

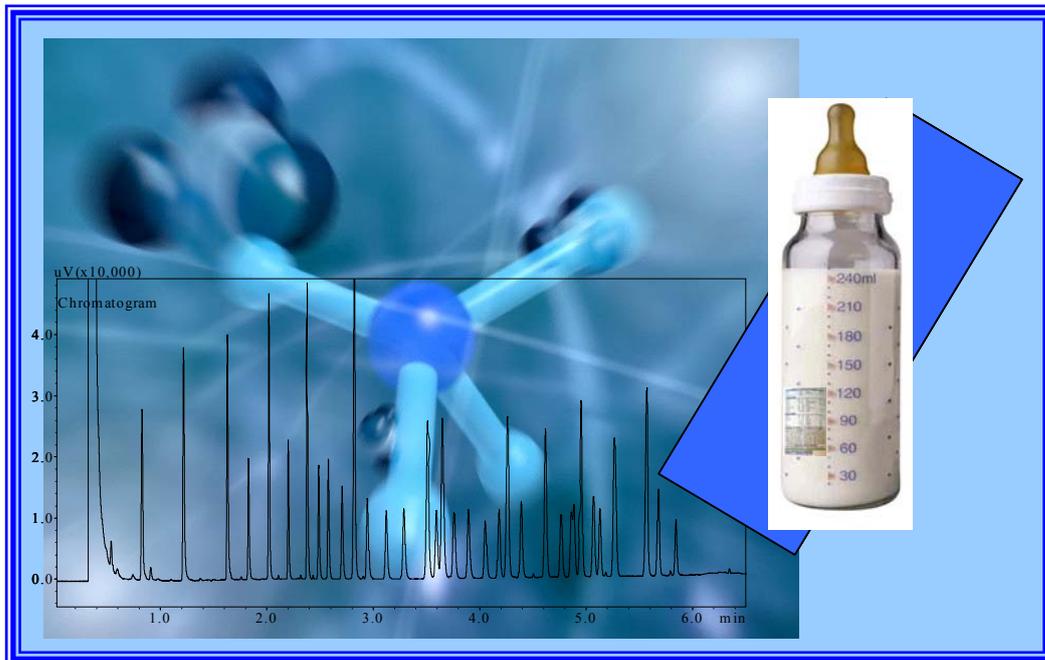
UNIVERSITAT DE BARCELONA

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



V. DISCUSIÓN GENERAL

V. DISCUSIÓN GENERAL

ETAPA 1: METODOLOGÍA ANALÍTICA

Análisis de mono- y disacáridos en fórmulas de base láctea por cromatografía líquida de alta eficacia con detección de índice de refracción.

El HPLC-RI se utilizó para evaluar contenidos de fructosa, glucosa, galactosa, sacarosa, lactulosa y lactosa. Para este tipo de análisis se han sugerido como fases móviles apropiadas acetonitrilo-agua en el rango de 75:25 a 85:15. Se experimentó con 75:25, 80:20, 80:15 y 90:10, encontrándose que con 75:25 (v/v) los azúcares eluían más rápidamente y que ésta fase móvil permitió una mejor simetría, separación y resolución de los picos cromatográficos. El etanol es utilizado para la extracción de los azúcares en diversas metodologías. En este trabajo se utilizó una mezcla de etanol-agua (50:50, v/v). El etanol extrae altas cantidades de otros compuestos, por lo que fue necesario utilizar algún agente que precipitara los compuestos interferentes como las proteínas con soluciones de Carrez. A pesar de ello se observaron algunas interferencias en el sistema HPLC, por lo que además, se añadieron 5 ml de acetonitrilo, a fin de completar la precipitación de todas las sustancias interferentes con la fase móvil antes de la inyección en el sistema. La validación de los parámetros de linealidad, sensibilidad, precisión y recuperación, mostraron que es un método simple y reproducible. Los resultados del análisis del contenido de azúcares en la fórmula experimental para mujeres embarazadas fueron un 13% de fructosa, 9% de sacarosa, 0.9% de lactulosa y 16% de lactosa. El establecimiento de parámetros térmicos, definidos sobre condiciones de tiempo/temperatura, contribuyen a la clasificación de las leches tratadas por el calor. Estos parámetros son utilizados para identificar y optimizar procesos y evaluar el grado de daño térmico. La lactulosa es propuesta como un indicador capaz de diferenciar entre una leche pasteurizada, UHT y una esterilizada clásica. En el caso de la fórmula para mujeres embarazadas se observó la lactulosa dentro del rango de 600 y 1400 mg/l que corresponderían a una leche esterilizada clásica. En el caso del preparado para lactante

utilizado también para la validación del método, no se encontró este compuesto y sólo se encontró lactosa (57.21%).

Análisis simultáneo de vitaminas A y E en preparados para lactantes de base láctea por cromatografía líquida de alta eficacia en fase normal con detector de fotodiodos (NP-HPLC-DAD) utilizando una columna corta de resolución rápida.

Con el objetivo de optimizar la fase móvil, se probaron las fases móviles más utilizadas de acuerdo con la bibliografía que contenían entre el 2 y el 4% de isopropanol en hexano, usando una mezcla de estándares (acetato de retinol, palmitato de retinol, α -, γ - y δ -tocoferol y acetato de α -tocoferol). Debido a que la separación de los compuestos no fue posible se utilizó una menor cantidad de isopropanol, 1.0 y 0.5%, sin obtener resultados satisfactorios. Otros autores optimizaron solventes para diferentes columnas en fase normal y utilizaron fases móviles que consistían de un 99% de hexano y un 1% de una variedad de modificadores de la polaridad como lo son el isopropanol, el n-butanol, el tetrahidrofurano, el diclorometano y el acetato de etilo (Tan, 1989; Chase, 1998a; Rodrigo, 2002).

Otros autores (Abidi, 1996) estudiaron la resolución de los tocoferoles en columnas de sílica demostrando que la habilidad de las fases móviles que contenían un modificador polar muy débil, como un éster (acetato de etilo) o un éter (metilterbutiléter), para resolver isómeros posicionales fueron significativamente mejor que todas las fases móviles que contenían modificadores más polares. Por lo tanto, se probaron fases móviles que contenían entre 2.1 y 0.5% de acetato de etilo en hexano. Con esta última se encontró la mejor resolución y la mejor separación efectiva de los picos cromatográficos, tanto en estándares como en extractos de muestras. El análisis cromatográfico permitió una correcta resolución de todos los analitos estudiados en menos de 20 minutos. Con la cromatografía en fase normal los homólogos de las vitaminas A y E eluyeron en orden de polaridad creciente, a razón: palmitato de retinol, 1.7 min.; acetato de retinol, 4.0 min.; acetato de α -tocoferol, 5.0 min.; α -tocoferol, 5.6 min.; γ -tocoferol, 12.0 min. y δ -tocoferol, 18,3 min.

Cuando se utiliza una columna de sílica de fase normal como es el caso de este estudio, la mayoría de las vitaminas liposolubles pueden ser obtenidas con un procedimiento de extracción directa, sin saponificación y sin necesidad de evaporar y redissolver la muestra en la fase móvil. Estos procedimientos normalmente tienen la siguiente secuencia: la adición de un solvente para desnaturalizar o precipitar las proteínas como el etanol, el metanol o el isopropanol; la adición de agua o tampón para mejorar la eficiencia de la extracción del solvente; la adición de una fase orgánica para extraer las vitaminas liposolubles; la centrifugación y finalmente la evaporación del solvente o concentración del analito si es necesario.

Se desarrollaron y probaron diversos procedimientos para la extracción de las vitaminas A y E que se basaron en los métodos más simples que se han reportado en la literatura. En un trabajo (Rodas Mendoza, 2003) se desarrolló un método rápido para determinar estas vitaminas basado en la extracción con etanol y una re-extracción con hexano similar a los procedimientos reportados por otros autores (Huo, 1996). En otro estudio (Rodrigo, 2002) se desarrolló un método simple para la extracción de tocoferoles usando una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) basado en el método Folch (Folch, 1957). Los métodos evaluados muestran resultados similares en la detección de los compuestos, no obstante el método propuesto presentó mayores ventajas en términos de simplicidad y recuperación.

Los parámetros evaluados de linealidad, sensibilidad, precisión y recuperación mostraron que el método es adecuado y puede ser utilizado para llevar a cabo análisis rutinarios. El método propuesto permite la determinación simultánea de todos los analitos antes mencionados en una sola inyección utilizando una columna corta de resolución rápida.

Análisis de los furfurales potenciales y libres por cromatografía líquida de alta eficacia con detector de fotodiodos en fórmulas de base láctea.

Para la validación de este método se utilizó una columna Spherisorb ODS-2 C₁₈ de 250 mm x 4.6 mm y de 5 µm de tamaño de partícula, que se ha empleado en otros estudios (Albalá-Hurtado, 1997b; Ferrer, 2000). Se probaron una mezcla de estándares de

compuestos furural (HMF, F, MC, MF) en el sistema cromatográfico. El tiempo necesario para una sola inyección fue aproximadamente de 30 minutos a temperatura ambiente. Para evaluar la relación entre la temperatura de la columna y el tiempo de elución de los picos cromatográficos, con el objeto de reducir el tiempo de análisis, se probaron las siguientes: 25, 30, 35, 50, 60, 70, 80 y 85°C. Además se quería también evaluar si la temperatura afectaba a la cantidad de furfurales detectados. Se encontró una relación lineal $r^2 \geq 0.99$ entre la temperatura de análisis y el tiempo de detección. Además la cantidad de furfurales detectados no tuvo variaciones en las temperaturas analizadas (RSDs 0.81). No obstante cuando se preparó la extracción de compuestos furfural provenientes de las fórmulas para mujeres embarazadas y de los preparados para lactantes, las temperaturas de la columna mayores a 35°C no permitieron una cuantificación fiable de HMF, porque este compuesto eluyó junto con una matriz de sustancias interferentes. Finalmente se utilizó una columna ODS2 C₁₈ (4.6 mm x 150 mm) y se repitieron las pruebas y la temperatura óptima que permitió un análisis cromatográfico adecuado fue de 30°C. Por otro lado se observó una cantidad mínima de residuo cercana al tiempo de elución del HMF, que podría interferir en la cuantificación rutinaria. Por ello evaluaron diversas fases móviles usando variaciones de agua-acetonitrilo (90:10, 93:7, 95.5:4.5 y 96:4), observándose que la proporción 95.5; 4.5 dio los mejores resultados. El tiempo requerido para cada análisis en el HPLC fue de 15 minutos. La validación de los parámetros de linealidad, sensibilidad, precisión y recuperación, mostró que es un método simple y reproducible para utilizarse rutinariamente.

ETAPA 2: ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Estudio de la evolución del contenido de monosacáridos, disacáridos y evaluación sensorial en preparados para lactantes y fórmulas para mujeres embarazadas.

La evolución del pH fue evaluada durante el almacenamiento debido a que éste puede favorecer la isomerización de los azúcares (transformación de Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein) o la formación de compuestos de Amadori (Pellegrino, 1995). En las fórmulas evaluadas no se detectaron cambios en el pH durante los 12 meses de almacenamiento ni a 25 ni a 37°C. Los valores de pH en las fórmulas control y en las fórmulas suplementadas con aceite de pescado microencapsulado fueron en promedio 7.02 y 6.93 respectivamente. Estos valores son comunes en este tipo de producto (Ferrer, 2002; McSweeney, 2004). Los valores de pH en las fórmulas para mujeres embarazadas se comportaron igual que en los preparados para lactantes sin encontrarse variación a través del tiempo, con valores promedio de 7.02 y 7.12.

No se detectó lactulosa en ninguno de los preparados para lactante estudiados. Esto es debido a las ligeras condiciones de temperatura utilizadas en el proceso de secado (De Block, 2003). Además, no se formó lactulosa durante el almacenamiento ni a 25, 37 ó 47°C, lo que indica que la formación de este compuesto ocurre sólo a elevadas temperaturas durante el tratamiento por calor y no durante el almacenamiento. No obstante en las fórmulas para mujeres embarazadas un contenido inicial de lactulosa de 0.9 g/100g fue detectado, concentración que permanece constante durante los primeros cinco meses de almacenamiento. Después de este tiempo la cantidad decreció a 0.39 g/100g pasados 7 meses, y a los 9 meses de almacenamiento a 25°C este compuesto no fue detectado.

Ni glucosa ni galactosa fueron detectadas en las fórmulas después de su producción o almacenamiento, lo que es consistente con informes de otros autores (Ferreira, 1998).

En los preparados para lactantes la lactosa fue el único azúcar presente, no obstante en las fórmulas suplementadas con el microencapsulado se encontraron trazas de sacarosa por debajo del límite de cuantificación (<0.20 mg/ml). La disminución de los contenidos de lactosa durante el primer periodo de almacenamiento en las fórmulas estudiadas se atribuye a la unión de ésta con el grupo ϵ -amino de la lisina (Olano, 1989; De Block, 2003). En las fórmulas para mujeres embarazadas almacenadas a 25°C la disminución de lactosa fue de 25.1 a 18.81 g/100g después de cinco meses de almacenamiento. Después de este tiempo no se observaron más disminuciones. La concentración de lactosa en los preparados para lactantes, tanto suplementados como sin suplementar, permanecieron constantes a 25°C y 37°C, no obstante a 47°C la concentración de este compuesto disminuyó 4.6% a los 18 días, 6% a los 28 días y 7% de los 63 a los 120 días, respecto al contenido inicial. No se observaron diferencias en la evolución de lactosa en las fórmulas control y en las fórmulas suplementadas con MFO, lo que indica que la adición del aceite de pescado microencapsulado no afectó la evolución de este disacárido durante el almacenamiento. La sacarosa forma parte de la recubierta del MFO. Para observar la evolución de la sacarosa en esta materia prima, el MFO se almacenó a 47°C sin que se observaran cambios en la concentración de este azúcar en dos lotes distintos después de 120 días de almacenamiento.

Se observaron cambios mínimos en la percepción de la calidad sensorial de las fórmulas suplementadas con MFO, lo que se correlaciona con la poca variación en la evolución de los azúcares estudiados durante el almacenamiento.

Estudio de la evolución de los furfurales potenciales y libres en preparados para lactantes de base láctea.

En medio ácido, puede ocurrir la deshidratación de hidratos de carbono produciendo la formación de HMF. Además la reacción de Maillard también puede producirse incrementando los compuestos de Amadori durante las primeras etapas y posteriormente el HMF como una consecuencia de futuras reacciones (Rada-Mendoza, 2004). Por otra parte en medio básico también puede causar la formación de compuestos de Amadori, con la consecuente formación de furfurales. Las fórmulas comparadas tenían la misma composición base con la única diferencia en que una tenía la inclusión

de aceite de pescado microencapsulado como fuente de LC-PUFA. Cuando se compararon los resultados de furfurales en los dos tipos de fórmulas no se observó ninguna diferencia, lo que indica que esta materia prima no tuvo ningún efecto negativo que incrementara la aparición de estos marcadores de deterioro. En cuanto a los resultados obtenidos en las fórmulas estudiadas son comparables a los estudios reportados en la literatura (Albalá-Hurtado, 1997b; Albalá-Hurtado, 1998; Ferrer, 2000; Ferrer, 2002; Ferrer, 2005).

En las fórmulas almacenadas a 37°C se observaron en general mayores incrementos de los furfurales a lo largo del almacenamiento principalmente del HMF potencial. Lo anterior indica que almacenamientos inadecuados como es el caso de 37°C, la reacción de Maillard se favorece en este tipo de productos. Asimismo de todos los furfurales estudiados, el que mejor refleja la evolución del deterioro es el HFM potencial ya que sólo se observaron incrementos durante el almacenamiento, mientras que en los otros compuestos se observaron comportamientos irregulares, y esto se puede explicar debido a que estos compuestos se encuentran en un estado de equilibrio entre la destrucción por oxidación y la formación de sus precursores (Morales, 1997)

Estudio de la evolución de los contenidos de lisina disponible y lactosa en preparados para lactantes en polvo suplementados con aceite de pescado microencapsulado (MFO).

En cuanto a la evolución de la lisina disponible se observó que este aminoácido es estable durante el almacenamiento a 25 y 37°C ya que no se observaron disminuciones significativas durante el almacenamiento. No obstante, se ha visto que el contenido de lisina disponible es mayor en las materias primas que en el producto final, lo que indica que un bloqueo importante de la lisina se produce durante los procesos de calor en su fabricación. Debido a que sólo se observó una reducción significativa después de 9 y 12 meses de almacenamiento a 37°C y también a que no se observó un claro efecto del tiempo y la temperatura se utilizó una fórmula control almacenada a 47°C. Se observó en ésta una pérdida importante de este aminoácido de 77.08% después de 122 días y de 89.13% después de 148 días. Esto confirma el efecto de la temperatura en el bloqueo de la lisina.

En cuanto a las formulaciones estudiadas no se observó ninguna diferencia en el comportamiento de lisina disponible y lactosa en las fórmulas suplementadas con MFO y en las fórmulas control, lo que indica que esta materia prima no tuvo influencia en los parámetros estudiados.

Aunque se observó una buena estabilidad del producto durante su vida útil, el aceite de pescado como fuente principal de DHA ha originado controversia. A pesar de que el aceite de pescado tiene una gran cantidad de DHA como ácido graso poliinsaturado, y por tanto es una buena fuente de DHA, también se encuentran cantidades significativas de EPA, el cual no es indicado para incluirse en los alimentos infantiles, ya que limita la ingesta y aprovechamiento del AA en los niños, sobretodo si no se suplementa con este ácido graso (Lapillonne, 2000). También, han habido y siguen habiendo diversas dudas acerca del uso del aceite de pescado como suplemento, debido a la presencia de contaminantes ambientales, como por ejemplo dioxinas, PCBs y metales pesados, incluyendo compuestos de mercurio, los cuales pueden ser ingeridos por los peces y ser concentrados en hígado y otros órganos.

Estabilidad de los preparados para lactantes comerciales una vez abierto el envase.

En cuanto a la evolución del contenido de las vitaminas A y E se confirma que las fórmulas están comúnmente fortificadas con vitamina A en forma de acetato de retinol y palmitato de retinol debido a que estas son más estables y menos susceptibles a la oxidación en comparación que sus respectivos isómeros provenientes de los aceites vegetales utilizados en la fabricación. Disminuciones de la vitamina A una vez abierto el envase fueron observadas. En todas las fórmulas se encontraron niveles de vitaminas A y E mayores a las que especifica el etiquetado. Así mismo se observó que el contenido de vitamina A es de 1.4 y 3 veces mayor que el nivel mínimo recomendado por la legislación europea, mientras que el de la vitamina E fue de 2.6 y 10.8 veces mayor. No obstante, debido a la disminución observada la sobre-fortificación está justificada. Sin embargo se requieren de más estudios para confirmar si la sobre-fortificación en diferentes fórmulas lácteas es realmente necesaria y a qué niveles.

En cuanto al contenido de los compuestos volátiles se observó que una vez abiertas las fórmulas estos comienzan a incrementar siendo el que aumenta en mayor cantidad el hexanal. El incremento observado en los compuestos volátiles estudiados es consistente con lo reportado en otros estudios (Ulberth, 1995; Kim, 1996; Cadwallader, 1997; Cladman, 1998; Karatapanis, 2006). El pentanal y el hexanal son compuestos volátiles específicos de la oxidación de los PUFA n-6. Se encontró una correlación entre el contenido de hexanal y la disminución del ácido linoleico. Los estudios en las concentraciones de hexanal en leches y productos derivados varían considerablemente dependiendo de diversos factores, entre otros en la técnica analítica usada, las materias primas, los procesos de fabricación, la composición de la fórmula, los materiales de envase, así como las condiciones de tiempo y temperatura (Bassette, 1983), por lo tanto el uso de la misma técnica analítica en el análisis de diversas fórmulas comerciales es un buen inicio para futuras comparaciones. El índice de peróxidos ha sido correlacionado ($r^2=0.931$) con el contenido de hexanal (Ulberth, 1995). No obstante, en nuestros estudios se observaron bajas correlaciones ($r^2=0.667$). Esto puede ser debido al hecho de que ellos utilizaron un sistema de destilación por vapor. En esta técnica no sólo el contenido de aldehídos libres es determinado, sino también los que provienen del tratamiento térmico que utiliza esta metodología que induce la formación de compuestos volátiles, provenientes de los peróxidos.

En cuanto a los ácidos grasos determinados durante 70 días después de abierto el envase se observó que son estables. Contrario a lo que se esperaba, solamente el ácido linoleico y el α -linolénico presentaron reducciones mínimas, aunque estadísticamente significativas. Los contenidos de ácido graso araquidónico y docosahexaenóico en las fórmulas que los contienen no mostraron variaciones después de abiertos los envases.

Estabilidad de preparados para lactantes suplementados con fosfolípidos de huevo (EPL) y aceites sintetizados por microorganismos unicelulares (SCO) en forma de triacilglicéridos.

En cuanto a los contenidos de la vitamina A se observaron disminuciones en ambas fórmulas tanto del acetato como del palmitato de retinol a lo largo del almacenamiento. Como era de esperar, las fórmulas almacenadas a 40°C sufrieron una pérdida mayor.

Después de 18 meses de almacenamiento a 25°C se observaron pérdidas de 18 y 21% respectivamente, mientras que en las mismas condiciones almacenadas a 40°C las pérdidas fueron del 27.5 y 29%.

En cuanto a los contenidos de la vitamina E también se observaron disminuciones en ambas fórmulas a lo largo del almacenamiento. Después de 18 meses a 25°C se observaron pérdidas de 17.9 y 12.8% respectivamente, mientras que en las mismas condiciones almacenadas a 40°C las pérdidas fueron del 23.1 y 28.1%.

Por otro lado los contenidos de la vitamina C expresados como ácido ascórbico sufrieron mayores pérdidas en comparación con las otras vitaminas estudiadas a lo largo del almacenamiento. Después de 18 meses a 25°C se observaron pérdidas de 20.38 y 34.82% respectivamente, mientras que en las mismas condiciones almacenadas a 40°C las pérdidas fueron del 28.41 y 48.65%.

De los análisis del contenido de vitaminas, se puede observar que la fórmula suplementada con MFO sufrió mayores pérdidas de vitaminas. No obstante, cabe hacer mención que las formulaciones base son diferentes. Para observar la estabilidad oxidativa se determinaron también compuestos volátiles, ácidos grasos e hidroperóxidos. El índice de peróxidos al inicio del estudio nos mostró que la fórmula suplementada SCO tenía un valor de peróxidos de 1.26 en comparación con la fórmula suplementada con EPL con un valor de 0.34. Lo que indica que en la primera ya existía cierto grado de oxidación. Estos datos fueron corroborados por la evaluación sensorial en la que se observó que se detectaron diferencias sensoriales en los primeros seis meses, mientras que en la fórmula EPL hasta los 18 meses de almacenamiento. A pesar de esto la evolución de los parámetros estudiados en ambas fórmulas fue similar.