígeno que se requiere para que procedan algunas de las reacciones de pardeamiento. El oxígeno no es necesario para la condensación carbonilo-amino que da origen a las reacciones de Maillard, sin embargo, su presencia acelera muchos de los pasos intermediarios y finales de este mecanismo. Los productos lácteos son muy susceptibles al pardeamiento no enzimático durante todos los tratamientos térmicos a los que se sujetan. Esto se debe básicamente a su elevado contenido de lactosa y de lisina.

3.2 Proteínas

Las caseínas y las proteínas del suero son los dos grandes grupos de proteínas de la leche. Los aminoácidos son los monómeros y principales constituyentes de las proteínas, por lo que su distribución y concentración determinan fundamentalmente las propiedades de cada proteína. Debido a que tienen estructuras químicas muy diversas, los aminoácidos presentan diferentes grados y mecanismos de reactividad, que dependen de su grupo R. Las reacciones en las que intervienen las proteínas se deben a la sensibilidad y a la factibilidad con la que sus aminoácidos constituyentes pueden interaccionar con otras moléculas.

Los grupos amino de la lisina son muy reactivos ya que interaccionan fácilmente con azúcares reductores a través del mecanismo de reacción de Maillard.

Las proteínas pueden contener un grupo no proteico, como las glucoproteínas que tienen una fracción de hidrato de carbono que generalmente es un monosacárido o algún derivado nitrogenado como la galactosamina. Entre las glucoproteínas más representativas están la caseína de la leche, que contiene un trisacárido formado por glucosa, galactosa y ácido siálico.

Las caseínas y las proteínas del suero de la leche de vaca se pueden fraccionar y separar de acuerdo con su solubilidad a ciertos valores de pH en presencia de sales, lo cual nos lleva a diferenciar estos dos sistemas de estabilidad de las proteínas de la leche.

Los principales factores que influyen y aceleran los cambios en las proteínas son principalmente: el calor, congelación, oxidación, reducción, factores mecánicos, pH, actividad de agua, actividad enzimática y la composición global del alimento. Debido a que todos estos factores están relacionados entre sí, resulta difícil separarlos y estudiarlos en forma individual. La principal reacción que debe observarse en la industria de fórmulas infantiles es la **reacción de Maillard**, por lo que una manera de evaluar esta, es observando el valor biológico de la proteína mediante la determinación de la **lisina disponible**. También los **hidroperóxidos** formados durante la oxidación lipídica pueden interaccionar con las proteínas produciendo compuestos tóxicos, por lo que la oxidación debe evitarse.

3.3 Lípidos

Existe una gran variedad de lípidos pero la particularidad de estos es que son solubles en disolventes orgánicos e insolubles en agua. Los ácidos grasos son los componentes más abundantes de los lípidos y generalmente se encuentran esterificados como parte constituyente de los acilglicéridos, que son derivados de la reacción de esterificación entre el glicerol y una, dos o tres moléculas de ácido graso. (mono-, di- y triacilglicéridos siendo los últimos los más abundantes). Los ácidos grasos se dividen en saturados e insaturados dependiendo de la presencia o ausencia de dobles enlaces en su molécula. La estructura de algunos ácidos grasos insaturados encontrados normalmente en tejidos biológicos se puede ver en la Figura 8.

A pesar de que los ácidos grasos poliinsaturados fueron descubiertos desde los años veinte, su importancia nutricional no tuvo interés general en humanos hasta los noventa, cuando el papel que tienen éstos, en el crecimiento y desarrollo ha sido ampliamente estudiado, en animales y humanos. Los PUFA regulan varios procesos fisiológicos y de desarrollo, y son esenciales para el temprano crecimiento y desarrollo del niño (Xiang, 1999; Vidailhet, 2007; Sinclair, 2007; Innis, 2007).

Los triacilglicéridos son los componentes más importantes de los lípidos de la leche de vaca ya que constituyen aproximadamente 98% del material extraíble con disolventes no polares. En promedio, las grasas lácteas contienen aproximadamente 60%, 38% y 2% de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente. La relación de ácidos grasos saturados e insaturados determina la susceptibilidad de la grasa a las reacciones químicas que afectan a los productos lácteos.

Los ácidos grasos insaturados tienen una mayor reactividad química que los saturados debido a la presencia de dobles enlaces y su sensibilidad a las reacciones de oxidación es mayor cuanto más insaturado sea el ácido. Los lípidos son susceptibles a diferentes reacciones de deterioro que reducen el valor nutricional del alimento, y además producen compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables. Esto se debe a que el enlace éster de los acilglicéridos es susceptible a la hidrólisis química o enzimática, y a que los ácidos grasos insaturados son sensibles a reacciones de oxidación. El deterioro de los lípidos se divide en dos grupos de reacciones, rancidez hidrolítica o lipólisis y rancidez oxidativa.

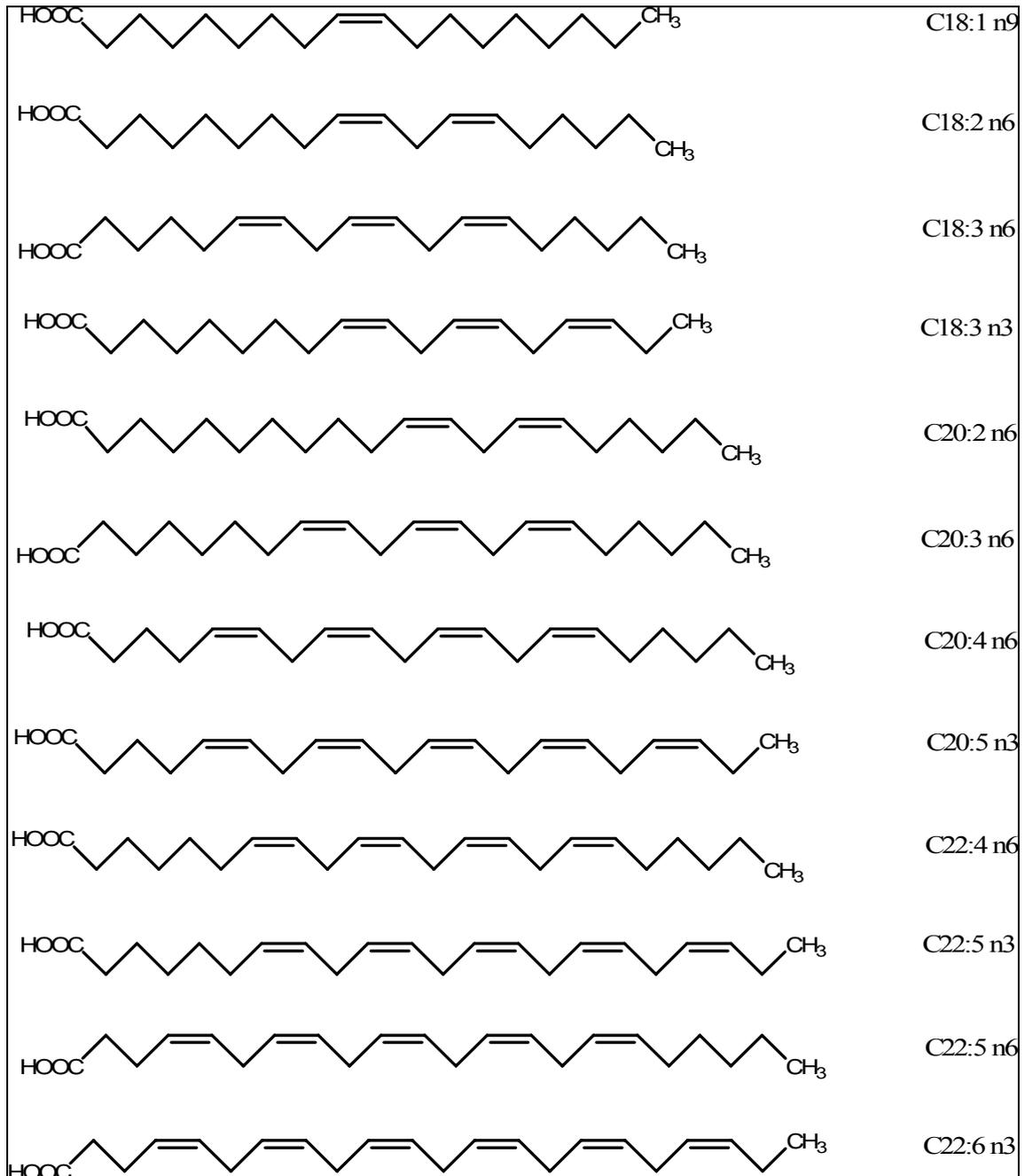


Figura 8. Estructura de ácidos grasos insaturados.

3.3.1 Rancidez hidrolítica o lipólisis

Se debe básicamente a la acción de las lipasas que liberan ácidos grasos de los triacilglicéridos, y es muy notable en productos lácteos o en cualquier alimento que contenga altas concentraciones de ácidos volátiles de cadena corta (C4-C12). La fuente y el origen de las lipasas puede ser el propio alimento, como el caso de la leche, o bien una contaminación microbiana por levaduras, hongos o bacterias.

3.3.2 Rancidez oxidativa

Las reacciones de oxidación de los lípidos tienen diversos orígenes, siendo el principal la acción directa del oxígeno (autooxidación) sobre los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados, con la consecuente producción de hidroperóxidos. La autooxidación se presenta comúnmente en lípidos con un alto contenido de ácidos grasos insaturados y es el deterioro más común de las grasas utilizadas en la industria alimentaria. Es por ello que en los preparados para lactantes que son adicionados con LC-PUFA, se debe observar la estabilidad del producto, así como de las materias primas utilizadas para su elaboración. Los ácidos grasos insaturados no son los únicos constituyentes que se oxidan, sino también las vitaminas, siendo el común denominador la presencia de los dobles enlaces en su estructura química. La intensidad y la forma de oxidación, y los compuestos formados, dependen en gran medida de las condiciones de oxidación (temperatura, presencia de catalizadores, estado de dispersión de la grasa, radiaciones, tipo de ácidos grasos, distribución y geometría de los dobles enlaces, cantidad de oxígeno disponible). La actividad de agua de los alimentos desempeña un papel muy importante en la velocidad de oxidación de los ácidos grasos (Roozen, 1992; Hardas, 2002).

Las temperaturas altas aceleran considerablemente la oxidación. Debido a que las reacciones de oxidación requieren niveles muy bajos de energía, la reducción de la temperatura no necesariamente las inhibe. Asimismo metales de transición como el cobre y el hierro pueden iniciar las reacciones de oxidación a concentraciones muy pequeñas (< 1 ppm). El cobre es muy activo para oxidar la grasa láctea. También la exposición a la luz UV puede iniciar las reacciones de oxidación. La aeración aumenta el contacto del oxígeno con la grasa, lo que acelera la reacción. Por lo anterior se puede deducir que en la fabricación de fórmulas de base láctea, suplementadas o no con LC-PUFA, para reducir la oxidación las prácticas empleadas más comunes consisten en proteger el producto contra el oxígeno, envasando en atmósferas controladas (contenidos residuales de oxígeno menores al 3%), en envases que las protejan de la luz UV y que sean impermeables, adicionar antioxidantes y almacenar el producto a temperaturas controladas (Cladman, 1998).

La oxidación de los ácidos grasos insaturados es del tipo de reacción en cadena, que consiste esencialmente en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Tabla 8).

Tabla 8. Mecanismo de oxidación de los lípidos.

Iniciación	RH		\longrightarrow R• + H•	radical libre
Propagación	R•	+ O ₂	\longrightarrow ROO•	radical hidroperóxido
	ROO•	+ RH	\longrightarrow R• + ROOH	hidroperóxido
Terminación	R•	+ R•	\longrightarrow RR	compuestos muy estables
	R•	+ ROO•	\longrightarrow ROOR	
	ROO•	+ ROOR	\longrightarrow ROOR + O ₂	
	RO•	+ R•	\longrightarrow ROR	
	2 RO•	+ 2 ROO•	\longrightarrow 2 ROOR + O ₂	

La **reacción de iniciación** es catalizada principalmente por la presencia de metales, oxígeno, luz y temperatura. En términos generales, siempre se requiere de algún agente catalizador para efectuar este primer paso, aunque parece ser que cuando el oxígeno tiene una configuración electrónica de singulete, puede unirse directamente al ácido insaturado sin la previa formación de radicales libres. Esta unión en forma directa produce los correspondientes hidroperóxidos ($RH + O_2 \rightarrow ROOH$). Durante la etapa de iniciación se sustrae uno de los átomos de hidrógeno adyacentes a el doble enlace, formándose un radical al cual el oxígeno se puede unir fácilmente, la ruptura del enlace C-H para la formación del radical requiere de aproximadamente 80 kcal. **Posteriormente**, el radical hidroperóxido reacciona con nuevos ácidos grasos, formando más radicales libres, con lo cual se propaga la reacción. El **paso final** de las reacciones de oxidación se efectúa a través de reacciones de condensación, en las que los diferentes radicales interaccionan formando compuestos muy estables, por tanto, terminan cuando ya no existen radicales libres activos.

Los hidroperóxidos formados en la etapa de propagación continúan proveyendo de radicales libres a la reacción, pero además tienen la capacidad de interaccionar con otras moléculas o de intervenir en reacciones secundarias, generando nuevas sustancias. La ruta que sigan los hidroperóxidos dependerá de la presencia de catalizadores, de la energía radiante y de la temperatura. Las reacciones de descomposición de los

hidroperóxidos producen diferentes compuestos como peróxidos, aldehídos, cetonas, ácidos, epóxidos, polímeros y cetoglicéridos. Los olores y sabores característicos de los derivados aldehídicos y cetónicos son muy intensos y pueden ser desagradables. Este tipo de compuestos también se forma durante la oxidación de tocoferoles, carotenoides, etc., y el mecanismo de oxidación parece ser el mismo.

Además de su descomposición, los peróxidos tienen la capacidad de interactuar con proteínas, pigmentos y otros constituyentes del alimento, generando sustancias cuya naturaleza puede ser tóxica para el organismo. Las reacciones entre los peróxidos y las proteínas son muy importantes ya que reducen el valor nutricional del producto. Todas estas reacciones cobran especial interés en los preparados infantiles de base láctea, ya que son matrices muy complejas al igual que las posibles reacciones que en estos productos se puedan llevar a cabo, disminuyendo, no sólo la estabilidad del producto, sino su aporte nutricional de vital importancia en las primeras etapas de la vida después de nacer y generando compuestos tóxicos. Por lo que estrictos controles de la estabilidad de la fórmula deben ser llevados a cabo a fin de garantizar su calidad y seguridad alimentaria. Asimismo cualquier variación en la formulación del producto, como por ejemplo al añadir nuevos componentes y materias primas (para mejorarla o hacerla más completa o parecida a la leche materna) que pueda afectar la estabilidad del producto, exige investigaciones al respecto. En la siguiente tabla se mencionan algunas de las pruebas más comunes para evaluar la oxidación de alimentos (Tabla 9).

Tabla 9. Pruebas comunes para evaluar la oxidación y estabilidad en alimentos.

Prueba	Medición de:	Unidades
Índice peróxidos (PV)	Peróxidos e hidroperóxidos en las fases iniciales de la oxidación	mequiv. de O ₂ activo / kg
Dienos conjugados	1,4-dienos producidos en las fases iniciales de la oxidación	absorbancia /unidad de masa
Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	derivados del ácido tiobarbitúrico que absorben a 532-535 nm (como malondialdehído)	mg/kg malondialdehído
Prueba de Kreis	derivados del phloroglucinol como malondialdehído y otros aldehídos que absorben a 546 nm	mg/kg malondialdehído
Índice de anisidina	Aldehídos (principalmente alkenales)	100 veces ↑ absorbancia medida a una longitud de 350 mm en una celda de 1 cm
Compuestos volátiles (hexanal, pentano, hexano, etc.)	Formación de compuestos específicos en las fases intermedias y finales de la oxidación	mg/kg
Espectroscopia de resonancia del spin del electrón (ESR)	Intensidad/índice de cambio en la concentración de antioxidantes o de radicales- derivados	mg/l del radical
Termogravimetría/ análisis diferencial térmico (TG/DTA)	Tiempo requerido para el desarrollo de autooxidación en una atmósfera dinámica de oxígeno a una temperatura específica	ΔT (°C), cambio de masa (mg)

3.4 Vitaminas

El término “vitamina” fue concebido en 1912 por Casimir Funk para designar a los factores accesorios de los alimentos necesarios para la vida. La teoría original de que son aminos vitales fue desacreditada, pero el término designado por Funk se mantiene. Las vitaminas son compuestos esenciales para el desarrollo de reacciones metabólicas específicas. Muchas actúan como coenzimas o como parte de enzimas responsables de favorecer las reacciones químicas esenciales. Las vitaminas no pertenecen a un grupo específico de compuestos, son generalmente complejas en sus estructuras químicas y muy diferentes entre sí. Debido a esto no se han podido clasificar con base en su estructura o composición química, sin embargo se han clasificado de acuerdo con su solubilidad en liposolubles e hidrosolubles, lo cual hasta cierto punto determina su estabilidad, presencia en los alimentos, distribución en los líquidos corporales y capacidad para depositarse en los tejidos.

3.4.1 Vitaminas liposolubles

Las vitaminas liposolubles son compuestos orgánicos con grupos hidrófobos en su estructura química, y por tanto solubles en disolventes apolares y grasas, e insolubles en agua. Éstas se retienen en el tejido adiposo del hígado, que actúa como su principal almacén y fuente biológica. Las vitaminas liposolubles (A, D, E Y K) constan de una estructura química básica formada por la condensación de moléculas de isopreno, es decir, tienen características terpénicas.

Vitamina A

El compuesto base por excelencia de la vitamina A es llamado *trans*-retinol(Figura 9) y un número de sus derivados tienen actividad vitamínica A así como ciertos carotenoides. La actividad de la vitamina A se suele expresar como unidades internacionales (IU) o equivalentes de retinol (RE). Las tablas de composición alimentaria han sido basadas en la igualdad de que 1 UI de vitamina A es igual a 0.3 µg de todo-*trans*-retinol ó, 0.6 µg de todo-*trans* β-caroteno. Sin embargo, esta relación 2:1 no refleja verdaderamente la actividad biológica después de la ingestión. Por lo tanto, la

convención actual es expresar la actividad de la vitamina A como RE, donde 1 RE es igual a 1 μg de todo-*trans*-retinol, 6 μg de todo-*trans* β -caroteno y 12 μg de otros carotenoides provitamina A (Olson, 1989). La leche humana contiene vitamina A preformada, principalmente en la forma de ésteres de retinol (por ejemplo: palmitato de retinol y estearato de retinol) y carotenoides que son precursores de la vitamina A (Canfield, 1995).

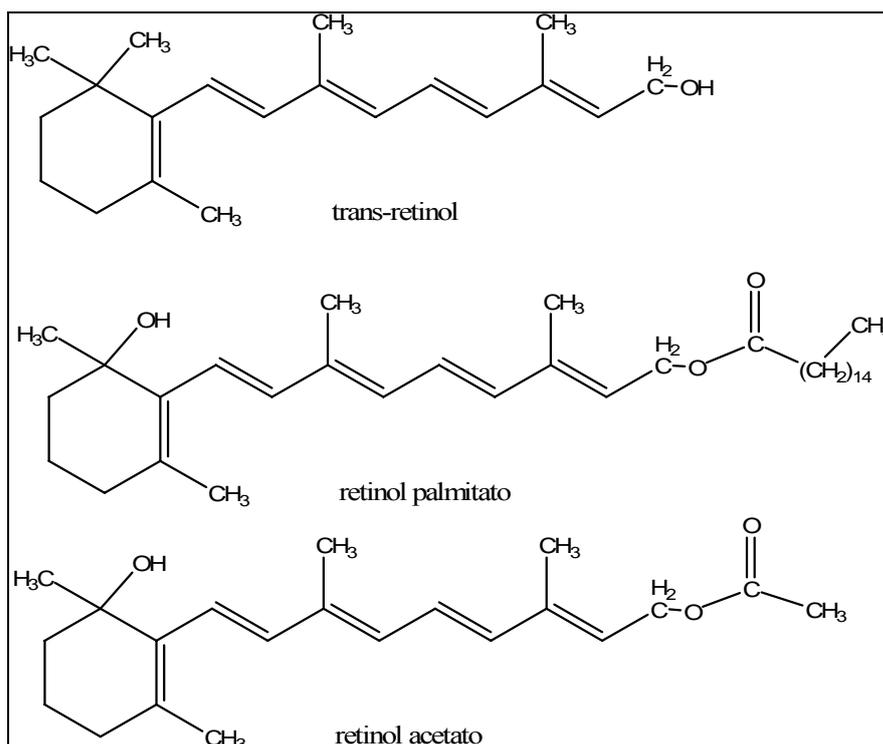


Figura 9. Formas más comunes de la vitamina A.

Las principales funciones de la vitamina A son:

1. **Función estructural:** La vitamina A es un componente de los pigmentos visuales y como tal, es esencial para la integridad de la fotorecepción en los bastones y conos de la retina. Los isómeros 11-*cis* del aldehído de la vitamina A (retinal) se combinan con la proteína opsina para producir rodopsina en los bastones y yodopsina en los conos. La luz cambia la configuración 11-*cis* a la forma *trans* de los retinaldehídos, que causa la excitación visual.
2. **Función humoral:** Dicha vitamina también es importante para el mantenimiento de las estructuras epiteliales normales. Es necesaria en la diferenciación de las células basales dentro de las células mucosas epiteliales.

3. Función de crecimiento óseo: La vitamina A es necesaria para el crecimiento y el desarrollo del esqueleto y los tejidos blandos mediante su efecto sobre la síntesis de proteínas y la diferenciación celular ósea. Es necesaria para el desarrollo óseo normal y para las células epiteliales que forman el esmalte en el desarrollo de los dientes (Reichrath, 2007).

Un nivel mínimo de 250 IU/100 kcal (75 µg RE/100 kcal) y un nivel máximo de 750 IU/100 kcal (225 µgRE/100 kcal) fueron especificados primeramente para el contenido de vitamina A en preparados para lactantes. El límite más bajo no fue derivado de la demostración de los requerimientos de vitamina A para el crecimiento del niño, sino en la observación de que los niños crecían normalmente, sin mostrar signos de deficiencia por ingesta inadecuada de vitamina A, y que formaban sus reservas de ésta en el hígado, a este nivel de ingestión. Mientras que el límite superior de 750 IU/100 kcal (225 µgRE/100 kcal) fue basado en la presunción de que algunos niños podrían consumir sólo 0.3 a 0.4 litros de fórmula al día y que la absorción de grasa podría ser insuficiente en los niños, particularmente en los recién nacidos (Olson, 1989). El papel de la toxicidad surgió después, sólo en el contexto de que una ingesta de 1 litro de fórmula al día que contenga vitamina A en este límite superior, podía proveer algo menos que una prescripción de dosis de 10,000 IU (3000 µg RE) de vitamina A. Basado en la concentración de 200 µg/l de RE en la leche humana, la ingesta de vitamina A de los niños alimentados al pecho podría ser equivalente a 30 µg RE/kg/día para un niño de 5 kilos, o 30 µg RE/kg/día para un niño que ingiera 100 kcal/kg/día. Este nivel de ingesta, se considera que esta por arriba del requerimiento para los niños alimentados al pecho (Olson, 1994). No obstante, la presencia de la lipasa en la leche humana, estimulada por las sales biliares, ha sido mostrado que incrementa la eficiencia de la hidrólisis de los esteres de retinol (la principal forma de vitamina A en la leche materna y los preparados para lactantes) en comparación con los de fórmula. Consecuentemente, este nivel de ingestión puede no ser adecuado para satisfacer las necesidades de los niños alimentados con fórmula. La distribución de los ácidos grasos en la leche humana puede también incrementar la absorción de vitamina A. Por lo que un valor mínimo para los preparados para lactantes mayor que 30 µg RE/100 kcal parecería deseable para los niños que se alimenten con fórmula.

No se encuentra ninguna razón para sospechar que un nivel mínimo de 60 $\mu\text{g RE}/100$ kcal, como es especificado por la Comisión Europea (2006/141/CE) sea inadecuado. Esta recomendación fue basada en la cantidad de vitamina A ingerida por niños que son alimentados al pecho por madres lactantes sanas.

Por otro lado la toxicidad es debida a que la vitamina A es almacenada en el cuerpo. La ingestión de cantidades muy altas de vitamina A en humanos causa muchas manifestaciones tóxicas como por ejemplo, dolor de cabeza, vomito, anorexia, diplopia, alopecia, sequedad de las mucosas, descamación de la piel, anormalidades en los huesos y daño hepático. Los signos de toxicidad aparecen usualmente sólo después de una ingesta al día mayor que 15,000 $\mu\text{g RE}$ (50,000 IU) en adultos y 6,000 RE $\mu\text{g RE}$ (20,000 IU) en niños, por un periodo de un mes o más (Brin, 1978). Toxicidad en niños ha sido reportada de ingestiones de 7,500 a 21,300 $\mu\text{g RE}/\text{día}$ (25,000 a 71,000 IU/día) (Raiten, 1998). Se recomienda un contenido máximo de vitamina A para los preparados para lactantes de 500 IU/100 kcal (150 $\mu\text{g}/100$ kcal).

Vitamina E

Existe en 4 formas (α , β , γ y δ), ordenadas en forma decreciente de acuerdo con su actividad fisiológica, todas ellas pertenecientes al grupo de los tocoferoles, siendo la α la más importante por tener una mayor actividad biológica (Figura 10). Los tocoferoles contienen dobles enlaces en su estructura química, por lo que funcionan en el cuerpo humano como antioxidantes naturales. La alimentación provee generalmente una mezcla de compuestos con diferente actividad de vitamina E, y por lo tanto es necesario utilizar una unidad común cuando se expresa el contenido de la actividad de la vitamina E. La comparación estándar es dl- α -tocopherol definido como 1.49 IU/mg ó un equivalente de tocoferol (TE) (Farrell, 1994). La actividad de otros isómeros, relativo al isómero α , es acetato de dl- α -tocopherol = 70% (0.7 TE/mg), β = 40% (0.4 TE/mg), γ = 10 a 30% (0.1-0.3 TE/mg), y δ = 1% (0.1 TE/mg).

Se pueden resumir las siguientes funciones de la vitamina E:

1. **Función fisiológica:** Consiste en su papel contra los radicales libres, evitando que estos radicales libres y oxiden a los PUFA de las membranas celulares, las proteínas ricas en grupos tiol de las membranas y del cito esqueleto, y los ácidos nucleicos. Muchos de los sistemas enzimáticos celulares, el transporte mitocondrial de electrones y la exposición a diversos factores ambientales, forman especies de oxígeno reactivo y otros radicales libres en condiciones normales, lo que ha dado lugar a la evolución de un sistema complejo de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos cuyo objetivo es detoxificar esos radicales libres. Al reaccionar con un radical libre, la molécula de tocoferol se convierte en un radical tocoferosil, que puede ser reducido de nuevo a tocoferol por la vitamina C o por el glutatión, y posiblemente, por la ubiquinona.
2. **Función antioxidante:** La vitamina E protege frente a metales pesados, las hepatotoxinas que general los radicales libres y diversos fármacos que provocan lesiones por oxidación. También puede proteger contra contaminantes ambientales como el ozono. Protege a la LDL de la oxidación y conlleva a un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares.
3. **Función inmunitaria:** Es importante para la función de los linfocitos T. Datos epidemiológicos sugieren que las personas con ingestas y niveles plasmáticos bajos de vitamina E corren mayores riesgos de sufrir determinados tipos de cáncer, en especial de pulmón y de mama.
4. **Función sobre el sistema nervioso, musculoesquelético y retina:** Una función fisiológica muy importante de la vitamina E es la protección del sistema nervioso, el musculoesquelético y la retina ocular frente a la oxidación. Para el desarrollo normal de los sistemas neuromusculares y para el funcionamiento adecuado de la retina, es necesario que la ingesta y la absorción de esta vitamina sea adecuada. La producción de neurotransmisores en el sistema nervioso va acompañada de la generación de grandes cantidades de radicales libres, por lo que parece que esta vitamina es esencial para evitar los daños causados por estos radicales en las mitocondrias y en las membranas axonales del sistema nervioso (Brigelius-FlohE, 2006).

La relevancia de estas actividades en los preparados para lactantes radica en las concentraciones relativas de estos isómeros en los aceites utilizados para la producción de éstas. Por ejemplo, en el aceite de maíz y en el aceite de soja hay una mayor proporción del isómero γ (aproximadamente 60 mg/100 g) que del isómero α (poco más de 10 mg/100 g).

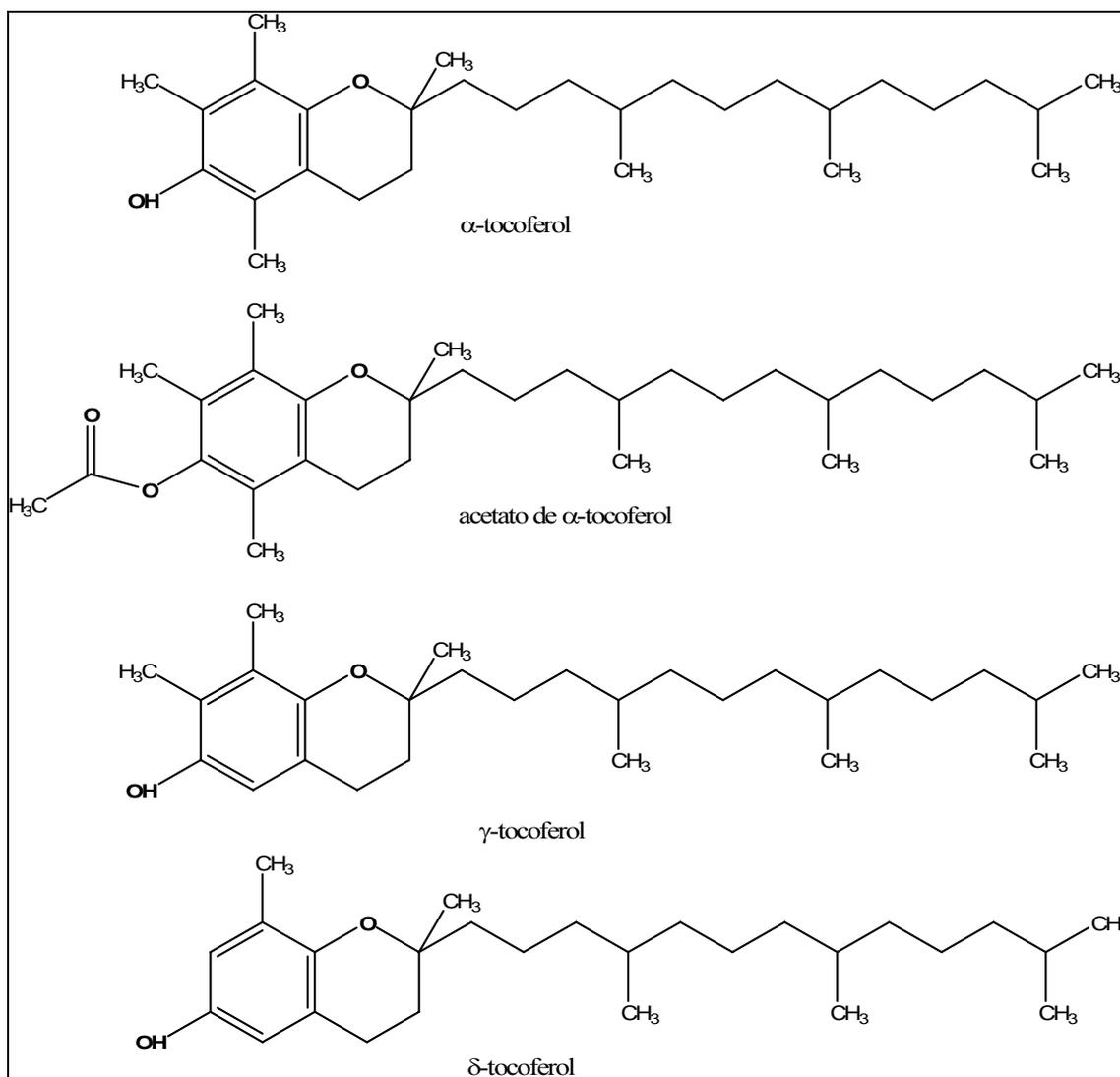


Figura 10. Vitamina E.

La absorción de la vitamina E se lleva a cabo en el intestino delgado por transporte pasivo y no requiere proteínas acarreadoras, pero requiere de la solubilización en forma de micelas. El grado de absorción depende de la cantidad de grasa absorbida. La eficiencia de absorción del α -tocopherol disminuye cuando incrementa la ingestión. Entre un 50 y 70% de la vitamina E consumida (en un rango de ingestión de 0.4 a 1 mg) es absorbida; sin embargo a dosis farmacológicas (por ejemplo 200 mg) la absorción puede decrecer a menos del 10%. En el organismo existe una correlación entre la

concentración de ácidos grasos poliinsaturados y la de la vitamina E, de tal manera que a medida que aumenta el consumo de los PUFA se requiere una mayor cantidad de vitamina E para evitar reacciones de oxidación. La vitamina E protege a estos ácidos grasos interfiriendo con las reacciones de los radicales libres que pueden resultar en daño celular. Debido a la interrelación entre la vitamina E y los fosfolípidos de las membranas celulares, es reconocido que el requerimiento de α -tocoferol es proporcional a la cantidad de PUFA que es consumida (Farrell, 1994).

Los individuos más susceptibles de tener un riesgo por deficiencia de vitamina E son los niños pretérmino y de bajo peso al nacer, así como pacientes con problemas de mala absorción de grasa. Los primeros desórdenes atribuidos a la deficiencia de vitamina E en humanos son la disfunción plaquetaria, la anemia hemolítica, y los desórdenes neurológicos. Estados de deficiencia en niños son también asociados con afecciones de absorción de grasa como fibrosis quística, colestasis y enfermedad celiaca. Hay relativamente pocos estudios de la suplementación con vitamina E en niños a término (Bell, 1987). El interés de la vitamina E en la nutrición infantil comenzó en los años cuarenta, cuando los investigadores demostraron que los eritrocitos eran susceptibles de hemólisis en presencia de peróxido de hidrógeno y que la vitamina E inhibía este efecto (Bell, 1989). La importancia clínica de este efecto se hizo clara cuando fórmulas con altos niveles de PUFA fueron dadas en niños pretérmino (Oski, 1967). La combinación de una ingesta elevada de PUFA y bajos niveles de vitamina E contribuyeron al desarrollo de anemia hemolítica, trombosis, edema y reticulosis. Después se vio que estas manifestaciones se prevenían con la suplementación de vitamina E (Bell, 1989).

La principal evidencia de la toxicidad de la vitamina E en niños a término viene de la extrapolación de los datos de niños pretérmino. Diversos estudios contienen documentación de una asociación entre la administración intravenosa de una mezcla racémica de acetato de α -tocoferol y fallo hepático y renal que causó la muerte de 38 niños pretérmino y enfermedades serias en muchos otros (Snodgrass, 1992). Diversos investigadores han realizado estudios farmacocinéticos de vitamina E en niños pretérmino y demostraron que dosis orales de 13 mg/kg/día resultaron en niveles de plasma de 1-3 mg/día sin toxicidad. Aunque no hay estudios directos de toxicidad en niños a término, no es probable que ellos sean más susceptibles a los efectos adversos que los niños pretérmino. Bell (1989), sugirió que el límite máximo para la vitamina E en los preparados para lactantes debería ser 10 mg/100 kcal, el cual coincide con los valores reportados de vitamina E en la leche humana.

Se recomendó un contenido mínimo de vitamina E en los preparados para lactantes de 0.5 mg de equivalente de α -tocoferol (α -TE) por gramo de PUFA, pero no menos de 0.5 mg α -TE/100 kcal. Esto está basado en la media menos una desviación estándar del valor de vitamina E en la leche humana, y en la ausencia de datos que justifiquen un cambio en este valor (Raiten, 1998). Asimismo un nivel máximo de 5 mg α -TE/g PUFA, basado en el percentil 90 de los análisis de la FDA a los preparados para lactantes se recomienda. Este nivel máximo está por debajo de los niveles de ingesta que podrían causar toxicidad, interpretado de estudios animales, toxicología en adultos y informes de efectos adversos en niños pretérmino (Raiten, 1998).

Las vitaminas liposolubles que se evalúan en esta tesis, son las vitaminas A y E. La oxidación de éstas, está influenciada por metales, actividad de agua y temperatura de la misma manera que los factores que afectan a los lípidos, y pueden seguir reacciones que conducen a los hidroperóxidos. Los antioxidantes como el Butilhidroxitolueno (BHT) y la vitamina E aumentan considerablemente la estabilidad de la vitamina A. Por otra parte la vitamina A es fácilmente atacada por los hidroperóxidos provenientes de la oxidación de otros lípidos insaturados. Los alimentos deshidratados son los más propensos a la pérdida de la vitamina A y E por oxidación, lo cual depende de la intensidad del tratamiento térmico que se le haya dado y de las condiciones de almacenamiento.

3.4.2 Vitaminas hidrosolubles

A diferencia de las vitaminas liposolubles, el ser humano debe ingerir constantemente este grupo de nutrientes ya que el sistema metabólico no permite almacenarlos, y en la orina se elimina cualquier exceso. Tienen la característica común de ser solubles en agua. Son absorbidas por difusión simple y procesos mediados por transportadores y tienden a ser distribuidas en las fases acuosas de las células (citoplasma, espacio de la matriz mitocondrial). Su principal función es como cofactores o cosustratos esenciales de enzimas implicadas en múltiples procesos metabólicos.

Durante la manipulación y el procesamiento de los alimentos se pueden perder fácilmente grandes cantidades de este grupo de vitaminas. La vitamina hidrosoluble que se estudia en esta tesis es la vitamina C.

Vitamina C

Estrictamente hablando, la vitamina C no es un ácido ya que en su molécula no existe un grupo carboxilo libre, es en realidad la lactona del ácido 2-ceto-L-gulónico, que se comporta como ácido. Se encuentra en el organismo en tres formas distintas:

1. Como ácido ascórbico reducido
2. Como radical ácido semihidroascórbico
3. En la forma oxidada como ácido deshidroascórbico.

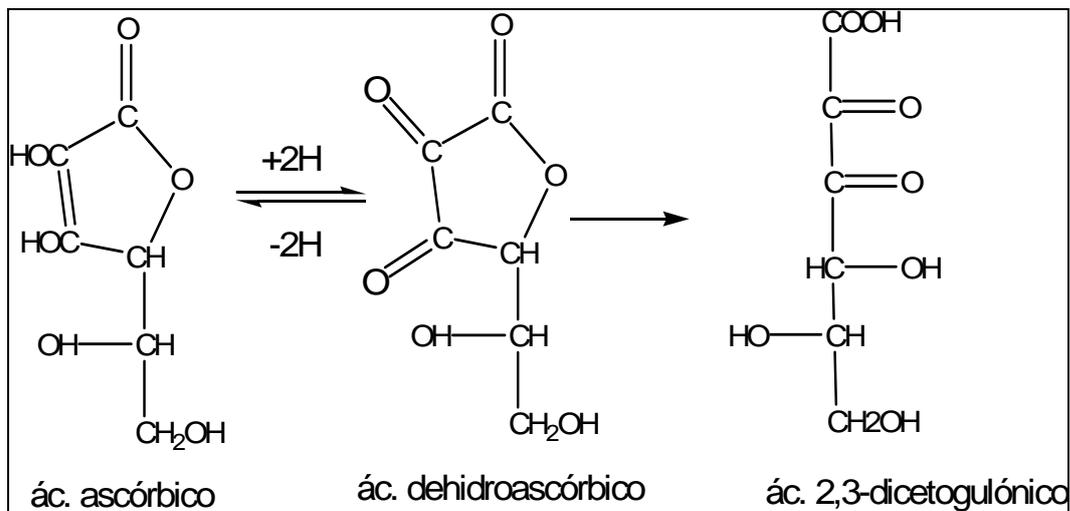


Figura 11. Oxidación de la vitamina C.

Presenta una reacción reversible de oxidación (Figura 11), por lo que desempeña funciones importantes en las reacciones metabólicas de óxido-reducción (Shoji, 2007), desde la homeostasis del cortisol hasta la síntesis de neurotransmisores (hidroxilación de la dopamina para formar noradrenalina), pasando por la síntesis de carnitina. Sus principales funciones se pueden agrupar como sigue (Englard, 1986):

1. Participación en las reacciones de la oxigenasa
2. Participación en las reacciones microsomales de hidroxilación, incluyendo las del sistema del citocromo C
3. Como antioxidante: es uno de los “recolectores de basura” más importantes del compartimento acuoso.

4. Intervención en el metabolismo del hierro: el ácido ascórbico cataliza la reducción de Fe^{+++} a Fe^{++} . Además mejora su absorción debilitando el efecto de los fitatos y otras moléculas que ligan hierro.
5. Intervención en el sistema inmune
6. Participación en la síntesis de tejido conjuntivo. En este tejido se produce la hidroxilación, dependiente de vitamina C, de prolina a hidroxiprolina, así como la de lisina a hidroxilisina.

De todas las vitaminas, la C es la más lábil e inestable, y puede ser degradada a través de muchas vías: las de oxidación y degradación térmica son las más importantes. Las reacciones de oxidación de la vitamina C se aceleran por el calor, los álcalis, la presencia de algunos metales como el cobre y el hierro y la acción de la luz. Es estable en presencia de pH ácidos y en ausencia de oxígeno resiste temperaturas de esterilización.

La vitamina C, además, juega un papel importante en la actividad antioxidante y de inmunomodulación para el bebé. El ácido ascórbico es la principal forma biológica activa, pero también el ácido dehidroascórbico tiene actividad biológica, ya que en el cuerpo humano fácilmente puede ser convertido a ácido ascórbico (Graham, 1992; Lee, 2000; Tudela, 2002).

La vitamina C funciona en el cuerpo como un cofactor de sistemas enzimáticos críticos y como un agente reductor (Levine, 1996). También la vitamina C ha sido identificada como cofactor en 8 sistemas enzimáticos. Entre éstos está su papel como un agente reductor, protegiendo al cobre en la enzima responsable de la conversión de la dopamina a norepinefrina. La vitamina C es un cofactor importante en las enzimas responsables de la biosíntesis de colágeno. Otros sistemas incluyen aquellos responsables para la conversión de triptófano a 5-hidroxi-triptófano y el metabolismo de la tirosina, el ácido fólico y la histamina, la síntesis de carnitina, y el incremento de la absorción de hierro. Como un agente reductor, la vitamina C actúa como un antioxidante para “detoxificar” las especies reactivas como lo son los nitritos y los radicales libres pro-oxidantes, por ejemplo: super-óxido, radicales hidroxilo y ácido hipocloroso. También se ha dicho que la vitamina C juega un papel en el reciclado de la vitamina E. La vitamina C es capaz de incrementar la absorción de hierro, manteniéndolo en su forma reducida, la cual es la forma más biodisponible. La vitamina C está presente en la leche humana y juega diversos papeles bioquímicos

relacionados a la función del sistema inmunológico, además de ayudar en el mantenimiento como barrera natural contra las infecciones, estimulando los leucocitos por su actividad fagocítica y antimicrobiana, aumentando la producción de anticuerpos y también incrementando la síntesis de interferón. Por tanto, para el adecuado crecimiento, desarrollo y supervivencia del niño, los preparados para lactantes deben aportar vitamina C, además de que ésta es un antioxidante natural que previene las reacciones de oxidación en la fórmula durante su vida útil.

4. Fabricación de preparados para lactantes de base láctea en polvo

En la Figura 12 se presenta de manera esquemática y generalizada un ejemplo de fabricación de un preparado para lactante de base láctea en polvo. El proceso en sí tiene dos finalidades básicas, la primera radica esencialmente en aproximar la composición del preparado, tanto como sea posible, a la composición estándar de la leche humana, y la segunda en garantizar la buena conservación del producto a lo largo de su vida útil. Se utiliza como ejemplo la fórmula en polvo debido a que es ésta, la más extendida y comercializada en diferentes lugares del mundo.

El objeto principal de la elaboración del preparado en polvo es convertir la leche cruda líquida perecedera en una fórmula que pueda conservarse durante muchos meses (24 o más, dependiendo de la fórmula y la legislación) sin pérdidas sustanciales de calidad. La fórmula tiene que tener ciertas características: ser fácil de manipular por la madre, es decir, no ser demasiado pulverulenta, ni excesivamente voluminosa, tiene que fluir libremente y no presentar aglomerados.

La materia prima utilizada debe reunir una serie de condiciones que la clasifican como clase A (<500 000 células somáticas /ml y <100 000 unidades formadoras de colonia /ml). Posteriormente son eliminadas las sustancias sólidas de la leche mediante una centrifugación, en donde las materias sólidas como el precipitado de la caseína y lactosa cristalizada son eliminadas y la leche es desnatada. Dependiendo del fabricante, la fórmula infantil puede realizarse con leche desnatada, leche parcialmente desnatada o leche entera, por lo que los procesos a seguir no son iguales. Posteriormente se realiza una concentración que reduce el contenido de agua, quedando un producto con un contenido de materia sólida que puede fluctuar entre 30-55% de remanente sólido. Este proceso facilitará después el proceso de secado y economizará el coste del atomizador. Posteriormente se adicionan otras materias primas como lactosa, dextrinomaltosa, suero, aceites vegetales, nata, proteínas, etc., (la adición de vitaminas y otros compuestos termosensibles se puede realizar en seco, después de la atomización) para pasteurizar el preparado y destruir los microorganismos patógenos por tratamiento térmico (ejemplo: 72°C durante 15 segundos). Posteriormente se homogeniza el producto a fin de lograr una perfecta distribución de todos los componentes de la formulación. Finalmente la formulación se convierte en polvo, eliminando el contenido

de agua mediante una torre de atomización en la que se separa el agua y queda una formulación en polvo, que debe fluidificarse para lograr las características deseadas del producto, mencionadas anteriormente.

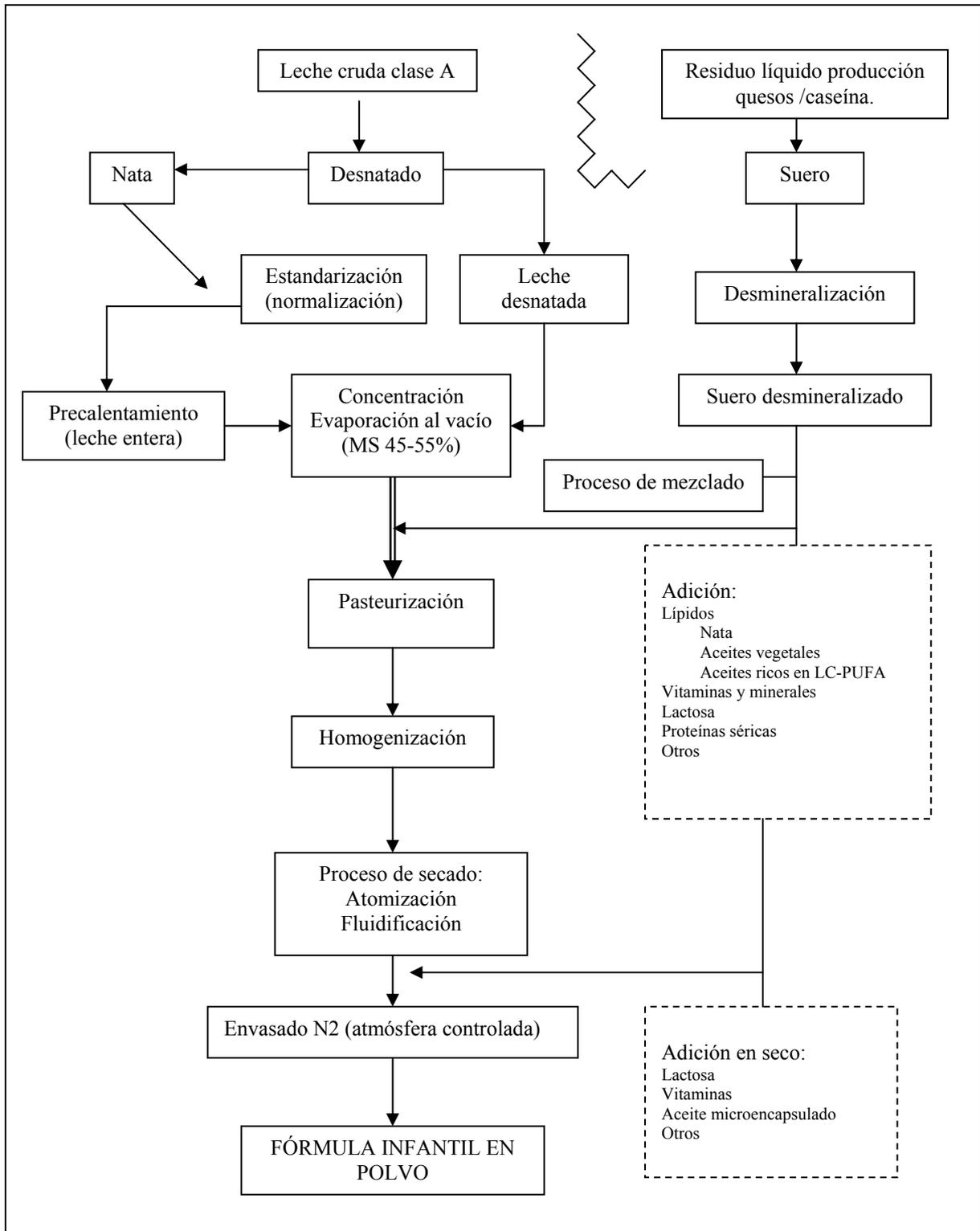


Figura 12. Ejemplo de proceso general de fabricación de preparados para lactantes en polvo.

5. Principales parámetros y aspectos analíticos en la estabilidad de las fórmulas lácteas

La industria alimentaria requiere del uso de la ciencia y la tecnología para evaluar diversos parámetros que le permitan observar y controlar los cambios fisicoquímicos que afecten la estabilidad de las fórmulas. Para poder evaluar fidedignamente estos cambios deben ser considerados algunos aspectos analíticos en la determinación de compuestos, que pueden indicar el grado de estabilidad de las mismas. Asimismo la industria láctea requiere de métodos sistemáticos para la determinación de la oxidación de los lípidos y la reacción de Maillard, como condiciones imprescindibles para el control de calidad. Estos métodos son del tipo de evaluaciones organolépticas, y análisis químicos y físicos. Un sistema ideal sería que de manera fácil y lógica se pudieran relacionar a una escala de valores numéricos del grado de deterioro obtenido por los análisis instrumentales, con los análisis organolépticos sensoriales. No obstante se ha podido comprobar que no existe un método que pueda correlacionar perfectamente todas las determinaciones debido a la complejidad que esto presenta. De ser posible, se deben evaluar todos los componentes posibles que indiquen los cambios que sufre una fórmula láctea durante su fabricación y almacenamiento.

5.1 Monosacáridos y disacáridos

El calentamiento causa muchas de las reacciones químicas que ocurren durante la producción y fabricación de las formulaciones de base láctea. Durante el calentamiento, la lactosa experimenta la reacción de Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein (L-A), dando inicialmente disacáridos isoméricos, principalmente lactulosa. Dado que este compuesto no se encuentra de manera natural en la leche, pero es formado en los productos derivados de ésta que sufren algún proceso térmico, se dice que es un buen indicador del daño inducido por el tratamiento térmico durante el procesado de este tipo de productos (Andrews, 1986; Olano, 1992; Friedman, 1996; Lopez-Fandino, 1999; Belloque, 2001; Kockel, 2002; Feinberg, 2006). Las formulaciones de base láctea en polvo son frecuentemente almacenadas por largos periodos de tiempo antes de que sean consumidas, y por lo tanto cambios en su composición pueden ocurrir. La Reacción de

Maillard es generalmente baja a temperatura ambiente en sistemas líquidos, pero en alimentos con bajo contenido de humedad, ésta se acelera (Troyano, 1994).

Las formulaciones de base láctea varían, entre otras cosas, en su composición nutricional, dependiendo del tipo de fórmula, del fabricante y de las materias primas utilizadas. Por lo tanto, la velocidad de la Reacción de Maillard y la isomerización de la lactosa puede ser muy diferente (Pereyra Gonzales, 2003).

Muchas técnicas han sido desarrolladas a fin de evaluar la Reacción de Maillard en los alimentos. Una de ellas es mediante el análisis de los hidratos de carbono contenidos en éstos. Para evaluar su contenido existen numerosos métodos. Uno de los cuales es mediante el uso de espectrofotometría (Khattab, 1978; Bazaraa, 1996). También en algunos estudios la lactulosa es identificada por métodos enzimáticos (Pereyra Gonzales, 2003). La principal desventaja de estos consiste en la dificultad para evaluar simultáneamente diferentes azúcares.

Otro método desarrollado para evaluar el daño en leches en polvo es la electroforesis capilar (De Block, 2003), la cual consiste en monitorear la β -lactoglobulina de la fracción proteica del suero. A pesar de su uso prometedor, la preparación de la muestra, debe ser precipitada con HCl durante toda la noche a 4°C. Esto significa mucha pérdida de tiempo en el análisis de una muestra. También otro método para evaluar monosacáridos como la glucosa, fructosa y disacáridos como la lactulosa, lactosa, sacarosa y maltosa es la separación a alto pH por intercambio aniónico, del cual existen diversas aplicaciones analíticas para el estudio de los hidratos de carbono en alimentos (Cataldi, 2000).

Uno de los métodos comúnmente usados en el análisis de los azúcares es la cromatografía de gases (GC). Troyano (1991; 1996) desarrollaron un método por GC. Con el cual es posible cuantificar la glucosa, galactosa, *myo*-inositol, lactulosa, *N*-acetilglucosamina, *N*-acetilgalactosamina y otros derivados. Mediante la aplicación de la GC se puede determinar por ejemplo, la intensidad del tratamiento térmico en leche pasteurizada por la cantidad de lactulosa formada durante este proceso y además determinar el contenido de otros monosacáridos (Valero, 2000). También en leche UHT (Belloque, 2001) y en suero de leche (Villamiel, 2002) la GC ha sido usada para determinar monosacáridos. A pesar de que la CG es un método sensible para el análisis de azúcares, la preparación de la muestra es complicada y no se pueden determinar

disacáridos como la lactosa, por lo que en leche y derivados lácteos su uso es limitado. Además en esta técnica, la composición anomérica (α y β) es obtenida lo que se traduce en más de un pico cromatográfico para cada compuesto. Por ello este procedimiento es tedioso para ser usado rutinariamente.

Finalmente en muchos estudios, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es ampliamente usada por su exactitud, habilidad para separar compuestos y rapidez. Ésta apareció hace más de 25 años, pero permanece como una de las técnicas más ampliamente utilizadas. HPLC con detección de índice de refracción (RI) es una técnica poderosa para cuantificar varios tipos de hidratos de carbono. Ha sido usada para determinar glucosa, fructosa y sacarosa en jugo de manzana (Garza, 1996), disacáridos como lactosa, galactosa y lactulosa en suero de leche, y sacáridos como fructosa, glucosa sacarosa, maltosa y lactosa en cereales, frutas enlatadas, vegetales enlatados y galletas (Casterline, 1999). HPLC-RI ha sido también usado para determinar azúcares en bebidas (Yuan, 1999), azúcares en productos cárnicos (Vendrell-Pascuas, 2000). A pesar de las dificultades para usar gradientes y la relativamente baja sensibilidad asociada con la refractometría, el HPLC-RI es un método para la determinación de azúcares económico, simple y rápido.

5.2 Lisina disponible

La lisina es un aminoácido esencial, y generalmente utilizado como un indicador del valor biológico potencial de la proteína en los alimentos. El grupo ϵ -amino de la lisina es susceptible a las reacciones químicas lo que puede provocar que el aminoácido no sea biodisponible desde el punto de vista de la nutrición. Durante los tratamientos térmicos y el almacenamiento de los preparados para lactantes, reacciones de Maillard pueden ocurrir, entre los azúcares reductores y la lisina u otros aminoácidos. El conocimiento de la lisina que es bloqueada y de la lisina disponible, facilitan la evaluación del daño térmico que sufre un preparado para lactante, ya que la estabilidad de la lisina es una de los factores nutricionales más importantes dada la trascendencia de este alimento como única fuente de alimentación en los primeros meses de vida, en caso de no dar el pecho al bebé. Si el grupo ϵ -amino reacciona con la lactosa, forma un compuesto de Amadori, como se explicó en la sección (3.1.1.1 Reacción de Maillard) de esta tesis, desemboca

en un compuesto que no puede ser atacado por las enzimas proteolíticas durante la digestión (Finot, 1976; Erbersdobler, 2007; Arnoldi, 2007).

La estimación analítica de la lisina en los alimentos, puede ser determinada como lisina total o como lisina disponible. El contenido de lisina total es generalmente determinado después de una hidrólisis ácida, pero esta determinación no refleja el contenido de lisina nutricionalmente disponible. Esta determinación sólo es parecida a la lisina disponible si el alimento no es propenso a la reacción de Maillard. En cuanto a la determinación analítica de la lisina disponible, muchos métodos químicos dependen de la reacción con un agente derivativo que reaccione con el grupo ϵ -amino libre de la lisina presente en las proteínas. Por lo que la lisina disponible reacciona con el agente derivativo, mientras que la lisina bloqueada no. La reacción de derivatización más extendida para determinar el contenido de lisina disponible fue establecida por Sagner en 1945, quien usó 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB). El derivativo formado es N ϵ -dinitrofenil-lisina (N ϵ -DNP-lys), el cual puede ser medido en un espectrofotómetro después de una hidrólisis ácida y extracción (Carpenter, 1960). Este método directo clásico da resultados similares que los obtenidos tanto de evaluaciones biológicas como de digestión enzimática *in vitro*. Por lo que la técnica FDNB es uno de los métodos más fiables para la determinación de la lisina disponible. Uno de los problemas en la determinación es que el agente derivativo no es específico para la lisina y que los hidratos de carbono presentes en la muestra pueden dar origen a la formación de compuestos interferentes que causarían una estimación errónea del contenido de lisina. Para separar el complejo formado N ϵ -DNP-lys de aminoácidos y otros compuestos interferentes formados durante la hidrólisis, se han utilizado diversos métodos como cromatografía en papel, cromatografía líquido-líquido, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El HPLC es muy rápido y eficiente para separar el complejo de interés y elimina muchas fuentes de error inherentes al procedimiento. Las condiciones de hidrólisis utilizadas por otros autores son largas, inclusive, para un preparado para lactante se reportó un método en donde la muestra tenía que ser tratada por más de 72 horas (Tomarelli, 1985). Otros métodos clásicos requieren de 12 y 24 horas. No obstante, incrementando la temperatura de hidrólisis, Rabasseda (1988) reportó un método de 4 horas de hidrólisis para determinar el contenido de lisina disponible en soja y pescado, y posteriormente otros autores mejoraron y redujeron el tiempo a dos horas y media (Albalá-Hurtado, 1997a).

5.3 Furfurales

En estados avanzados de la reacción de Maillard (RM) se forman compuestos indeseables como los furfurales (van Boekel, 1998; Ramirez-Jimenez, 2000; Zia-ur-Rehman, 2000). Estos compuestos pueden ser indicadores útiles del daño en las formulaciones de base láctea y pueden también ser usados para evaluar la extensión de la reacción de Maillard. Los furfurales pueden ser producidos por dos vías: vía compuestos de Amadori (principalmente ϵ -*N*-deoxilactulosil-L-lisina) provenientes de la RM por una enolización en condiciones ácidas, o vía isomerización de la lactosa (Pellegrino, 1995; Brands, 2001), conocida como la transformación de Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein (L-A) y las subsecuentes reacciones de degradación (Morales, 1998). La Figura 13 muestra la formación esquemática de los furfurales provenientes de la lactosa y la lisina.

Actualmente, los estudios en alimentos procesados, se han enfocado a cuatro furfurales: 5-hidroximetil-2-furaldehído, HMF; 2-furaldehído, F; furil metil cetona, FMC; y 5-metil-2-furaldehído, MF (Keeney, 1959; Dinsmore, 1974; Mijares, 1986; Elnemr, 1988; Albalá-Hurtado, 1997b; Martins, 2000; Ferrer, 2002).

Algunos autores utilizan el término “furfurales totales” en lugar de “furfurales potenciales”. El término furfurales totales puede dar origen a confusión porque puede ser entendido como la suma de furfurales totales presentes en una muestra, por ejemplo HMF + F + FMC + MF, y no al potencial de formación de esos compuestos derivados de sus precursores. Por lo tanto en esta tesis se utiliza el término de furfurales potenciales ya que es más adecuado y se refiere a la suma de los furfurales libres, más la suma de los furfurales ligados a la proteína como compuestos de Amadori, a los furfurales provenientes de los azúcares reductores y a los furfurales formados a partir de precursores.

Desde el desarrollo del método de Keeney y Basette (1959), se realizó una distinción entre el HMF libre y el HMF potencial. En este método, para determinar este último, una muestra de leche tratada térmicamente se recalienta a 100°C con ácido oxálico al 0.3 N para liberar el HMF, porque la formación de éste a partir de los compuestos de Amadori es inducida en condiciones ácidas. Por lo tanto el HMF potencial es la suma de los precursores del HMF (por ejemplo, el HMF ligado a la proteína en los compuestos

de Amadori, el HMF proveniente de los azúcares reductores, o de novo) y el HMF libre. Mientras que el HMF libre se determina omitiendo el calentamiento a 100°C.

Los furfurales como el HMF, pueden ser determinados por espectrofotometría con ácido tiobarbitúrico (TCA). No obstante, una desventaja de este método colorimétrico radica en que el TCA no es específico para el HMF. Además un control estricto del tiempo y de la temperatura de la reacción se requiere debido a que el producto de ésta es inestable (Mijares, 1986). Esta inestabilidad trae como consecuencia una alta variabilidad en los resultados obtenidos. Actualmente las técnicas por HPLC pueden ser usadas para medir de manera precisa y fidedigna los furfurales presentes en diversos productos alimenticios (van Boekel, 1987; Morales, 1992; Morales, 1997).

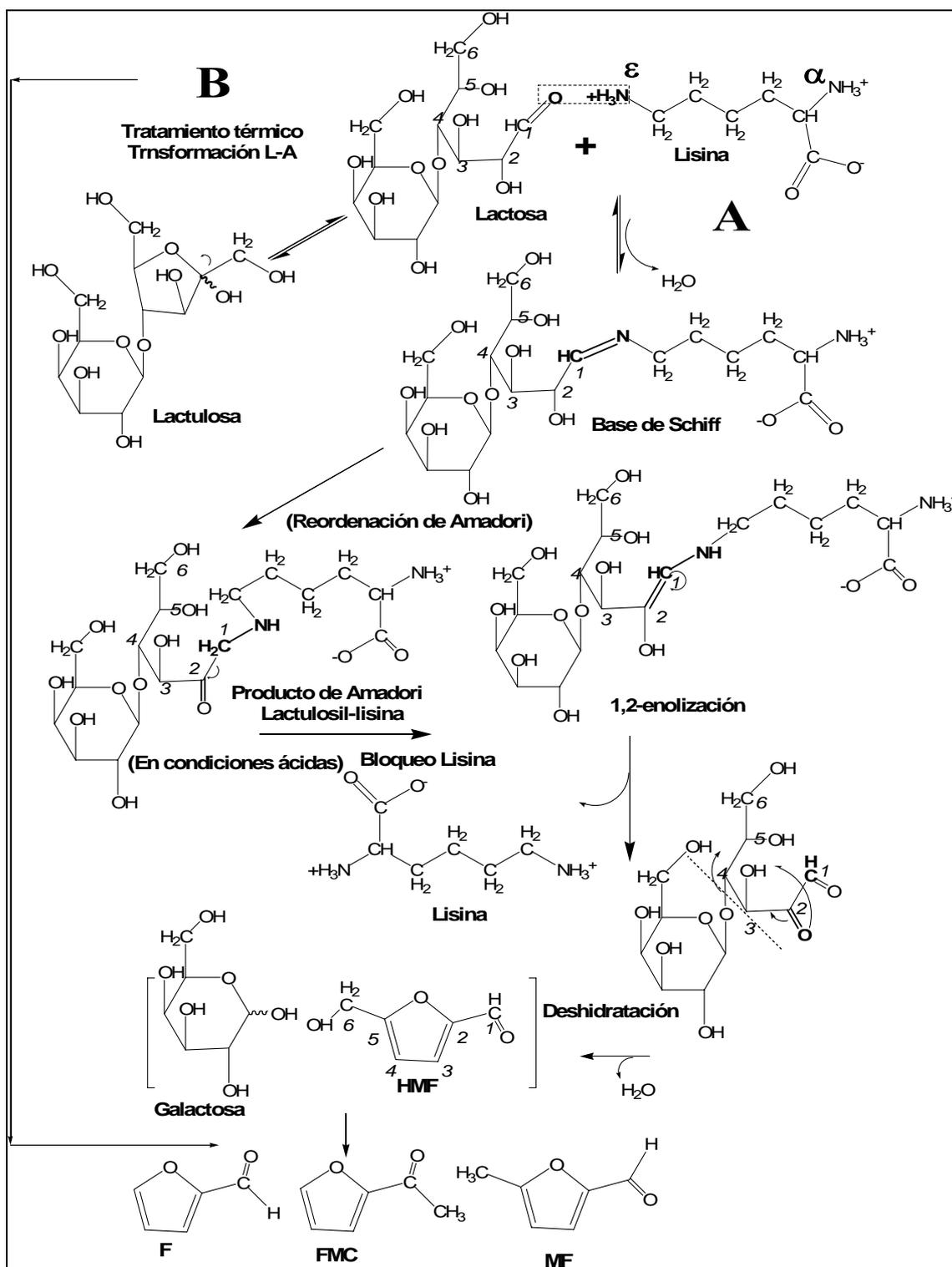


Figura 13. Presentación esquemática de la formación de furfurales provenientes de la lactosa y del grupo ϵ -amino de la lisina en la Reacción de Maillard: (A) vía compuestos de Amadori, (B) isomerización de la lactosa (L-A). Nota: La isomerización de la lactosa a lactulosa, no es un proceso de la RM, pero esta reacción es importante en el estudio de las formulaciones de base láctea.

Por HPLC se pueden determinar los furfurales específicamente, y la formación de un derivativo coloreado no se requiere ya que existe una fuerte absorción de los furfurales a los rayos UV (aproximadamente a 280 nm).

Un buen método de análisis de los furfurales en fórmulas de base láctea debe separar los furfurales del resto de los componentes como por ejemplo proteínas, grasa y otras macromoléculas interferentes.

5.4 Peróxidos

La velocidad de oxidación depende de la composición en ácidos grasos más o menos insaturados, de la concentración y actividad de los pro y antioxidantes, de la presión parcial de oxígeno, de la superficie que entra en contacto con el oxígeno y de las condiciones en que se almacena el alimento (temperatura, luz, actividad de agua). La medida de la rancidez presenta ciertas dificultades. Es imposible realizar una determinación individual de todos los compuestos generados en la oxidación, por lo que no puede realizarse una medida cuantitativa real. Por ello, se determinan una serie de componentes o grupos de componentes suponiendo que puede existir una correlación simple entre su evolución y el grado de oxidación.

La modificación de los ácidos grasos es principalmente transmitida por un mecanismo autocatalítico de “radicales libres” llamado autooxidación. Los hidroperóxidos (ROOH) son considerados los productos iniciales de la reacción más importantes, que son obtenidos de la autooxidación lipídica. Ellos tienen una naturaleza lábil muy transitoria, la cual sufre cambios y deterioro con los radicales. Su rotura causa productos secundarios como pentanal, hexanal, 4-hidroxinonanal y malondialdehído (MDA). Las técnicas más usadas para evaluar la oxidación lipídica son el índice de peróxidos, los dienos conjugados, test de Kreis, determinar el contenido de hexanal y determinar el contenido de MDA (Romero, 1997). Como indicador de las primeras etapas de oxidación sólo mencionaremos el índice de peróxidos (PV). Esta técnica se fundamenta en la determinación de los peróxidos formados durante el período inicial de la reacción en cadena, son por lo tanto productos primarios de oxidación. Así pues, es una medida de detección incipiente de la rancidez. Sus niveles a lo largo del tiempo de conservación presentan un máximo por lo que de no conocerse la historia del producto, un determinado valor de PV puede no proporcionar información suficiente del grado de

rancidez existente. El PV es un buen indicador de la calidad de una grasa. Una grasa recién refinada debe tener un PV inferior a 1 meq/kg. Es muy útil en estudios de estabilidad en los que se quiere observar a lo largo de la vida útil del producto, cómo se va oxidando la fracción lipídica en diferentes condiciones de tiempo y temperatura. El índice de peróxidos se basa en un análisis iodométrico (FIL-IDF, 1991). Se define como los miliequivalentes de oxígeno activo contenidos en un kilogramo de grasa pesada, calculados a partir del yodo (I_2) liberado por el yoduro potásico (KI) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$PV = \frac{(V-V')*N*1000}{m}$$

en donde:

V = volumen de disolución de tiosulfato de sodio, en ml, consumido en el ensayo de la muestra.

V' = volumen de disolución de tiosulfato de sodio, en ml, consumido en el blanco.

N = normalidad de la disolución de tiosulfato de sodio.

m = peso, en gramos, de la muestra.

5.5 Perfil de ácidos grasos

La determinación del perfil de ácidos grasos, es necesaria para conocer específicamente la composición de la fracción lipídica de las fórmulas lácteas. Nos da información cualitativa y cuantitativa del contenido de cada ácido graso, tanto de los saturados, como de los mono- y poli-insaturados. Asimismo se puede evaluar la relación de los n-6 con los n-3, o específicamente del DHA con respecto al AA. Debido a que en los preparados para lactantes el contenido de la grasa no sólo es de origen animal, es decir de la leche de vaca utilizada en la fabricación, sino que generalmente es utilizada una mezcla de aceites vegetales y en algunos casos, ácidos grasos LC-PUFA añadidos de otras fuentes. Es necesario analizar la composición final de éstos, no sólo en producto terminado, sino conocer la evolución del perfil durante su vida útil; ya que los LC-PUFA son muy susceptibles a la oxidación.

La forma más fácil de evaluar la composición de los ácidos grasos es mediante un método directo, sin previa extracción de la grasa, realizando una saponificación con

metilato sódico y utilizando posteriormente trifloruro de boro como agente metilante, para ser posteriormente extraídos en una fase hexánica que se inyecta directamente en el cromatógrafo de gases (López-López, 2001). En la cromatografía de gases tradicional, una inyección dura aproximadamente 30 minutos para resolver los picos cromatográficos desde el C4 hasta C22, o más. Afortunadamente la reciente introducción de cromatografía de gases ultrarrápida, que utiliza altas presiones, con columnas cromatográficas más estrechas y cortas, hace posible reducir el tiempo requerido para la separación cromatográfica y tener análisis, por ejemplo en tan sólo 5 minutos, lo que significa que se pueden realizar diversas inyecciones de muestras metiladas, en un menor intervalo de tiempo (Bondia-Pons, 2004).

5.6 Compuestos volátiles

Durante la peroxidación de los ácidos grasos insaturados, se forman como productos primarios los hidroperóxidos, los que rápidamente se descomponen para formar una mezcla de productos secundarios de oxidación, como por ejemplo alcanos, alquenos, aldehídos, cetonas, etc. Los hidroperóxidos se degradan por etapas, dando lugar a numerosos productos de descomposición. Cada uno de los hidroperóxidos origina una serie de productos de degradación iniciales, que le son característicos y que dependen de la posición del grupo hidroperóxido en la molécula originaria. Los productos de degradación pueden experimentar después oxidaciones y posteriores descomposiciones, contribuyendo así a la formación de numerosos y variados radicales libres. La multiplicidad de vías de reacción posibles se traduce en una compleja distribución de productos de oxidación, que muchas veces impide conocer con exactitud el hidroperóxido original. Cabe mencionar que los hidroperóxidos comienzan a descomponerse tan pronto como se forman. En los primeros estadios de la autooxidación, la velocidad de formación supera a la de descomposición, pero en etapas posteriores ocurre lo contrario. La primera etapa de descomposición de un hidroperóxido es la escisión del enlace oxígeno-oxígeno del grupo hidroperóxido, lo que da origen a un radical alcoxilo y otro hidroxilo, como se ve en la Figura 14. La segunda etapa de la descomposición de los hidroperóxidos es la ruptura de enlaces carbono-carbono a uno y otro lado del grupo alcoxilo (degradación hemolítica).

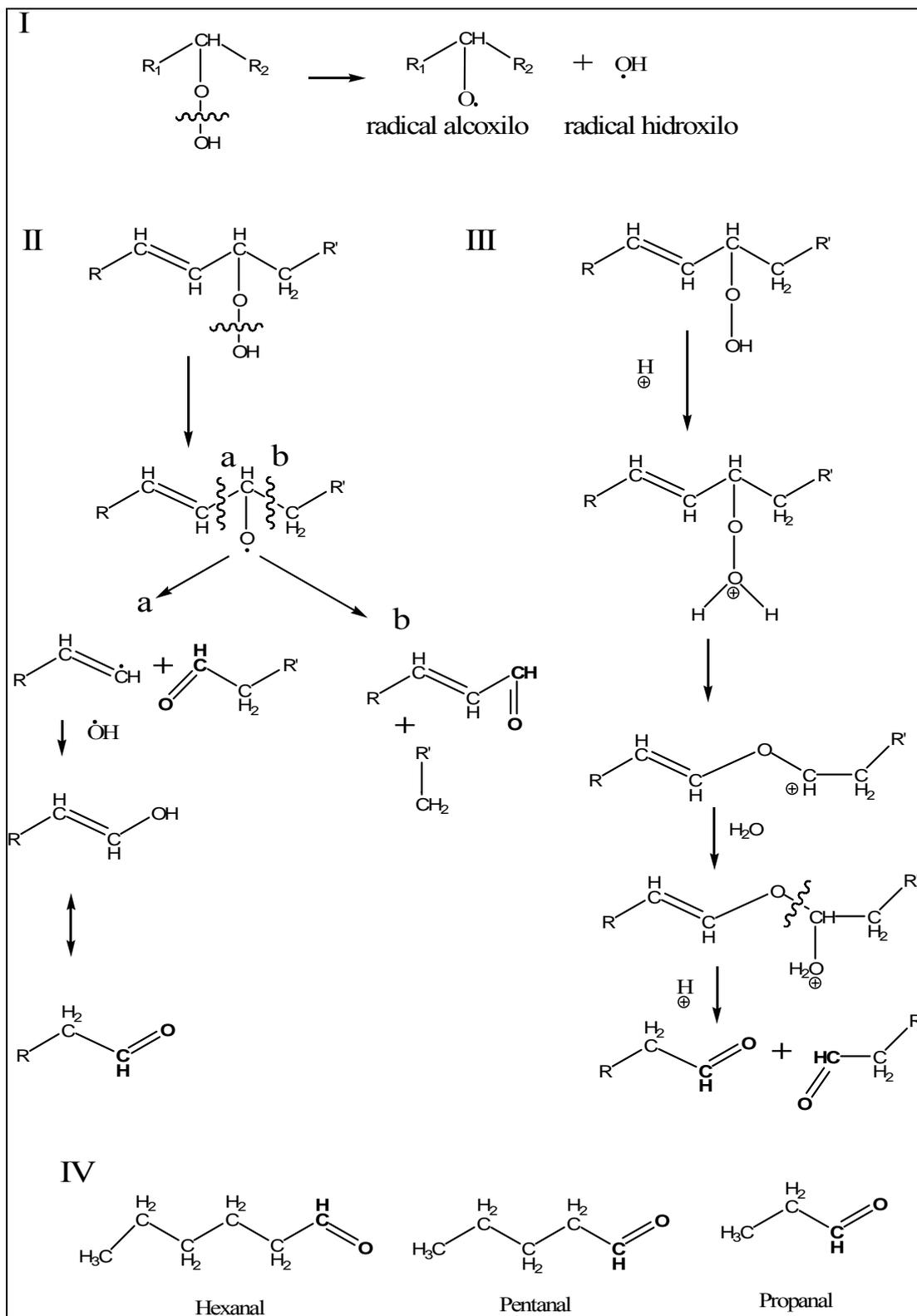


Figura 14. Ejemplo de la descomposición de los hidroperóxidos: I escisión del enlace oxígeno-oxígeno formando un radical alcoxilo y un radical hidroxilo. II, Ruptura de los enlaces carbono-carbono a uno y otro lado del grupo alcoxilo o degradación hemolítica. III, Degradación heterolítica. IV, Estructura del hexanal, pentanal y propanal.

En general, la escisión al lado ácido (es decir, del grupo carboxílico o éster) da lugar a la formación de un aldehído y un ácido (o éster), mientras que la ruptura al lado hidrocarburo (o metilo) produce un hidrocarburo y un oxoácido. Sin embargo, si en la escisión aparece un radical vinílico, se forma un grupo funcional aldehído. En determinadas condiciones se produce una escisión heterolítica entre el grupo hidroperóxido y el doble enlace alílico. Esta rotura tiene un rendimiento más alto y una distribución más selectiva de compuestos carbonilo que la hemolítica. La escisión heterolítica de los hidroperóxidos de linoleato de metilo, por ejemplo, generan fundamentalmente hexanal, nonanal, 9-oxononanoato de metilo y 12-oxododecanoato de metilo. Los peróxidos cíclicos o los peróxidos cíclicos con grupos hidroperóxido, que se forman ordinariamente durante la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, también se descomponen, dando lugar a una gran variedad de compuestos (Fennema, 2000).

Se han desarrollado varias técnicas sensibles para medir la oxidación lipídica, como por ejemplo la determinación de compuestos volátiles, por medio de la cromatografía de gases (GC)-espectrometría de masas, las “narices electrónicas”, la microextracción en fase sólida acoplada a la GC-espectrometría de masas, y la GC-destilación por vapor, entre otras (Snyder, 1988; Hardas, 2002; Fenaille, 2003). Una de las determinaciones más simples de compuestos volátiles en alimentos es la del hexanal y el pentano como indicadores del grado de oxidación. En general el procedimiento global consiste en suspender el alimento en agua caliente para desalojar los compuestos volátiles (Figura 15), que son posteriormente recuperados y analizados (Contarini, 1997).

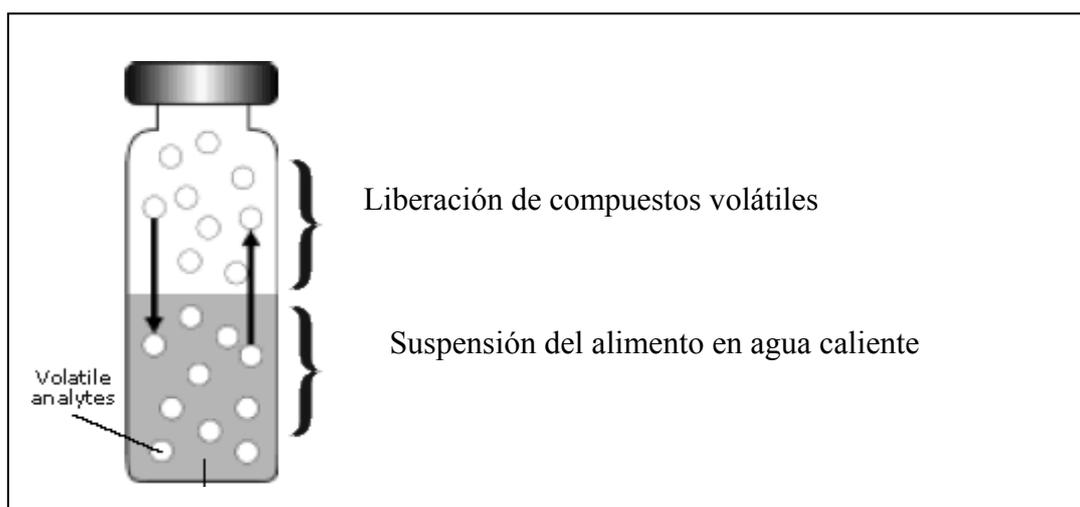


Figura 15. Fases del vial de espacio en cabeza, para la determinación de compuestos volátiles.

Por otro lado, la técnica de espacio en cabeza (Kolb, 1999; Cruwys, 2002), requiere un tratamiento mínimo de la muestra y reduce la formación de compuestos volátiles artefacto, además de que se ha demostrado que es fácil, rápido y fiable para determinar la composición de compuestos volátiles. La técnica de espacio en cabeza es ampliamente usada para determinar compuestos volátiles en productos alimenticios como aceites, pescado y leche. Los preparados para lactantes de base láctea contienen LC-PUFA, como por ejemplo AA (n-6) y DHA (n-3) que son mucho más susceptibles a la oxidación que el ácido linoleico, no obstante la oxidación de este último es mucho más importante debido a que es el ácido graso poliinsaturado que se encuentra en mayor cantidad en los preparados para lactantes (Ulberth, 1995). Además el DHA produce olores y sabores que son indeseables. El pentanal y el hexanal son compuestos volátiles específicos de los ácidos grasos poliinsaturados n-6 y el propanal es un producto de los n-3.

Recientemente se ha desarrollado un método para la identificación y cuantificación del propanal, pentanal y hexanal como indicadores de oxidación en preparados para lactantes por cromatografía de gases de espacio en cabeza estático (Romeu-Nadal, 2004).

5.7 Vitaminas

5.7.1 Vitaminas Hidrosolubles

En este trabajo sólo hablaremos de la **vitamina C**, ya que se ha visto que es un indicador fiable del grado de deterioro de un alimento, al ser realmente susceptible a la oxidación por la luz, el calor, los metales y procesos mecánicos. Por lo que la evaluación de esta vitamina, da una idea generalizada de la estabilidad del producto.

Diversas metodologías se han desarrollado para la estimación del contenido de vitamina C. La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), usando un detector UV, es actualmente la técnica más comúnmente utilizada para el análisis de la vitamina C en alimentos.

Algunos métodos también utilizan detectores electroquímicos o de fluorescencia, debido a la baja absorbancia del ácido ascórbico en el rango UV del espectro. Es por ello que muchos analistas proponen reducir primero el ácido ascórbico a

dehidroascórbico utilizando DL-ditiotreitol, lo que permite por diferencia, una medida de ambos (Dhariwal, 1990; Esteve, 1997; Furusawa, 2001). Recientemente se ha publicado un método rápido para la determinación de vitamina C por HPLC que puede ser aplicado a los preparados para lactantes (Romeu-Nadal, 2006)

5.7.2 Vitaminas Liposolubles A y E

En general, la vitamina A se refiere a todo isómero *trans*-retinol, que es la forma más activa de esta vitamina, mientras que la vitamina E es un término colectivo para los tocoferoles (α , β , γ y δ) y tocotrienoles (Blake, 2004; Blake, 2005).

Los tocoferoles (vitamina E) y el retinol (vitamina A) son añadidos a los preparados para lactantes no sólo para mejorar su contenido en vitaminas, sino para prevenir la oxidación lipídica en el proceso de fabricación y durante su almacenamiento, lo que contribuye también a prolongar su vida útil. También, los preparados para lactantes contienen tocoferoles que provienen de los aceites utilizados en la fabricación de éstas.

Los procedimientos por HPLC han sido de particular interés desde los estudios iniciales de la determinación de vitamina E en alimentos (Parrish, 1980) y han ido creciendo. El uso del HPLC fue primero aplicado para la resolución de la vitamina E y otras vitaminas liposolubles en 1971 por Schmit y cols. (1971). Para estudiar la resolución de las vitaminas liposolubles, incluyendo α -tocoferol y acetato de α -tocoferol fueron utilizados primero dos materiales de relleno para **fase reversa** (RP), Permaphase ODS y Zipax HCP. Por otro lado Van Nierk (1973) demostró el poder del HPLC para el análisis de vitaminas y estableció principios importantes para la aplicación del HPLC en **fase normal** (NP) en el análisis de vitaminas liposolubles. Los más importantes son:

- 1.- Como los aceites pueden ser directamente inyectados en una columna de silica, no se requiere mayor preparación de la muestra que la dilución del aceite.
- 2.- Los isómeros posicionales β - y γ - pueden ser resueltos.
- 3.- La recuperación de tocoferoles añadidos a los aceites fue alta, aproximadamente del 100%.

En suma, estos procedimientos NP-HPLC fueron “fáciles y rápidos”, con una amplia aplicabilidad para ensayos rutinarios de vitaminas liposolubles en alimentos (Truedsson, 1981; Andrikopoulos, 1991; Balz, 1993; Kramer, 1997).

La detección de las vitaminas liposolubles después de pasar por el HPLC, puede estar acompañada por diferentes tipos de detectores, UV (simple o usando un DAD), fluorescencia (FLD), electroquímico (ED), y evaporativo de dispersión de luz (ELSD) (Speek, 1985; Warner, 1990; Chase, 1994; Podda, 1996; Wang, 2001). El detector más comúnmente usado para el análisis de vitaminas A y E es el FLD, el cual es más sensible y selectivo que el UV, pero menos sensible que el ED. La NP-HPLC ha sido usada para determinar tocoferoles (α , β , γ y δ) (Thompson, 1979; Syvaaja, 1985; Tuan, 1989; Kamal-Eldin, 2000) y retinol en fórmulas infantiles (Chase, 1998a; Chase, 1998b). Todos estos procedimientos utilizan el detector FLD ya que provee un modo de detección sensible y específico. Pero para la determinación simultánea de las vitaminas A y E, se necesitan realizar dos diferentes inyecciones en dos fases móviles distintas, ya que los FLD convencionales sólo pueden trabajar con una onda de excitación (λ_{ex}) y una onda de emisión (λ_{em}). Esto significa, que por ejemplo para la determinación de vitamina E será necesario ajustar la configuración del FLD a $\lambda_{ex} = 285$ nm, y $\lambda_{em} = 310$ nm y posteriormente para la determinación de vitamina A se deberá re-ajustar a $\lambda_{ex} = 325$ nm, y $\lambda_{em} = 470$ nm cambiando la fase móvil. Por otro lado, el detector DAD puede trabajar con múltiples longitudes de onda UV, lo que se traduce en una mayor versatilidad, el problema radica en que es menos sensible en la detección de compuestos en comparación con el detector FLD.

La reciente introducción al mercado de las columnas cortas de resolución rápida, por ejemplo de 50 mm x 2.1 mm, 3 μ m de tamaño de partícula en lugar de las columnas tradicionales (250 mm / 125 mm x 4.6 mm, 5 μ m de tamaño de partícula) ofrece diversas ventajas, siendo las más importantes el uso de una menor cantidad de solventes como fase móvil y un incremento en la sensibilidad (Landen, 1985). Este incremento en la sensibilidad hace posible utilizar un detector DAD para analizar simultáneamente vitaminas A y E en preparados para lactantes con una sola inyección de una muestra previamente preparada.

Dependiendo del tipo de matriz del alimento procesado, la extracción de las vitaminas liposolubles se puede realizar mediante una extracción directa con solventes o saponificando la muestra. Muchos tipos de aceites que contienen altos niveles de vitamina E son diluidos con hexano o fase móvil y son así directamente inyectados en el sistema cromatográfico en columnas de fase normal. La sencillez de esto permite trabajar adecuadamente, a menos que alguno de los componentes presente una baja

solubilidad en la fase móvil, o que exista(n) algún(os) compuesto(s) interferente(s), como en muchas ocasiones sucede en los preparados para lactantes. En estos casos, un procedimiento mayor de limpieza y preparación de la muestra es requerido. Como se ha mencionado antes, la preparación de la fracción en la que se encuentran las vitaminas liposolubles en la mayoría de las matrices de los alimentos procesados, requiere, o saponificación de la muestra, o concentración de la fracción lipídica, o la extracción total de la grasa de la muestra, la que después puede ser inyectada directamente en columnas de fase normal. La saponificación convierte el acetato de α -tocoferol en α -tocoferol, por lo que no se puede diferenciar el acetato de α -tocoferol añadido del α -tocoferol presente de forma natural (Chase, 1997). Además, la saponificación involucra realizar una serie de pasos que se traducen en un incremento en el tiempo total de análisis. A pesar de que existen métodos simplificados que utilizan saponificación, es conocido que un método que no la requiera debe ser preferible, además de que ofrece una mayor fiabilidad (Rodrigo, 2002). También la eliminación del proceso de saponificación permite cuantificar la forma en la que se añaden los esteres de las vitaminas A y E de las que se encuentran en el alimento de forma natural. El uso de NP-HPLC hace innecesario remover la grasa de los preparados para lactantes una vez extraída, ya que se sabe que el uso, por ejemplo, de una columna (NP) de sílica permite la inyección directa de hasta 2 mg de grasa por inyección, sin ninguna interferencia en la resolución, detección y vida de la columna (Thompson, 1979). Finalmente, la estabilidad de las vitaminas liposolubles es mejor dentro de la matriz lipídica y con las formas éster de las vitaminas A y E.

5.8 Evaluación Sensorial

El análisis sensorial o evaluación sensorial es el análisis de los alimentos u otros materiales a través de los sentidos. La palabra sensorial se deriva del latín *sensus*, que quiere decir sentido. La evaluación sensorial es una técnica de medición y análisis tan importante como los métodos químicos, físicos, microbiológicos, etc. Es una disciplina científica usada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de los alimentos que se perciben por los sentidos de la vista, el oído, el olfato, el gusto y el tacto. El análisis sensorial es un auxiliar de suma importancia para el control y mejora de la calidad de los alimentos ya que a diferencia del análisis físico-

químico o microbiológico; que sólo dan una información parcial acerca de alguna de sus propiedades, permite hacerse una idea global del producto de forma rápida, informando de un aspecto de importancia capital: su grado de aceptación o rechazo. La evaluación sensorial cada día cobra más importancia en diversos aspectos en la industria alimentaria, dado las exigencias del mercado competitivo actual y su repercusión en el desarrollo de cualquier empresa o entidad productora en:

- Control de calidad de materias primas
- Control de calidad de productos finales
- Desarrollo y lanzamiento de nuevos productos
- Pruebas de mercado para nuevos productos
- Preferencias del consumidor
- Investigación de factores que influyen en el olor, aroma, sabor... de alimentos, etc.

Básicamente existen cuatro tipos de jueces: experto, entrenado, semientrenado y consumidor.

Experto. Es una persona que tiene gran experiencia en probar un determinado tipo de alimento, posee una gran sensibilidad para percibir las diferencias entre muestras y para distinguir y evaluar las características del alimento.

Entrenado. Es una persona que posee bastante habilidad para la detección de alguna propiedad sensorial, o algún sabor o textura en particular, que ha recibido cierta enseñanza teórica y práctica acerca de la evaluación sensorial y que sabe exactamente lo que se desea medir en una prueba.

Semientrenado. Personas que han recibido un entrenamiento teórico similar al de los jueces entrenados, que realizan pruebas sensoriales con frecuencia y posee suficiente habilidad, pero que generalmente participan en pruebas discriminativas sencillas, las cuales no requieren de una definición muy precisa de términos y/o escalas.

Consumidor. Se trata de una persona que no tiene nada que ver con las pruebas, ni trabajan con alimentos como los investigadores o empleados de fábricas procesadoras de alimentos, ni han efectuado evaluaciones sensoriales periódicas.

Hay 2 principales tipos de pruebas: Las afectivas y las discriminativas. El objetivo que se busca es conformar un panel de análisis sensorial.

Pruebas Afectivas: Son aquellas en las cuales el juez expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o le disgusta, si lo acepta o lo rechaza, o si lo prefiere a otro. Por lo general se realizan con paneles inexpertos o con solamente consumidores. Entre las pruebas afectivas se encuentran las de preferencia, medición del grado de satisfacción y las de aceptación.

Pruebas discriminativas: No se requiere conocer la sensación subjetiva que produce un alimento, se busca establecer si hay diferencia o no entre dos o más muestras, y en algunos casos, la magnitud o importancia de esa diferencia. Las pruebas discriminativas más usadas son las pruebas de comparación por parejas simple, triangular, dúo-trío, comparaciones múltiples y de ordenamiento.

5.8.1 Prueba Dúo-Trío

Esta prueba es simple y fácil de entender. Comparada con la prueba de comparación por parejas, tiene la ventaja de que una muestra de referencia es presentada, lo que evita confusión, respecto a lo que constituye una diferencia, pero tiene la desventaja de que tres muestras deben ser probadas, en lugar de dos. Esta prueba se utiliza cuando el objetivo es determinar si existe alguna diferencia sensorial entre dos muestras, siendo muy útil para:

- Determinar si existen diferencias en un producto como consecuencia de un cambio de ingredientes, proceso, empaque, almacenamiento, etc.
- Determinar si existe alguna diferencia global, sin que se puedan especificar los atributos que constituyen la diferencia

La prueba dúo-trío tiene una aplicación general cuando hay más de 15, y preferiblemente más de 30 pruebas realizadas, pues a mayor número, mayor fiabilidad en la discriminación. Tomando en cuenta de que con menos de 30 pruebas, el error β es alto. Existen dos formas de realizar la prueba, con una referencia constante, en la cual, la muestra de referencia es siempre la misma, o con una referencia balanceada, en la cual la muestra de referencia se cambia aleatoriamente en las pruebas. El principio de la prueba consiste en presentar a los jueces tres muestras, una de ellas identificada como la muestra de referencia, y las otras dos identificadas con números aleatorios, siendo una

de ellas igual a la referencia. Se le pregunta al juez que indique cual de las muestras codificadas corresponde a la referencia

5.8.2 Prueba de comparación por parejas

Esta prueba mide específicamente diferentes atributos como por ejemplo el dulzor, etc., comparando una muestra con otra. Se debe hacer notar que la carencia de diferencia de un atributo o característica en específico, no implica que no existan o se detecten diferencias en otros atributos. Este tipo de prueba es muy simple técnica y estadísticamente hablando, la principal dificultad radica en determinar si la prueba es de una o dos “colas” (one-sided, two-sided), es decir unilateral o bilateral. Se utiliza esta prueba cuando el objetivo es determinar de que manera una atributo sensorial difiere entre dos muestras (ejemplo: más dulce o menos dulce). Esta prueba es una de las más simples y más utilizadas en los análisis sensoriales, que se usan primero para determinar después otro tipo de análisis que pueden ser mucho más complicados (sean otros análisis sensoriales o fisicoquímicos). El principio de la prueba consiste en presentar al juez o panelista dos muestras codificadas y presentadas aleatoriamente, y se le indique que las pruebe e indique la muestra con la característica solicitada (mejor sabor, mejor olor, sabor más duradero, etc.). Debido a la simplicidad de la prueba, ésta puede ser realizada con individuos que reciban un poco de entrenamiento respecto a la característica o características que se pretenden evaluar, lo que dará mayor potencia a las pruebas. Debido a que la probabilidad de escoger es del 50%, se requiere un importante número de pruebas para detectar diferencias significativas, por ejemplo de 15 pruebas, al menos 13 deben estar de acuerdo para tener un nivel de significancia de $\alpha = 0.01$, mientras que para 50 pruebas, para la misma significancia se requiere que coincidan 35 veredictos (Meilgaard, 1987).

La evaluación de las propiedades organolépticas es una herramienta muy útil para evaluar la calidad en un alimento (Baker, 1983; Valero, 2000). Una evaluación sensorial es útil para conocer la estabilidad de un producto y para determinar diferencias en características sensoriales durante el almacenamiento (Valero, 2001). La acumulación de sustancias de descomposición de las reacciones de oxidación, produce olores, coloraciones y sabores característicos de la rancidez, que suelen ser desagradables, dependiendo de la concentración, grado de oxidación y sensibilidad de quien realiza la

evaluación (inclusive catadores experimentados). Es por ello que en general, la evaluación sensorial por si sola es poco precisa y debe de ir acompañada por métodos químicos.

5.9 pH

Los valores de pH en las preparadas para lactantes deben ser monitoreados durante su vida útil, ya que pequeñas variaciones en éste podrían favorecer o la isomerización de los azúcares (transformación de Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein) o la formación de compuestos de Amadori (Pellegrino, 1995).