

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

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO:

“Medicamentos, Alimentación y Salud”
Bienni 2001-2003

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

**Memoria presentada por Jorge Luis Chávez-Servín para optar al grado de Doctor
por la Universitat de Barcelona**

Directoras de Tesis:

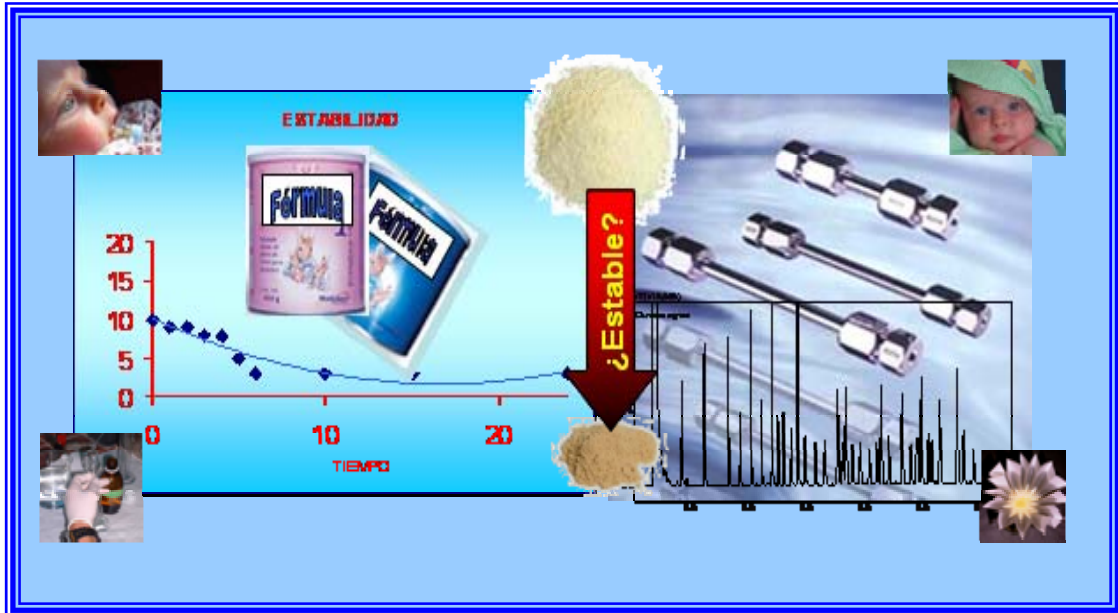
Dra. M. Carmen López Sabater

Dra. Ana I. Castellote Bargalló

Doctorando:

Jorge Luis Chávez-Servín

Jorge Luis Chávez-Servín, 2007



A mis padres, a mis hermanos y a mi Kary

Abreviaciones

AA	Ácido araquidónico (C20:4, n-6)
ALA	Ácido alfa-linolénico (C18:3, n-3)
DAD	Detector de fotodiodos
DHA	Ácido docosahexaenóico (C22:6, n-3)
DPA	Ácido docosapentaenóico (C22:5 n-3)
ED	Detector electroquímico
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de luz
EPA	Ácido eicosapentaenóico (C20:5, n-3)
EPL	Fosfolípidos de huevo
ERG	Electroretinograma
F	2-furaldehído
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDNB	1-fluoro-2,4-dinitrobenceno
FLD	Detector de fluorescencia
FMC	furil metil cetona
FPW	Fórmula para mujer embarazada
HMF	5-hidroximetil-2-furaldehído
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IU	Unidades internacionales
LA	Ácido linoléico (C18:2, n-6)
LC-PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
MDA	Malondialdehído
MF	5-metil-2-furaldehído
MFO	Aceite de pescado microencapsulado
MR	Reacción de Maillard
NP	Fase normal
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
PV	Índice de peróxidos
RE	Equivalentes de retinol
RI	Índice de refracción
RP	Fase reversa

SCO	Aceites sintetizados por microorganismos unicelulares
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Equivalentes de tocoferol
OMS	Organización Mundial de la Salud

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, por su apoyo durante estos casi 6 años en la realización de éste proyecto. Por toda la empatía, la solidaridad,....., ya que a distancia, fueron seguidos, vividos y compartidos todos los retos, los obstáculos, los fracasos, los momentos de alegría y los momentos de tristeza y desesperación, y finalmente los triunfos cosechados durante todo este tiempo de trabajo. A todo el resto de mis familiares en México por interesarse en la evolución de mis estudios.

A todas aquellas personas en México relacionadas con el mundo de la nutrición y la ciencia de los alimentos que me incentivaron y motivaron a realizar este gran proyecto denominado “DOCTORADO”: Dra. Elba Durán, Dr. Héctor Bourges, Dra. Esther Casanueva, Dra. Ana Bertha Pérez, Dra. Ivone Castro, etc.

A la Dra. Carmen López por su acogedora recepción en su grupo de investigación que se convertiría después en el lugar donde más horas pasaría los siguientes años. Asimismo por todo el apoyo, la libertad y la confianza depositada en mí, que me permitieron desarrollarme y crecer como investigador.

A la Dra. Ana Isabel Castellote por iniciarme en el mundo de la cromatografía, por toda su paciencia y por compartir todos los dolores de cabeza que en ocasiones originaban los equipos.

A mis asesoras de tesis Carmen y Ana, por su trato amable y excelente y por compartir momentos muy gratos dentro y fuera del laboratorio.

A todos los compañeros y amigos que he tenido en el grupo de Grasas II: “mi Karinita”, Eva, Aleix, Xell, Isa, Susana, Carol y Mar; unos ya doctores y otros en camino, por compartir no sólo trabajo, sino momentos “culturales y de entretenimiento”. Eva gracias por tu paciencia durante la primera parte del doctorado y todos los buenos momentos de “después”, lástima que marchaste tan “pronto para nosotros”. Aleix, gracias por tu valiosa amistad y sabios consejos, te extrañé mucho cuando tuviste que irte. Xellita, gracias por compartir maravillosas horas de trabajo juntos, sobretodo en la primera parte

del doctorado, y por todas las buenas experiencias, tanto en el trabajo, como fuera de él, me llevo valiosos momentos. Susani, de verdad que la pasé genial cuando llegaste y trataste de poner un poco de orden, además de hacerme olvidar de muchas presiones que fueron sucediendo, tu atención para escuchar y sabios consejos me ayudaron mucho, lástima que te fueras “tan pronto”, pero así es esto de la movilidad. Carol, gracias por tu amistad que aunque nos conocimos cuando estaba ya casi terminando la última fase experimental de la tesis ha sido muy valiosa, ánimo!! con la recolección de muestras y adelante. Mar, gracias por compartir momentos dentro y fuera del laboratorio y espero que continúes investigando e investigando... A las personas de Master y trabajo práctico: Rosa, Marta, Olga, Ikram, Ana Patric, Susana, Elena, Jaume y Sonia. A los compañeros de causa de los demás grupos de investigación del departamento de Nutrición y Bromatología, en especial a Tommaso (y Martha) por los buenos momentos compartidos dentro y fuera de la sala de cromatografía. A todos ellos por compartir buenos y bellos momentos; no sólo en el ámbito laboral, sino fuera del departamento, que quedarán grabados en mi como un grato recuerdo de mi estancia en Barcelona.

A Montse y a Fernando (que está muy feliz ahora que ganó la liga el Madrid) que siempre me ayudaron en todo lo que pudieron. A Evelio por arreglar rápidamente los equipos que se descomponían y desde luego a Manel por toda su paciencia y por reparar los ordenadores de algunos equipos de cromatografía cuando ya nadie les daba solución. A la señora Elisa. Al conserje que al principio me abría la puerta de entrada en los fines de semana. A las lindas chicas de la copistería Toñy y Montse por su trato tan amable y su dinamismo.

A todos los amigos del entrenamiento de natación que me ha ayudado a relejarme y mantenerme concentrado, a mis entrenadores Lluís y Nuria (les prometo intentar seguir nadando), y a los compañeros de ésta hidroterapia, Marcelo, Amaya, Ana, Tony, David, Oriol, Bego, Marina, Manuel, Ferrán, Carmelo, etc.

A todo el grupo de excursionistas y agregados por iniciarnos en el senderismo y enseñarnos otras perspectivas de la naturaleza y bellos paisajes de Catalunya: Xavi, Rafa, Jesús, Ricard, Marcelo y Katia, Lluís y Charlotte (y ahora Emma), Sebas y Amaya (y ahora Leire), Rosa y Carmelo, Belén e Ignazi (y ahora Diego), Eva, María, Ramón, etc.

A los compañeros de entrenamiento de tenis, deporte nuevo para mi y que me ha ayudado bastante en la etapa final de la tesis al convertirse en una eficiente terapia contra el estrés. A mi entrenador y tocayo Jorge (te prometo que mejoraré mi revés).

A nuestros amigos mexicanos que se han convertido en “superamigos” (pero no los super héroes del comic), Pili, Gerardo y Gina, Andrés y Diana, Ángel y Alín (y ahora Aitana), con quienes compartimos inolvidables momentos en Barcelona y alrededores.

En especial a mi Karinita, por compartir su vida conmigo, y aventurarse a venir juntos a realizar el doctorado, dejando atrás casa, familia, amigos, trabajo, etc. Y por compartir nuestros sueños en uno sólo, comenzar y finalizar el doctorado!! Los momentos que hemos pasado en Barcelona superan por mucho nuestras expectativas y nos regresamos con mucho más de lo que esperábamos recibir, con experiencias positivas y además muchos amigos.

A todas aquellas personas que hicieron posible todos los trámites administrativos y burocráticos para tener todos los documentos en orden *una y otra vez* que como extranjero se requieren. A todas aquellas personas que hicieron posible el principio, la continuación y la finalización del doctorado. A todas las “víctimas de esta tesis”, incluidas las que participaron en las evaluaciones sensoriales. A TODOS GRACIAS.

Este trabajo ha sido financiado por:

- Laboratorios Ordesa (Fundación Bosch i Gimpera proyecto BG-4614 y BG-303267)
- Proyecto del Ministerio de Sanidad y Consumo (CIBER: CB06/02/0079)
- Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México 2003-2006 (36 meses) y extendida a 2007 (12 meses más).

ÍNDICE

I.- INTERÉS Y OBJETIVOS.....	1
II.- INTRODUCCIÓN.....	7
1.- Importancia de la alimentación en las primeras etapas de la vida.....	9
1.1.- Intrauterina.....	9
1.2.- Alimentación después de nacer.....	10
1.3.- Recomendaciones nutricionales.....	12
2.- Lactancia materna versus preparados para lactantes.....	15
2.1.-Composición de la leche materna.....	15
2.2.- Alimentación con preparados para lactante.....	17
2.3.- Papel de los lípidos en el crecimiento, el desarrollo y en la salud.....	20
2.3.1. Papel de los LC-PUFA en el desarrollo visual y cerebral.....	22
2.4.- Suplementación con LC-PUFA.....	30
2.5.- Reglamentación para los preparados para lactantes.....	37
3.- Principales reacciones de deterioro de los preparados para lactantes.....	39
3.1.- Hidratos de Carbono.....	39
3.1.1.- Reacciones de Pardeamiento.....	43
3.1.1.1.- Reacción de Maillard.....	44
3.2.- Proteínas.....	49
3.3.- Lípidos.....	50
3.3.1.- Rancidez hidrolítica.....	51
3.3.2.- Rancidez oxidativa.....	52
3.4.- Vitaminas.....	56
3.4.1.- Liposolubles.....	56
3.4.2.- Hidrosolubles.....	63
4.- Fabricación de preparados para lactantes de base láctea en polvo.....	67

5.- Principales parámetros y aspectos analíticos en la estabilidad de las fórmulas lácteas.....	69
5.1.- Monosacáridos y disacáridos.....	69
5.2.- Lisina disponible.....	71
5.3.- Furfurales.....	73
5.4.- Peróxidos.....	76
5.5.- Perfil de ácidos grasos.....	77
5.6.- Compuestos volátiles.....	78
5.7.- Vitaminas	81
5.7.1.- Vitaminas hidrosolubles.....	81
5.7.2.- Vitaminas liposolubles.....	82
5.8.- Evaluación Sensorial.....	84
5.8.1.- Prueba Dúo-Trío.....	86
5.8.2.- Prueba de Comparación por parejas.....	87
5.9.- Valores de pH.....	88
III.- DISEÑO EXPERIMENTAL.....	89
ETAPA 1: METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	91
ETAPA 2: ESTUDIOS DE ESTABILIDAD.....	92
IV.- PUBLICACIONES.....	95
1.- Análisis de mono- y disacáridos en formulas de base láctea por cromatografía líquida de alta eficacia con detección de índice de refracción.....	97
2.- Análisis de los furfurales potenciales y libres en formulas de base láctea por cromatografía líquida de alta eficacia. Evolución durante el almacenamiento.....	105
3.- 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.	115

4.- Evolución del contenido de mono- y disacáridos libres en fórmulas de base láctea en polvo durante el almacenamiento.....	123
5.- Evolución de los furfurales potenciales y libres en preparados para lactantes de base láctea durante el almacenamiento.....	131
6.- Evolución de los contenidos de lisina disponible y lactosa en preparados para lactantes en polvo suplementadas con aceite de pescado microencapsulado durante el almacenamiento.....	141
7.- Contenido de vitaminas A y E en preparados para lactantes de base láctea en polvo, después de abierto el envase.....	153
8.- Compuestos volátiles por cromatografía de gases en espacio de cabeza y perfil de ácidos grasos en preparados para lactantes comerciales de base láctea. Evolución después de abierto el envase.....	165
9.- Análisis de los contenidos de vitaminas A, E y C, hierro y selenio en preparados para lactantes de base láctea en polvo durante su vida útil.....	193
10.- Estudio de la estabilidad durante el almacenamiento de formulas infantiles suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, provenientes de aceites sintetizados por microorganismos unicelulares o de fosfolípidos de huevo.....	223
V.- DISCUSIÓN GENERAL.....	257
VI.- CONCLUSIONES.....	269
VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	275

VIII.- ANEXOS	293
A) Publicación: <u>Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas</u>	297
B) DIRECTIVA: 2006/141/CE DE LA COMISIÓN de 22 de diciembre de 2006 relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE.....	305
C) Presentación de Pósters en congresos:	341

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Contraindicaciones para la lactancia materna.....	12
Tabla 2. Recomendaciones internacionales sobre nutrición de recién nacidos.....	14
Tabla 3. Composición representativa de la leche de vaca y la leche materna madura.....	18
Tabla 4. Hechos clave en las recomendaciones relacionadas al uso de DHA y AA como suplementos dietarios.....	32
Tabla 5. Principales fuentes microbianas de ácidos grasos poliinsaturados.....	35
Tabla 6. Lista parcial de compañías que reportan estar investigando, desarrollando, produciendo o comercializando aceites sintetizados por microorganismos unicelulares PUFAs o productos que los contienen.....	38
Tabla 7. Reacciones de pardeamiento.....	43
Tabla 8. Mecanismo de oxidación de los lípidos.....	53
Tabla 9. Pruebas comunes para evaluar la oxidación y estabilidad en alimentos...	55

FIGURAS

Figura 1. Precursores y síntesis de los ácidos grasos n-3 y n-6.....	25
Figura 2. Proceso de visión.....	26
Figura 3. Estructura de los conos y bastones.....	29
Figura 4. Estructura de la sacarosa.....	41
Figura 5. Estructura de la lactosa.....	41
Figura 6. Formación de furfural a partir del ácido ascórbico.....	44
Figura 7. Producción de la Base de Schiff (condensación lactosa-grupo ϵ -amino) y Reordenación de Amadori.....	46
Figura 8. Estructura de ácidos grasos insaturados.....	51
Figura 9 Formas más comunes de la vitamina A	57
Figura 10. Vitamina E.....	61
Figura 11. Oxidación de la vitamina C.....	64
Figura 12. Ejemplo de proceso general de fabricación de preparados para lactantes en polvo.....	68
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.....	75
Figura 14. Ejemplo de la descomposición de los hidroperóxidos.....	79
Figura 15. Fases del vial de espacio en cabeza, para la determinación de compuestos volátiles.....	80