

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Nutrición y Bromatología



TESIS DOCTORAL

**Utilidad de indicadores de pardeamiento químico
para el control de ingredientes y
fórmulas infantiles**

José del Carmen Contreras Calderón

Granada, Noviembre de 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José del Carmen Contreras Calderón
D.L.: GR. 2760-2008
ISBN: 978-84-691-8260-4

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología

TESIS DOCTORAL

**Utilidad de indicadores de pardeamiento químico
para el control de ingredientes y
fórmulas infantiles**

MEMORIA para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia
que presenta el Ingeniero de Alimentos
JOSÉ DEL CARMEN CONTRERAS CALDERÓN

Granada, Noviembre de 2008

MEMORIA presentada para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia por el Ingeniero de Alimentos JOSÉ DEL CARMEN CONTRERAS CALDERÓN

Directores de esta Tesis:

Profesores:

Dr. D. Eduardo Guerra Hernández

Dra. D^a Belén García-Villanova Ruiz

José del Carmen Contreras Calderón
Aspirante al Grado de Doctor en Farmacia

Granada, Noviembre de 2008

La profesora D^a M^a Dolores Ruiz López, Profesora Titular y
Directora del Departamento De Nutrición y Bromatología

Certifica:

Que el presente trabajo ha sido realizado por el Ingeniero José del
Carmen Contreras Calderón en los laboratorios del Departamento
de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Granada durante los cursos 2002-2008.

Granada, a 27 de Noviembre de 2008.

Esta memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a una beca predoctoral de Formación de Personal Docente Investigador concedida por la Junta de Andalucía. Se ha desarrollado dentro del Proyecto de Investigación AGL2001-2977 “Nuevos indicadores de pardeamiento químico para el control de ingredientes, fórmulas y cereales infantiles. Relaciones con el valor nutricional” financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Ingeniero José del Carmen Contreras Calderón

Granada, Noviembre de 2008

Agradecimientos

Culmina una etapa muy importante en mi vida, y en este momento es inevitable retroceder en el tiempo y recordar todas las experiencias vividas, y todas las personas que de una u otra manera han hecho parte de esta experiencia, no solo formativa sino de vida.

Tengo que agradecer muy especialmente a mis directores Eduardo y Belen por haberme permitido tener el honor y la fortuna de trabajar junto a ellos, por haberme formado, dirigido y atendido todas mis dudas, por sus consejos, por su apoyo y por su paciencia. Gracias Eduardo y Belen sin ustedes estas tesis y mi formación no hubiera sido posible. Gracias Eduardo, más que un tutor has sido un amigo y un padre.

Gracias a mis tios Blanca y Galo, sin su apoyo nisiquiera hubiera podido iniciar esta etapa tan importante de mi vida; gracias tia Lilia, Gustavo, Ivan, Mane y Erika por haberme recibido en vuestro hogar.

Agradezco a todos y cada uno de los profesores del departamento de Nutricion y Bromatología por haberme aceptado, por su apoyo en aquellos momentos dificiles, por compartir el dia a dia, por sus consejos por sus sonrisas y por hacerme sentir parte de este departamento.

A José Angel por haberme iniciado en el manejo del laboratorio, por estar siempre dispuesto a resolver mis dudas y apoyo en todo momento, a Javi por darme caña, a Raul, Eva y Rosita por su amistad, a Martica por estar siempre dispuesta a echar una mano, a Mel por la tranquilidad que transmite y por hacerme reir, a Yessenia, Veronica y Maria por su alegría. Cristinita gracias por tu eterna sonrisa, por esa alegría desbordante, por haberme escuchado tantas veces, gracias por ser como eres y gracias por ser mi amiga.

A Javier Carreño por su amistad incondicional, compañía y por enseñarme que la vida es para disfrutarla cada dia. A Juan Pedro, amigo, confidente y hermano, gracias por estar siempre ahí cuando mas te necesite. Gracias Ihab y Juancho por vuestra sincera amistad. Gracias a todos mis compañeros colombianos, Juanpis, JuanK, Cesar, Moncada, Marco, Maria, Ana, y a todos quienes han hecho de mi estancia mas agradable.

A mi padre y hermanos por creer siempre en mí, a mi Madre (Q.E.D) que sin duda siempre me ha guiado. Gracias primitos Monica y Omar por ser otros hermanitos para mí.

De corazón quiero dar las gracias a Paola, por darle sentido a mi vida, por su paciencia, por su comprensión, por ser el principal motivo para salir adelante, gracias sinceras por tu AMOR.

Gracias a Dios.

A Paola

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de figuras	I
Abreviaturas	V
I. Revisión bibliográfica	1
I.1. Fórmulas infantiles	3
I.1.1. Generalidades	4
I.1.2. Composición de las fórmulas de inicio y continuación	5
I.1.3. Tipos de fórmulas infantiles	10
I.1.3.1. Modificaciones actuales de las fórmulas infantiles	10
I.1.3.2. Fórmulas para la alimentación especial de lactantes	11
I.1.4. Aspectos tecnológicos	15
I.1.5. Elaboración de las fórmulas infantiles solidas	18
I.2. Reacción de Maillard	21
I.2.1. Química de la reacción de Maillard	22
I.2.1.1. Variables y prevención de la reacción de Maillard	24
I.2.1.2. Consecuencias nutricionales de la reacción de Maillard	30
I.2.1.3. Indicadores químicos y biológicos de la reacción de Maillard	35
I.2.1.4. Reacción de Maillard en fórmulas infantiles	49
Objetivos	53
II. Material y métodos	57
II.1. Muestras	59
II.1.1. Ingredientes proteicos	60
II.1.2. Fórmulas infantiles	60
II.1.3. Fórmulas infantiles comerciales	63
II.1.4. Sistemas modelo	64
II.2. Métodos	67
II.2.1. Elaboración de sistemas modelo	68
II.2.1.1. Estudios preliminares	68
II.2.2. Determinaciones analíticas	69
II.2.2.1. Determinación de hidroximetilfurfural	69
II.2.2.2. Determinación de furfural	71
II.2.2.3. Determinación de furosina	73
II.2.2.4. Determinación de lisina útil	75
II.2.2.5. Determinación de pirralina	77
II.2.2.6. Síntesis y determinación de N ^ε -Carboxymetilisina (CML)	80
II.2.2.6.1. Síntesis de CML	80
II.2.2.6.2. Determinación de CML	85
II.2.2.7. Determinación de fluorescencia	87
II.2.2.8. Determinación de reflectancia	88
II.2.2.9. Determinaciones complementarias	89
II.2.2.9.1. Determinación de extracto seco	89

	Página	
II.2.2.9.2.	Determinación de proteínas	90
II.2.2.9.3.	Determinación de azúcares	91
II.2.2.9.4.	Determinación de ácidos grasos	94
II.2.2.9.5.	Índice de peróxidos	96
II.2.2.9.6.	Determinación de pH	98
III.	Resultados	99
III.1.	Determinación de compuestos furánicos (hidroximetilfurfural y furfural)	101
III.1.1.	Análisis de muestras	101
III.1.1.1.	Ingredientes proteicos	101
III.1.1.2.	Fórmulas infantiles	101
III.1.1.3.	Fórmulas infantiles comerciales	102
III.2.	Determinación de furosina	103
III.2.1.	Estudios preliminares	103
III.2.2.	Análisis de las muestras	105
III.2.2.1.	Ingredientes proteicos	105
III.2.2.2.	Fórmulas infantiles	106
III.2.2.3.	Fórmulas infantiles comerciales	113
III.2.2.4.	Sistemas modelo	113
III.3.	Determinación de lisina útil	117
III.3.1.	Estudios preliminares	117
III.3.2.	Análisis de las muestras	118
III.3.2.1.	Ingredientes proteicos	118
III.3.2.2.	Fórmulas infantiles	118
III.3.2.3.	Fórmulas infantiles comerciales	127
III.3.2.4.	Sistemas modelo	128
III.4.	Determinación de pirralina	128
III.4.1.	Análisis de las muestras	128
III.4.1.1.	Ingredientes proteicos	128
III.4.1.2.	Fórmulas infantiles	129
III.4.1.3.	Sistemas modelo	129
III.5.	Determinación de CML	130
III.5.1.	Estudios preliminares	130
III.5.2.	Análisis de muestras	132
III.5.2.1.	Ingredientes proteicos	132
III.5.2.2.	Fórmulas infantiles	133

	Página
III.6. Determinación de Florescencia	134
III.6.1. Estudios preliminares	134
III.6.2. Análisis de muestras	135
III.6.2.1. Fórmulas infantiles	135
III.6.2.2. Sistemas modelo	139
III.7. Determinación de reflectancia	142
III.7.1. Estudios preliminares	142
III.7.2. Análisis de muestras	143
III.7.2.1. Fórmulas infantiles	143
III.8. Análisis complementarios	148
III.8.1. Determinación de extracto seco	148
III.8.2. Determinación de proteínas	149
III.8.3. Determinación de azúcares	151
III.8.4. Determinación de ácidos grasos	152
III.8.5. Determinación de peróxidos	156
III.8.6. Determinación de pH	158
I.V. Discusión	161
IV.1. Determinación de compuestos furánicos (HMF y furfural)	163
IV.1.1. Estudios de optimización	163
IV.1.2. Determinación de HMF y furfural en muestras	164
IV.1.2.1. Ingredientes proteicos	164
IV.1.2.2. Fórmulas infantiles	164
IV.1.2.3. Fórmulas infantiles comerciales	165
IV.2. Determinación de furosina	166
IV.2.1. Estudios preliminares	167
IV.2.2. Determinación de furosina en muestras	168
IV.2.2.1. Ingredientes proteicos	168
IV.2.2.2. Fórmulas infantiles	169
IV.2.2.3. Fórmulas infantiles comerciales	180
IV.2.2.4. Sistemas modelo	183
IV.3. Determinación de lisina útil	188
IV.3.1. Estudios preliminares	189
IV.3.2. Determinación de lisina útil en muestras	189
IV.3.2.1. Ingredientes proteicos	189
IV.3.2.2. Fórmulas infantiles	191
IV.3.2.3. Fórmulas infantiles comerciales	198
IV.3.2.4. Sistemas modelo	198

	Página
IV.4. Determinación de pirralina	200
IV.4.1. Estudios preliminares	200
IV.4.2. Determinación de pirralina en muestras	200
IV.4.2.1. Ingredientes proteicos	200
IV.4.2.2. Fórmulas infantiles	201
IV.4.2.3. Sistemas modelo	202
IV.5. Síntesis y Determinación de CML	202
IV.5.1. Estudios preliminares	203
IV.5.2. Determinación de CML en muestras	203
IV.5.2.1. Ingredientes proteicos	204
IV.5.2.2. Fórmulas infantiles	204
IV.6. Intensidad de Fluorescencia	207
IV.6.1. Estudios preliminares	207
IV.6.2. Determinación de fluorescencia en muestras	208
IV.6.2.1. Fórmulas infantiles	208
IV.6.2.2. Sistemas modelo	212
IV.7. Determinación de reflectancia	214
IV.7.1. Estudios preliminares	215
IV.7.2. Determinación de reflectancia en muestras	215
IV.7.2.1. Fórmulas infantiles	215
IV.8. Análisis complementarios	219
IV.8.1. Determinación de azúcares	219
IV.8.2. Determinación de ácidos grasos	219
IV.8.3. Determinación de peróxidos	220
IV.8.4. Determinación de pH	221
V. Conclusiones	223
VI. Bibliografía	227
Difusión de los resultados	265

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1.	Esquema de elaboración de fórmulas infantiles solidas	18
2.	Reacción de Maillard	22
3.	Indicadores de la reacción de Maillard	35
4.	Formación de furosina a partir de la ϵ -fructosilisina	39
5.	Espectro de RMN de protones de CML	82
6.	Espectro de RMN de carbonos de CML	83
7.	Espectro de masas de alta resolución de CML	84
8.	Cromatograma de patrón CML	87
9.	Furosina obtenida en la formula A	103
10.	Furosina obtenida en la formula B	103
11.	Furosina obtenida en la formula C	104
12.	Cromatograma de furosina en la formula A conservada a 30°C durante 4 semanas a Aw 0,65	105
13.	Cromatograma de DNP-Lisina de la formula A conservada a 30°C durante 4 semanas a actividad de agua 0,65	117
14.	Espectro y cromatograma de pirralina patrón y sistema modelo MDX-PSLBL	130
15.	Cromatograma de CML de la Formula A planta industrial conservada a 30° C/4 semanas/Aw 0,65	132
16.	Comportamiento de la furosina durante la conservación de la formula infantil A planta industrial (PI) y piloto (PP)	172
17.	Comportamiento de la furosina durante la conservación de la formula infantil B planta industrial (PI)	173
18.	Comportamiento de la furosina durante la conservación de la formula infantil B planta piloto (PP)	174
19.	Comportamiento de la furosina durante la conservación de la formula infantil C planta industrial (PI) y piloto (PP)	175
20.	Comportamiento de la furosina durante la conservación de la formula infantil D planta industrial (PI) y piloto (PP)	176
21.	Comportamiento de la furosina durante la conservación a Aw 0,65 de la formula infantil A planta industrial (PI) y piloto (PP)	178
22.	Comportamiento de la furosina durante la conservación a Aw 0,65 de la formula infantil B planta industrial (PI) y piloto (PP)	179
23.	Comportamiento de la furosina durante la conservación a Aw 0,65 de las fórmulas infantiles C y D planta industrial (PI) y piloto (PP)	180
24.	Correlación entre HMF y furosina	182
25.	Correlación entre furfural y furosina	182
26.	Correlación entre lisina útil y furosina	190
27.	Evolución de la intensidad de fluorescencia durante la conservación de la formula A a 20 y 30°C/Aw 0,65	210
28.	Evolución de la intensidad de fluorescencia durante la conservación de la formula B a 20 y 30°C/Aw 0,65	210

	Página
29. Evolución de la intensidad de fluorescencia durante la conservación de las fórmulas hidrolizadas a 30°C/Aw 0,6	211
30. Evolución del color durante la conservación de la fórmula A a 20 y 30°C/Aw 0,65	216
31. Evolución del color durante la conservación de la fórmula B a 20 y 30°C/Aw 0,65	217
32. Evolución del color durante la conservación de las fórmulas C y D a 20 y 30°C/Aw 0,65	218

ABREVIATURAS

AG: Ácidos grasos
AGPI-CL: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
APLV: Alergia a proteínas de leche de vaca
APS: Aislado de proteína de soja
AOAC: Asociación Oficial de Analistas Químicos
ATC: Ácido Tricloroacético
AUFS: Unidades de Absorbencia Máximo de la Escala
Aw: Actividad de agua
BHA: Butil Hidroxi Anisol
CC: Caseinato de Calcio
CCA: Comité Científico para la Alimentación
CDV: Coeficiente de Digestibilidad Verdadero
CE: Comunidad Europea
CEC: Coeficiente de Eficacia en Crecimiento
CEP: Coeficiente de eficacia proteica
CIE: Comisión Internacional de Iluminación
CML: Carboximetilisina
CMP: Caseinamacropeptido
CS: Caseinato Sódico
CSIC: Centro Superior de Investigaciones Científicas
CV: Coeficiente de Variación
DE: Dextrosa equivalente
DHA: Ácido docosahecanoico
DNP: Dinitrofenil
ELISA: Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
ESPGAN: Comité de Nutrición de la Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica
FAB: Bombardeo de átomos acelerados
FAO: Organización para la Agricultura y la Alimentación
FDA: Administración de Drogas y Alimentos
FEH: Fórmulas extensivamente hidrolizadas
FH: Fórmulas hidrolizadas
FI: Fórmulas infantiles
FID: Detector de Ionización de Llama
FDNB: Dinitrofluorobenceno
FOS: Fructooligosacaridos
FS: Fórmulas Suplementadas
GC: Cromatografía de Gases
GOS: Galactooligosacaridos
HMF: Hidroximetilfurfural
HMDS: Hexametildisilazano
HPAEC-PED: Cromatografía Líquida de Intercambio Aniónico de Alta Resolución con Detección Mediante Pulsos Amperométricos
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

HPLC-RI: Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección Mediante Índice de Refracción
HR: Humedad Relativa
LAC: Lactosa
MCT: Triglicéridos de cadena media
MDX: Maltodextrinas
NAM: N-acetil-L-metionina
NFS: Fórmulas No Suplementadas
NPU: Utilización Neta de la Proteína
OMS: Organización Mundial de la Salud
OPA: o-ftaldialdehido
Pd/C: Paladio/Carbono
PDCAAS: Computo de aminoácidos corregido con la digestibilidad de la proteína
PER: Eficacia proteica
PI: Planta Industrial
PP: Planta Piloto
PPV: Valor Productivo de la Proteína
PSL: Proteína de Suero Lácteo
PSLBL: Proteína de Suero Lácteo Baja en Lactosa
PSLBLPH: Proteína de suero lácteo baja en lactosa parcialmente hidrolizada
RD: Real decreto
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
SENC: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
TFA: Ácido Trifluoroacético
TLC: Cromatografía de Capa Fina
TNBS: Trinitrobenceno-sulfónico
UHT: Ultra Alta Temperatura
U.I: Unidades Internacionales
UNICEF: Fondo de Naciones Unidas para la Infancia
UNU: Universidad de Naciones Unidas
VB: Valor Biológico
WHO: Organización Mundial para la Salud
YI: Índice de Amarillos

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1. FÓRMULAS INFANTILES

I.1.1. Generalidades

La leche materna es un alimento único e insustituible para aportar al lactante todos los nutrientes que necesita, en la cantidad y proporción adecuada, durante los 6 primeros meses de vida; y una parte importante de los mismos desde los 6 meses a los 2 años. Está adaptada genéticamente no solo a la especie, sino también a cada niño y a sus necesidades y grado de desarrollo. Además de suministrar el mejor aporte metabólico, disminuye la sensibilización alérgica y aumenta la inmunidad, por lo que protege frente a infecciones, disminuye la muerte súbita y confiere cierta protección frente a enfermedades crónicas. Por último, no hay que olvidar que favorece la creación del vínculo entre madre e hijo. La OMS y la UNICEF proclamaron en 1989 el derecho de los recién nacidos y sus madres a que se hagan todos los esfuerzos posibles para promover el inicio y mantenimiento de la lactancia materna. La OMS, en el 2002, insiste en recomendar la lactancia materna los 6 primeros meses, y, si es posible, mantenerla hasta los dos años. En España se ha estimado que solo el 23 y 11 % de mujeres mantienen la lactancia durante 3 y 6 meses respectivamente (Serra-Majem y Aranceta, 2001). El objetivo de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) es alcanzar al menos 6 meses de lactancia materna (Serra-Majem y Aranceta, 2001). Aunque la lactancia materna es la manera natural y mejor de alimentar al bebé (Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría, 1999; Pallás y Grupo PREVINFAD, 2003; Jiménez, 2001; Martín y Lozano, 1999), la realidad es que las circunstancias socioculturales no la facilitan.

Si la lactancia materna no es posible se recurrirá a la alimentación artificial con fórmula adaptada de inicio durante los seis primeros meses y de continuación a partir de esa edad (U.S. Preventive Service Task Force, 1996; Ballabriga y Carrascosa, 1998; Programa de Atención al Niño, 2002; Pallás y Grupo PREVINFAD, 2003). Las fórmulas adaptadas intentan simular en algunos aspectos la leche materna aunque la biodisponibilidad de los nutrientes es muy diferente. Están preparadas a partir de leche de vaca y su composición debe cumplir las recomendaciones publicadas por organismos internacionales. En Europa, las recomendaciones sobre la composición de las fórmulas adaptadas están dadas por el Comité de Nutrición de la Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (ESPGAN), Codex Alimentarius, así como por el Comité Científico para la Alimentación (CCA) de la Comunidad Europea (CE). En España la reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación se encuentra recogida en el Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo, el cual traspone la directiva comunitaria (2006/141/CE).

Según la ESPGAN se recomiendan dos tipos de fórmulas:

- Fórmula de inicio: satisface las necesidades del lactante hasta los 6 meses y puede utilizarse después de esta edad junto a otro tipo de alimentos.
- Fórmula de continuación: forma parte de un régimen de alimentación mixto y se utiliza después de los 4-6 meses de edad. Puede utilizarse hasta los 3 años con ventajas nutricionales sobre la leche de vaca.

I.1.2. Composición de las fórmulas de inicio y continuación

La proporción de principios inmediatos debe imitar los de la leche materna: 50-55% del aporte calórico en forma de grasa, 35-50% de hidratos de carbono y el 5% de proteínas (García-Onieva, 2007).

Aporte energético

Las fórmulas infantiles (FI) preparadas según las instrucciones del fabricante deberán contener entre 60 y 70 kcal por 100 ml (Real Decreto 867/2008), las cuales son suficientes para suplir los requerimientos fisiológicos de ganancia de peso en niños sanos (Koletzko y col., 2005). Se basa en el aporte medio de la leche materna, que fluctúa por la variabilidad del contenido de grasa de la leche materna durante las tetadas.

Contenido proteico

El contenido proteico es de 1,8-3 g/100 kcal (1,2-2 g/100 ml) para las fórmulas de inicio y 1,8-3,5 g/100 kcal (1,2-2,3 g/100 ml) para las fórmulas de continuación (Real Decreto 867/2008). El de las fórmulas de continuación es superior al de las fórmulas de inicio a pesar de la reducción de los valores, recomendados por la ESPGAN en 1990. La proporción seroproteínas/caseína varía en la leche materna desde el calostro (90/10) a la leche madura (60/40). El lactosuero materno contiene alfa-lactoalbúmina, lisozima, lactoferrina e inmunoglobulinas; mientras que en las FI predomina la beta-lactoglobulina sin capacidad inmunológica y con mayor poder alergénico. El índice químico de las proteínas de las FI debe ser de al menos el 80% del de la leche materna, para proporcionar una cantidad similar de aminoácidos, precisándose para ello un cociente seroproteínas/caseína de 60/40 que, en las fórmulas de continuación, es de 40/60 e incluso 20/80 (García-Onieva, 2007).

Contenido en aminoácidos

Para un valor energético equivalente, el preparado para lactantes contendrá una cantidad disponible de cada uno de los aminoácidos esenciales y semiesenciales como mínimo igual a la contenida en la proteína de referencia (leche materna, tal y como se define en la tabla I.1.2-1) (Real Decreto 867/2008).

Tabla I.1.2-1: Aminoácidos esenciales y semiesenciales de la leche materna expresados en g/100 g de proteína y mg/100 kcal.

Aminoácidos	mg/100 kcal
Cisteína	38
Histidina	40
Isoleucina	92
Leucina	166
Lisina	113
Metionina	23
Fenilalanina	83
Treonina	77
Triptofano	32
Tirosina	76
Valina	88

Hidratos de carbon

El contenido se encuentra entre 9-14 g/100 kcal (6,1-9,6 g/100 ml) (Real Decreto 867/2008). El carbohidrato dominante en la leche humana es la lactosa, que aporta cerca del 40% del valor energético. La lactosa proporciona efectos beneficiosos en la fisiología intestinal, incluidos efectos prebióticos, ablandamiento de heces, y mejora de la absorción de agua, sodio y calcio (Koletzko y col., 2005).

La lactosa debe ser el principal carbohidrato de las FI (mín. 4,5 g/100 kcal), como lo es en la leche materna, siendo el resto maltodextrinas, maltosa, glucosa, sacarosa, jarabe de glucosa, almidón pretostado y gelatinizado originalmente sin gluten (Real Decreto 867/2008). La leche humana contiene un 10% de oligosacáridos cuyo papel en la protección de infecciones y, como componente de la síntesis de gangliósidos y esfingolípidos, parece cada vez más importante, planteándose su incorporación en las nuevas fórmulas (García-Onieva, 2007).

Grasas

El contenido de grasa total recomendada es de 4,4-6 g/100 kcal (2,86-4,1 g/100 ml) para las fórmulas de inicio y de 4-6 g/100 kcal (2,6-4,1 g/100 ml) para las de continuación (Real Decreto 867/2008) que es equivalente a aproximadamente el 40-54% del contenido de energía, el cual es similar a los valores encontrados normalmente en la leche humana (Koletzko y col., 2001).

El aporte de grasas en la dieta del lactante debe cubrir el importante aumento de peso que sucede en el primer semestre de vida, teniendo en cuenta que la grasa supone el 35% de la ganancia ponderal que equivale al 90% de la energía retenida. La absorción de la grasa de leche de vaca es mucho menor que la de la leche materna (60% frente al 90%). La ESPGAN recomienda que la absorción sea al menos del 85%. Los ácidos grasos (AG) predominantes en la leche humana son el ácido palmítico (20%), oleico (38%) y linoleico (15%) (García-Onieva, 2007).

La absorción de las grasas aumenta cuanto menos saturado es el AG y más corta es su cadena. Los AG saturados, al ser mal absorbidos, aumentan la pérdida fecal de calcio y elevan la colesterolemia. Las grasas animales y vegetales son heterogéneas en

cuanto a su composición en triglicéridos, vitaminas liposolubles y AG. Es por ello que el origen de la grasa (vegetal o animal) no significa una mejor calidad de la misma. La adición de triglicéridos de cadena media (MCT) para mejorar la absorción lipídica no ha conseguido un mejor balance energético y se han descrito potenciales riesgos metabólicos; por lo que, se recomienda su adición en leches de prematuros sin exceder el 40% de la grasa total. El ácido linoleico, AG esencial precursor de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga o AGPI-CL de la serie omega 6, que debe ser aportado en la dieta, ha demostrado tener efectos perjudiciales cuando su cantidad es excesiva (efectos inmunosupresores y aumento de la peroxidación lipídica). Por ello, el Real Decreto recomienda valores de 0,3-1,2 g/100 kcal así como también la adición de Á. linolénico, precursor de los AGPI-CL de la serie omega 3, siendo el cociente entre ambos de 5 a 15. En las fórmulas de continuación, la cantidad de Á. linoleico supone el 4,5-8% de la grasa total. Los AGPI-CL son precursores de las prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, además de formar parte de las membranas celulares y del desarrollo cerebral y de la agudeza visual. La adición de AGPI-CL a las fórmulas de pretérminos es, según la ESPGAN, recomendable, aunque su adición a fórmulas de inicio necesita una mayor información científica (García-Onieva, 2007). Se recomienda que los omega 6 (Ác. linoleico y Ác. araquidónico) y omega 3 (Ác. alfa linolénico, Ác. eicosapentanoico y el Ác. docosahexanoico (DHA)) no superen el 2% y 1% respectivamente, del total de ácidos grasos (Real Decreto 867/2008).

La concentración sérica de colesterol es superior en los bebés alimentados con leche materna pero no está justificada la suplementación de las fórmulas; ya que, el cerebro puede sintetizar sus propios requerimientos de colesterol. En cuanto a los ácidos grasos trans, es recomendable que su concentración sea la menor posible (no más del 6% del aporte de grasa); por lo que, están desaconsejadas las grasas hidrogenadas en la fabricación de la FI. Las recomendaciones europeas, más estrictas que las americanas, prohíben el uso de aceite de sésamo y algodón, y limitan el contenido de Ac. erucico. El Real Decreto 867/2008 limita los ácidos grasos trans al 3% y establece como máximo un 20% de los ácidos láurico y mirístico.

Minerales y oligoelementos

El contenido en minerales de las fórmulas debe mantenerse en niveles adecuados para no producir deficiencias con posible repercusión clínica (García-Onieva, 2007). El Real Decreto 867/2008 reglamenta las concentraciones recomendadas por la ESPGAN (Koletzko y col., 2001), las cuales se recogen en la tabla I.1.2-2.

Las necesidades de **sodio** del niño son mayores que las del adulto, pero los neonatos realizan mal su excreción; por lo que, la concentración de sodio, cloro y potasio debe ser muy inferior a la existente en la leche de vaca y asemejarse a la de la leche humana. La ESPGAN recomienda que la suma de cloro, sodio y potasio no supere los 50 mEq/L. El contenido de **calcio** del organismo está fundamentalmente en el esqueleto, siendo su principal mecanismo regulador la absorción. Ésta disminuye con ingestas elevadas de grasas y de fósforo. El calcio de la FI se absorbe peor que el de la leche humana, por lo que su contenido no debe ser inferior a 50 mg/100 kcal. La absorción del **fósforo** está, en parte, regulada por la del calcio, recomendándose que el cociente Ca/P esté entre 1 y 2. Tanto la leche humana como la de vaca son pobres en **hierro**, aunque la biodisponibilidad es mucho mayor en la primera (70% frente al 30% en la de vaca). A pesar de ello, la alta frecuencia de ferropenia en el lactante indica que,

aún con leche materna, conviene suplementar con hierro a los lactantes que la toman. No se ha demostrado que las fórmulas suplementadas se relacionen con procesos infecciosos más frecuentes, pero esta adición exige que se cumplan unas condiciones de calidad organoléptica y solubilidad. El hierro se suele añadir en forma de sales ferrosas, añadiéndose ácido ascórbico, que aumenta su absorción. Es necesario que se haga constar la cantidad de hierro de las fórmulas; pues, en Europa, no todas las leches están suplementadas con este mineral (García-Onieva, 2007). El contenido en **Cinc** de la FI debe superar los 0,3 mg/100 kcal (Koletzko y col., 2001) para así cubrir los elevados requerimientos que supone la ganancia ponderal en los seis primeros meses. Su absorción se ve disminuida por el cobre, y viceversa (García-Onieva, 2007).

Tabla I.1.2-2: Contenido en sales minerales y oligoelementos de las fórmulas infantiles de inicio y continuación.

Minerales	Por 100 kcal	
	Mínimo	Máximo
Sodio (mg)	20	60
Potasio (mg)	60	160
Cloro (mg)	50	160
Calcio (mg)	50	140
Fósforo (mg)	25	90
Magnesio (mg)	5	15
Hierro (mg)	0,3 ⁽¹⁾ y 0,6 ⁽²⁾	1,3 ⁽¹⁾ y 2 ⁽²⁾
Cinc (mg)	0,5	1,5
Cobre (µg)	35	100
Yodo (µg)	10	50
Selenio (µg)	1	9
Manganeso (µg)	1	100
Flúor (µg)	-	100

⁽¹⁾ Fórmula de Inicio

⁽²⁾ Fórmula de Continuación

Vitaminas

El contenido en vitaminas recomendado por los distintos comités de nutrición es el indicado por el Codex Alimentario (Maldonado-Lozano y Gil-Campos, 2005). El Real Decreto 867/2008 reglamenta las concentraciones de vitaminas en preparados para lactantes (Tabla I.1.2-3).

Tabla I.1.2-3: Contenido en vitaminas de las fórmulas infantiles de inicio y continuación.

Vitaminas	Por 100 kcal	
	Mínimo	Máximo
A ($\mu\text{g-ER}$) ⁽¹⁾	60	180
D (μg) ⁽²⁾	1	2,5 ⁽⁶⁾ y 3 ⁽⁷⁾
Tiamina (μg)	60	300
Rivoflavina (μg)	80	400
Niacina (μg) ⁽³⁾	300	1500
Ácido pantoténico (μg)	400	2000
B ₆ (μg)	35	175
Biotina (μg)	1,5	7,5
Ácido fólico (μg)	10	50
B ₁₂ (μg)	0,1	0,5
C (mg)	10	30
K (μg)	4	25
E (mg $\alpha\text{-ET}$) ⁽⁴⁾	0,5/g de ácidos grasos poliinsaturados expresados como ácido linoleico, corregido en función de los dobles enlaces ⁽⁵⁾ , pero en ningún caso inferior a 0,5 mg por 100 kcal disponibles	5

⁽¹⁾ ER = todo equivalente de trans retinol.

⁽²⁾ En forma de colecalfiferol, del que 10 μg = 400 U.I. de vitamina D.

⁽³⁾ Niacina preformada.

⁽⁴⁾ $\alpha\text{-ET}$ = equivalente de D- α -tocoferol.

⁽⁵⁾ 0,5 mg de $\alpha\text{-ET/g}$ de ácido linoleico (18:2 n-6); 0,75 mg de $\alpha\text{-ET/g}$ de α -ácido linolénico (18:3 n-3); 1,0 mg de $\alpha\text{-ET/g}$ de ácido araquidónico (20:4 n-6); 1,25 mg de $\alpha\text{-ET/g}$ de ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3); 1,5 mg de $\alpha\text{-ET/g}$ de ácido docosahexaenoico (22:6 n-3).

⁽⁶⁾ Fórmula de inicio.

⁽⁷⁾ Fórmula de continuación.

I.1.3. Tipos de fórmulas infantiles

I.1.3.1. Modificaciones actuales de las fórmulas infantiles

Fórmulas anti-estreñimiento

Recientemente, se ha puesto en evidencia la relación entre la consistencia de las heces y la eliminación de jabones cálcicos. En los bebés alimentados con leche materna, las heces son más blandas y ello se debe a que presentan menos jabones cálcicos. En la leche materna, el ácido palmítico representa un 25% de los AG y más del 70% está esterificado en la posición beta de la molécula del triglicérido y son hidrolizados adecuadamente por la lipasa (Rivero-Urgell y col., 2005). En las fórmulas infantiles, los ácidos grasos están mayoritariamente en posición alfa y, al no ser hidrolizados, quedan ácidos grasos libres que se absorben mal y se unen al calcio formando jabones cálcicos insolubles (García-Onieva, 2007). Las fórmulas antiestreñimiento aportan un alto porcentaje de ácido palmítico en posición β (β -palmítico). Esta cualidad favorece la absorción de la fracción grasa de la leche, del calcio y del magnesio, mejorando la biodisponibilidad de estos compuestos y minimizando la formación de jabones cálcicos a nivel intestinal, principales responsables de la formación de heces duras (Soler-Balda y San segundo-Nieto, 2006).

Las **fórmulas anti-cólico** son modificadas mediante hidrólisis parcial de las proteínas, adición de dextrinomaltoza, reducción del contenido en lactosa, eliminación del almidón e incorporación de fructooligosacáridos para conseguir efecto prebiótico. También se añade mayor proporción de ácido palmítico en posición β y triglicéridos de cadena media (MCT) (Soler-Balda y San segundo-Nieto, 2006; García-Onieva, 2007). En algunas fórmulas se añade fibra (García-Onieva, 2007).

Fórmulas suplementadas con nucleótidos

La importancia de los nucleótidos ha ido en aumento por el papel que juegan en la protección contra las enfermedades infecciosas a través de la maduración de los linfocitos T, activación de macrófagos y de células NK (García-Onieva, 2007). La leche materna tiene una alta concentración de nucleótidos, mientras que en la leche de vaca y en las fórmulas no suplementadas, están prácticamente ausentes (Rivero-Urgell, 2005). Los estudios sobre los efectos inmunológicos de los nucleótidos han demostrado que tienen efectos beneficiosos sobre la estimulación de la inmunidad humoral y celular. Además ejercen protección frente a la diarrea, composición de la flora intestinal, crecimiento y maduración de las células de la mucosa intestinal, aumento de la actividad de las disacaridasas intestinales, mejora de los niveles plasmáticos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL), mejora del perfil lipídico plasmático y también aceleran la recuperación ponderal en prematuros y recién nacidos de bajo peso (Rivero-Urgell, 2005). El RD 867/2008 indica que la concentración de nucleótidos no será superior a 5 mg/100 kcal.

Fórmulas con efecto bifidógeno

En la leche materna se han identificado más de 130 oligosacáridos diferentes. Los oligosacáridos promueven el crecimiento de los lactobacilos y de las

bifidobacterias, lo que inhibe el crecimiento de las bacterias enteropatógenas como *Escherichia coli* y *Shigella*. Además, actúan como falsos receptores de membrana para estas bacterias enteropatógenas, evitando la colonización del intestino y eliminándolas con las heces (Rivero-Urgell, 2005).

La adición de oligofructosa e inulina a las leches infantiles va a producir una mayor eliminación de bifidobacterias y lactobacilos en heces, así como un ablandamiento de estas. El Comité de Nutrición Europeo indica que los fructooligosacaridos (FOS) y galactooligosacaridos (GOS) pueden ser añadidos a los preparados para lactantes en un contenido no superior a 0,8 g/100 ml (García-Onieva, 2007). La incorporación de prebióticos como los FOS y GOS que potencian la flora bifidógena autóctona y crean un ambiente hostil para la flora putrefactiva y potencialmente patógena, ha sido uno de los grandes avances en la prevención de enfermedades de la infancia como: diarreas bacterianas o por rotavirus, infecciones debidas a bacterias oportunistas, traslocación bacteriana, etc. Y también como preventivo de enfermedades degenerativas del adulto como: aterosclerosis, diabetes, hipertensión, estreñimiento, cánceres intestinales, etc. Además estimulan el sistema inmune y aumentan la absorción de minerales como el calcio y el magnesio. La incorporación de probióticos (Bifidobacterias y Lactobacilos) para recuperar la Eubiosis o equilibrio bacteriano de la flora intestinal colónica, también ha sido uno de los puntales de la investigación en las últimas décadas, pero los productos actualmente en el mercado, que utilizan bacterias liofilizadas, aún no garantizan una perfecta implantación y colonización de estas bacterias beneficiosas en el colon (Rivero-Urgell, 2005).

Fórmulas adaptadas y desarrollo cognitivo

Desde hace unos años se están desarrollando FI que adicionan AGPI-CL, araquidónico y docosahexanoico (DHA) para asemejarse a la leche materna; ya que, en los niños alimentados con FI, las concentraciones de DHA y araquidónico, en plasma y en la membrana eritrocitaria, son menores que en los lactados al pecho. Asimismo, se ha encontrado menor cantidad de DHA en corteza cerebral en los alimentados con FI. La incorporación de estos ácidos grasos y su relación con el desarrollo psicomotor, agudeza visual y crecimiento, ha sido ampliamente estudiada, existiendo una reciente revisión de la Cochrane Library que, tras revisar los 9 mejores estudios publicados, no encuentra clara evidencia del beneficio de adicionar AGPI-CL a las fórmulas. La recomendación actual es que, en niños a término, el 0,2% de los ácidos grasos debe ser DHA y el 0,35%, araquidónico. En niños pretérmino, las cifras deben ser 0,35 y 0,4%, respectivamente. Algunas fórmulas adicionan taurina por su beneficio potencial, en pretérminos, en la neurotransmisión inhibitoria del cerebro y conjugación de sales biliares, así como carnitina, que interviene en la utilización mitocondrial de los ácidos grasos libres (García-Onieva, 2007).

I.1.3.2 Fórmulas para la alimentación especial de lactantes

Las fórmulas especiales tienen como fin alimentar al lactante que presenta algún tipo de enfermedad y deben ser contempladas como alimentos-medicamentos; por lo que, su indicación debe ser siempre pediátrica.

En la actualidad, disponemos de un gran número de fórmulas lácteas destinadas a alimentar a aquellos lactantes que, por distintas patologías, no pueden serlo con una fórmula adaptada o con leche de vaca.

Fórmulas anti-regurgitación

Las regurgitaciones son frecuentes en los primeros meses de vida del lactante, con tendencia a desaparecer espontáneamente hacia los 12-18 meses. Son un motivo frecuente de consulta, indicándose, en ocasiones, modificaciones en la dieta y medicamentos específicos (García-Onieva, 2007). Son fórmulas de inicio y de continuación a las que se les añaden sustancias espesantes, como goma de garrofín, amilopectina y/o almidones de arroz o maíz, y que se utilizan para controlar o minimizar los vómitos y las regurgitaciones excesivas del lactante, así como a modo de terapéutica dietética en el reflujo gastroesofágico no complicado. Todas ellas presentan una menor concentración de lactosa, y una mayor de fosfato inorgánico, lo que no favorece la absorción del calcio. Por otro lado, algunas de estas fórmulas tiene una relación caseína/proteínas del suero semejante a la de la leche de vaca, sin que se haya demostrado el efecto antirregurgitación de la caseína (Maldonado-Lozano y Gil-Campos, 2005).

Asimismo, se ha descrito un incremento de la tos con el uso de estas fórmulas. Estos aspectos, junto a las repercusiones nutricionales (disminución de biodisponibilidad del calcio, cinc, hierro, etc.), hacen que su indicación deba ser siempre realizada por el pediatra, que hará un adecuado seguimiento del desarrollo del lactante. La utilización generalizada de estas fórmulas ha llevado a la ESPGAN a publicar sus indicaciones en el año 2003 (García-Onieva, 2007).

Fórmulas sin lactosa

Las fórmulas sin lactosa son aquellas en que la lactosa se ha sustituido parcial o totalmente por otro carbohidrato que no presente problemas en su absorción, como dextrinomaltoza o polímeros de glucosa (Maldonado-Lozano y Gil-Campos, 2005; Soler-Balda y San segundo-Nieto, 2006; Cilleruelo-Pascual y Fernandez-Fernandez, 2006; García-Onieva, 2007). Su uso está indicado en lactantes y niños pequeños que presentan malabsorción de lactosa. Esta situación aparece con cierta frecuencia tras episodios de gastroenteritis aguda o de otros procesos que conlleven una lesión de la mucosa intestinal con alteración de la actividad lactásica. Dado que el déficit suele ser transitorio y que su acción también es favorecedora de la absorción del calcio intestinal, se recomienda el mantenimiento de estas fórmulas sólo de forma temporal (2-3 semanas). Se ha recomendado un aporte adicional de calcio en la dieta de los niños que tengan necesidad de consumir, durante un tiempo prolongado, una fórmula sin lactosa (Soler-Balda y San segundo-Nieto, 2006). Este tipo de fórmulas suelen ser bien toleradas, pero tienen el inconveniente de ser caras (Maldonado-Lozano y Gil-Campos, 2005).

Fórmulas hidrolizadas

Las fórmulas hidrolizadas (FH), se desarrollaron para el tratamiento de problemas de digestión y absorción. Con el paso del tiempo, sus indicaciones se han ido ampliando, siendo la alergia a proteínas de leche de vaca (APLV), ya sea mediada por

IgE, IgG o inmunidad celular y, en especial, la enteropatía inducida por leche de vaca, las principales indicaciones. En lactantes de alto riesgo de atopia, están indicadas para la prevención de la APLV (García-Onieva, 2007). Son fórmulas en las que las proteínas están predigeridas mediante hidrólisis enzimática, tratamiento térmico y ultrafiltración. La fuente proteica es la caseína, la proteína del suero o ambas. Se tiende a una mezcla de ambas para que el aminograma sea similar al de la leche de mujer, porque los hidrolizados de caseína pueden elevar la tirosina, fenilalanina y metionina, y en los hidrolizados de seroproteínas se aporta más cantidad de treonina que la leche humana y aumentan los niveles de valina, metionina, fenilalanina, leucina e isoleucina (Soler-Balda y San segundo-Nieto, 2006). Los hidratos de carbono aportados son dextrinomaltsas y los lípidos, triglicéridos de cadena media (MCT) y un aceite que contenga ácidos grasos esenciales (García-Onieva, 2007; Maldonado-Lozano y Gil-Campos, 2005).

Según el grado de hidrólisis, pueden ser de dos tipos: **parcialmente hidrolizadas** conteniendo una cierta proporción de proteína intacta o sólo ligeramente degradada con péptidos de peso molecular entre 8.000 y 20.000 Da. El resto de los principios inmediatos es similar a los de las fórmulas de inicio (Cilleruelo-Pascual y Fernández-Fernández, 2006). Estas fórmulas, llamadas “hipoantigénicas o hipoalergénicas”, no han demostrado, de forma convincente, su eficacia para la prevención de la sensibilización a proteínas de leche de vaca. Su uso está absolutamente contraindicado en el tratamiento de la APLV (García-Onieva, 2007). Desde mediados de la década de los 90, se fabrican fórmulas altamente hidrolizadas con el resto de componentes similares a las fórmulas adaptadas. En estas fórmulas, llamadas **extensivamente hidrolizadas** (FEH), la mayoría del nitrógeno está en forma de aminoácidos libres y péptidos de menos de 5.000 Da, aunque en general están por debajo de 1.200 Da (Maldonado-Lozano y Gil-Campos, 2005; Soler-Balda y San segundo-Nieto, 2006; García-Onieva, 2007). El resto de los principios inmediatos son similares a los de las fórmulas de inicio. Tienen las mismas indicaciones que las hidrolizadas, pudiendo ser de elección en los casos de APLV sin afectación del estado nutricional, que requeriría la utilización de dextrinomaltsa y MCT. También, se consideran adecuadas para la prevención de APLV. Se han detectado restos de proteínas lácteas asociados a la lactosa en las FEH; por lo que, estarían contraindicadas en pacientes altamente sensibilizados. La utilización de FH debe ser adecuadamente vigilada, ya que se han descrito repercusiones nutricionales en los lactantes tratados: deficiencia de vitaminas, baja absorción de calcio y desequilibrio en la composición de aminoácidos (García-Onieva, 2007).

Fórmulas de soja

Las fórmulas de soja son fórmulas de inicio y de continuación a base de proteína de soja en lugar de proteínas lácteas. Al ser fórmulas vegetales carecen de lactosa y contienen como carbohidrato dextrinomaltsa o polímeros de glucosa. Los lípidos son de origen vegetal ya que la grasa láctea podría contener restos de proteínas vacunas. Están suplementadas con metionina, carnitina y taurina hasta alcanzar los niveles de la leche materna (Soler-Balda y San segundo-Nieto, 2006), y con calcio, fósforo, zinc, cobre, hierro y magnesio, ya que su absorción es baja por la presencia de fitatos (Maldonado-Lozano y Gil-Campos, 2005; Cilleruelo-Pascual y Fernández-Fernández, 2006). Se recomiendan para la alimentación de lactantes con galactosemia, intolerancia a la lactosa e hijos de padres vegetarianos que no quieren utilizar proteína animal para la

alimentación de sus hijos; su uso en caso de reacciones adversas a la leche de vaca es más controvertido, debido al poder sensibilizante de la soja (Maldonado-Lozano y Gil-Campos, 2005).

Fórmulas elementales

La fórmula elemental es un alimento no alergénico. Estas fórmulas tienen modificados todos sus principios inmediatos, de manera que las proteínas se aportan como L-aminoácidos sintéticos, los hidratos de carbono como polímeros de glucosa y las grasas en forma de MCT con adición de ácidos grasos esenciales. Además, están suplementadas con vitaminas y oligoelementos como las fórmulas hidrolizadas. Debido a su formulación, la absorción de los nutrientes se realiza con una mínima digestión y no precisa de la acción de las enzimas pancreáticas y mínimamente de las sales biliares, lo que permite mantener cierto grado de reposo intestinal y disminución del volumen fecal (Cilleruelo-Pascual y Fernandez-Fernandez, 2006). Están indicadas en casos de problemas de absorción y digestión, en insuficiencia pancreática, síndrome de intestino corto, enfermedad inflamatoria intestinal y diarrea “intratable” resistente a los tratamientos habituales (Soler-Balda y San segundo-Nieto, 2006). Los problemas más importantes en el manejo de estas leches son su mal sabor, su alta osmolaridad y su elevado coste, lo que hace que sus indicaciones sean bastante restringidas. Se han descrito con su uso déficits vitamínicos (biotina), atrofia intestinal y gástrica así como alteraciones de la microflora colónica (Tamayo y col., 1997; Ballabriga y col., 2001; Martín y col., 1998; Host y col., 1999; American Academy of Pediatrics, 2000). La falta de estudios a largo plazo que evalúen la absorción de aminoácidos, vitaminas y minerales, limitan su utilización a aquellos pacientes en los que otras fórmulas han fracasado y en los casos de malnutrición grave (García-Onieva, 2007).

Fórmulas para prematuros

La alimentación del lactante prematuro tiene como objetivo conseguir un crecimiento y composición corporal similares al de un feto sano de la misma edad gestacional. La leche materna será siempre de elección; ya que, las leches de madres de prematuros son más ricas en nutrientes que las de los nacidos a término. Sin embargo, estas leches son deficitarias en proteínas, calcio, fósforo, sodio y vitaminas A, D y riboflavina. Cuando la lactancia materna no es posible, se pueden utilizar fórmulas para prematuros que, en general, tienen mayor densidad calórica con ingestas más pequeñas y mayor aporte proteico, añadiendo taurina, carnitina y nucleótidos. Los hidratos de carbono serán, fundamentalmente, lactosa, aunque ésta debe sustituirse, en parte, por polímeros de glucosa debido a la deficiencia relativa de lactasa. La cantidad de grasas es, asimismo, más elevada, añadiéndose MCT, que se absorben mejor, y se recomienda incorporar DHA y ácido araquidónico. Se precisa aumentar el contenido en Ca y P para una mejor mineralización ósea, siendo el cociente Ca/P de 1,7. Las concentraciones de los componentes de este tipo de fórmulas se recogen en la tabla I.1.4-1. Estas fórmulas deben mantenerse hasta el momento del alta y prolongar su uso en niños con displasia broncopulmonar, cardiopatía congénita o percentil de peso por debajo del P3 (García-Onieva, 2007).

Tabla I.1.4-1: Composición de fórmulas para prematuros.

Energía 67-94 kcal/100 ml (para una ingesta de 100-135 kcal/kg/día)
Proteínas 2,5-3,6 g/100 kcal (2,8-4,9 g/kg/día)
Hidratos de carbono 9,6-12,5 g/100 kcal
Grasas 4,4-5,7 g/100 kcal
Calcio 123-185 mg/100 kcal
Fósforo 82-109 mg/100 kcal

I.1.4. Aspectos tecnológicos

En este apartado se tratan los aspectos tecnológicos relacionados con la obtención de los ingredientes que ocupan nuestro trabajo de investigación (proteínas, carbohidratos y grasa).

Proteínas

Las proteínas utilizadas en la elaboración de las FI son principalmente de origen lácteo (caseína, caseínatos, proteínas de lactosuero, proteínas hidrolizadas) y proteínas de soja.

Estas proteínas sufren durante su proceso de obtención, tratamientos térmicos más o menos drásticos.

El **lactosuero** (obtenido como subproducto en la elaboración del queso) se utiliza para la obtención de proteínas y lactosa. El proceso de obtención de las proteínas incluye etapas de clarificación, evaporación, desmineralización y secado por atomización o bien etapas de clarificación, ultrafiltración y secado (Rolland, 1991).

Las **caseínas** se obtienen por precipitación ácida de leche desnatada y posterior secado. Los **caseínatos** a partir de las caseínas mediante tratamientos con álcali diluido y posterior secado (Mahaut y col., 2004). Los **aislados de soja** se obtienen de harinas de

soja desgrasada, por tratamientos alcalinos se separan los polisacáridos de las proteínas y posteriormente se precipitan con tratamiento ácido (Primo-Yúfera, 1998). Estas proteínas al igual que las caseínas pueden sufrir una etapa de secado o un tratamiento alcalino anterior para obtener las correspondientes sales. Los **hidrolizados** se obtienen sometiendo a las proteínas aisladas, a un tratamiento preliminar con calor que modifica los epitopos conformacionales (localizados en la superficie de la proteína) y facilita su posterior tratamiento enzimático mediante pepsina, tripsina o extractos pancreáticos que permiten la hidrólisis de los epitopos secuenciales (ocultos en el interior de la proteína nativa). Finalmente, se realiza un proceso de ultrafiltración donde se eliminan las proteínas y los péptidos de alto peso molecular y los enzimas utilizados en la hidrólisis (Cilleruelo-Pascual y Fernandez-Fernandez, 2006).

Carbohidratos

Los carbohidratos más utilizados en la elaboración de FI, son lactosa, maltodextrinas y sacarosa.

La lactosa y la sacarosa se obtienen a partir de la leche y remolacha respectivamente, mientras que las maltodextrinas proceden del almidón, el cual es transformado mediante diferentes procesos industriales.

La **lactosa** se obtiene del suero de quesería, que previamente ha sido higienizado, desnatado, pasteurizado y enfriado. El suero es sometido a una etapa de ultrafiltración separando el concentrado de proteínas de suero del permeado de suero, el cual es refinado y concentrado por evaporación, obteniéndose finalmente por cristalización y secado por atomización (Mahaut y col., 2004). La obtención de **sacarosa** a partir de la remolacha, se realiza por difusión en agua caliente. Una vez obtenido el jugo purificado se procede a la evaporación y posterior cristalización por cocción en vacío del jarabe (Fellows, 1994).

Las **maltodextrinas** se obtienen a partir de la hidrólisis del almidón y constituyen una de las fuentes de carbohidratos más utilizada para la elaboración de las fórmulas enterales e infantiles. Presentan gran viscosidad, solubilidad y dispersión (Marchal y col., 1999) pero son menos dulces, higroscópicas y susceptibles de sufrir pardeamiento que otros productos procedentes de la hidrólisis del almidón (BeMiller, 1992). Además, poseen bajo valor de dextrosa equivalente (DE) (menor de 20), pequeño peso molecular y baja presión osmótica (Linden y Lorient, 1994).

Existen dos procedimientos de hidrólisis para la obtención de maltodextrinas:

1. Ácida: se realiza en tanques discontinuos donde el pH se ajusta a 1,8-2,0 con HCl y se aplican altas temperaturas hasta conseguir el DE deseado. Este tipo de hidrólisis presenta la ventaja de ser rápida y completa, pero produce defectos de color, sabor y alta concentración de NaCl, lo que es un gran inconveniente en la preparación de alimentos infantiles y dietéticos (González-Tello y col., 1989).

2. Enzimática: este método sólo requiere unos minutos de reacción a 105°C seguidos de una descompresión hasta presión atmosférica e hidrólisis a 90-95°C durante 2 horas. Esta hidrólisis se consigue con α -amilasas que hidrolizan al azar los enlaces α 1-4 (Avendaño y Cornejo, 1988). De esta forma se producen primero oligosacáridos (de

2-7 unidades de glucosa) ramificados o lineales (maltodextrinas) y posteriormente maltosa y glucosa.

Los diversos productos de hidrólisis vienen caracterizados por el **índice de dextrosa** (DE) que se define como el porcentaje de azúcares reductores presente en el jarabe en relación con la cantidad de oligosacáridos de forma que a mayor DE mayor poder reductor y menor grado de polimerización (Linden y Lorient, 1994). Esta definición presenta limitaciones, ya que según el procedimiento tecnológico utilizado los productos de hidrólisis pueden tener composiciones muy diferentes teniendo globalmente el mismo DE.

Grasa

Las principales fuentes de grasa utilizadas en la elaboración de las fórmulas infantiles son los aceites vegetales (soja, coco, girasol, cártamo y oliva), grasas lácteas, aceite de pescado y grasas animales.

En el caso del aceite de **soja, girasol y cártamo**, la extracción se puede realizar por medios mecánicos o mediante disolventes. En ambos casos las semillas deben ser limpiadas y descascarilladas previamente. Después son troceadas y molidas antes de la extracción. En la *extracción mecánica* las semillas molidas y homogenizadas pasan a la prensa de tornillo donde a elevadas presiones y en un solo paso se produce la separación del aceite de la torta proteínica. En la *extracción por disolventes* las semillas molidas y homogenizadas pasan a un extractor donde un disolvente de materias grasas arrastra a estas siendo separadas en un evaporador (Madrid-Vicente y col., 1997).

El **aceite de oliva** es extraído previa limpieza de las aceitunas, molturación y batido. La masa homogénea pasa a una prensa o un decantador horizontal, en donde por centrifugación se separa el orujo, agua de vegetación y el aceite, que finalmente es purificado en centrifugas verticales donde se separa del agua y partículas sólidas restantes (Madrid-Vicente y col., 1997).

El **aceite de coco** es extraído por fusión. El coco molido se mezcla con agua caliente para formar una pasta que se bate hasta que el aceite se separa en forma de emulsión (Thieme, 1970)

La obtención de la **grasa láctea** se realiza en una desnatadora, que consiste en un tambor rotatorio en cuyo interior se dispone una serie de platillos. La leche se mantiene a una temperatura de 50 a 60°C y durante la centrifugación se produce la aglomeración de los glóbulos grasos al depositarse sobre los platillos, que forman un conducto por el que sale la nata separada de la leche desnatada (Mahaut y col., 2004).

Los **aceites de pescado** se obtienen por cocción, prensado del pescado y centrifugación (Schmidtsdorff, 1999).

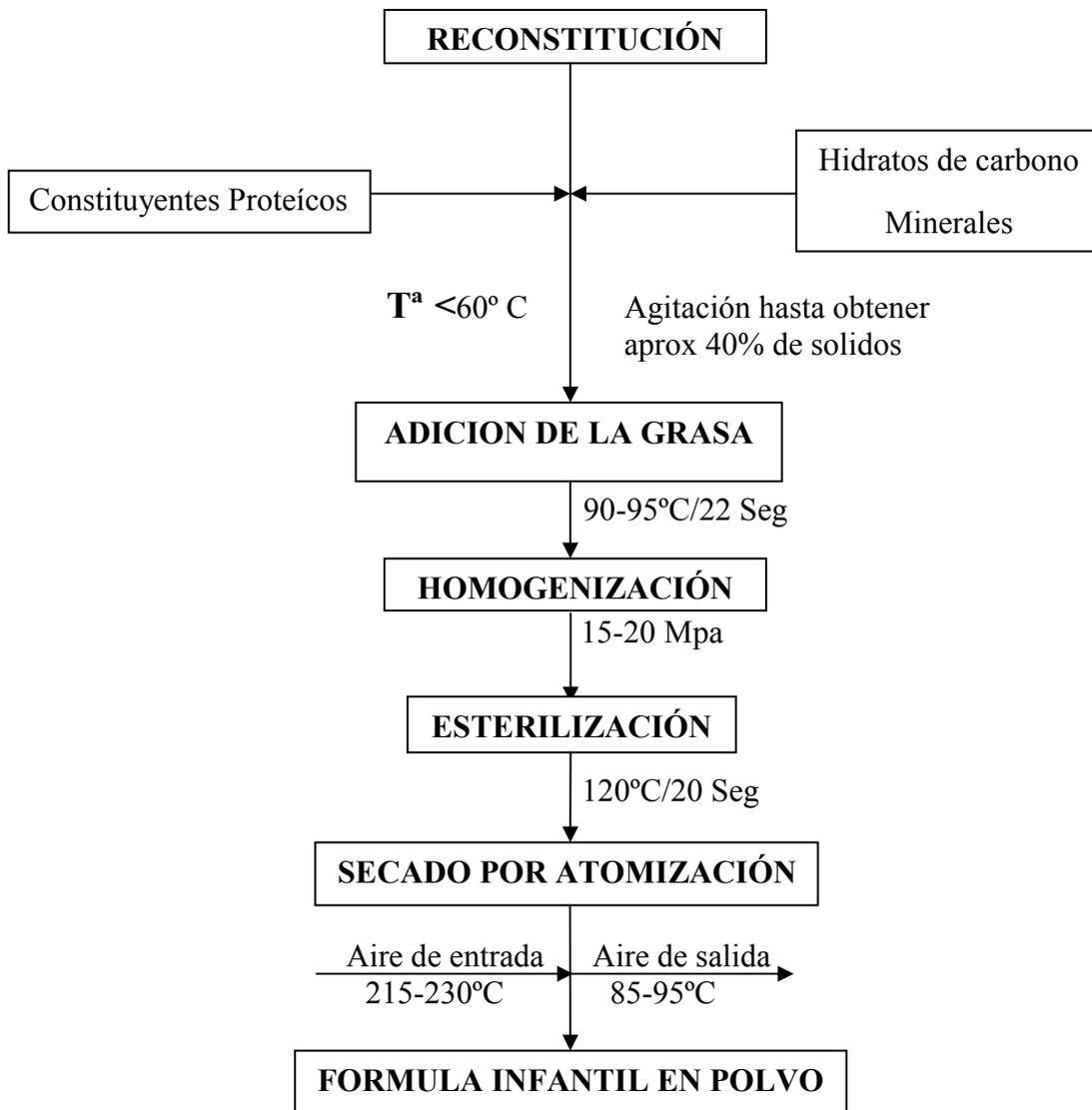
La **grasa animal** puede ser extraída mediante digestión o por fusión. En el primer caso los subproductos son introducidos en un digestor donde se somete a altas temperaturas (110-130°C) durante 2,5-4,5 horas para evaporar el agua, seguido de un tamizado (harina y grasa) y final separación por centrifugación o decantación. En la extracción por *fusión* los subproductos finamente troceados se calientan por inyección directa de vapor, obteniendo una masa la cual es separada por centrifugaciones

sucesivas, obteniendo tres fases: sólida, acuosa y la grasa purificada (0,1-0,2% de humedad) (Madrid-Vicente y col., 1997).

I.1.5. Elaboración de las fórmulas infantiles sólidas

Las fórmulas infantiles que existen actualmente en el comercio son productos sólidos que se obtienen a partir de leche y adición de ingredientes o mediante disolución y/o emulsión-mezcla de todos sus ingredientes en agua. En la figura 1 se puede observar el esquema de elaboración de las fórmulas sólidas.

Figura 1: Esquema de elaboración de fórmulas infantiles sólidas



El procedimiento de elaboración de fórmulas sigue una serie de pasos que a continuación se detallan.

A) Reconstitución y mezclado de los constituyentes: se basa en la disolución y emulsión de los distintos componentes de las fórmulas para elaborar un líquido que posea unas características adecuadas (Fellows, 1994).

Generalmente se dispersa cada sólido en un tanque con agua, se mezclan distintas proporciones de cada disolución, y se calienta para fluidificarlo.

En el caso de dispersión de materias primas pulverizadas (proteínas, carbohidratos, etc.) se utilizan mezcladoras de bajo tiempo de permanencia en las cuales un chorro de líquido nebulizado se mezcla uniformemente con un chorro de polvo.

B) Homogeneización: consiste en la reducción de tamaño e incremento del número de partículas sólidas o líquidas en la fase dispersa mediante la aplicación de grandes fuerzas de cizalla, con objeto de lograr un contacto íntimo entre los componentes, aumentar la estabilidad y producir su emulsión (Ordóñez y col., 1998).

El efecto homogeneizador se consigue haciendo pasar el producto a presión de 15-20 MPa a través de estrechas hendiduras cuyas medidas son menores que las de los glóbulos grasos. De esta forma, la elevada velocidad que alcanzan los glóbulos provoca la aparición de fuerzas de cizallamiento debido a la intensa turbulencia y cavitación. Así se provoca la deformación de las partículas y su fragmentación (Spreer, 1991).

Otro factor determinante es la temperatura a la que se realiza el proceso (60-75°C) ya que cuanto más bajo sea el contenido en grasa y más alta sea la temperatura y la presión, mayor será el efecto homogeneizador.

C) Esterilización: es aquella operación unitaria en la que los alimentos son calentados a una temperatura suficientemente elevada como para destruir en los mismos la actividad microbiana y enzimática (Fellows, 1994).

Para alimentos no envasados se realiza una esterilización mediante UHT que puede realizarse de forma directa (denominado “UHT directo”), en el que el calor se transmite por inyección de vapor de agua sobre el producto, o bien de forma indirecta (“UHT indirecto”), en el cual se utilizan unos intercambiadores de calor (de placas o de tubos) que son los que calientan o enfrían el producto (Rees y Bettison, 1994). En ambos casos la temperatura alcanzada es de 120-150°C encontrándose la diferencia en que en el caso del UHT directo el producto se calienta de forma más rápida (2-5 segundos) que en el indirecto (20 segundos) lo que conlleva una menor pérdida nutricional (Fellows, 1994).

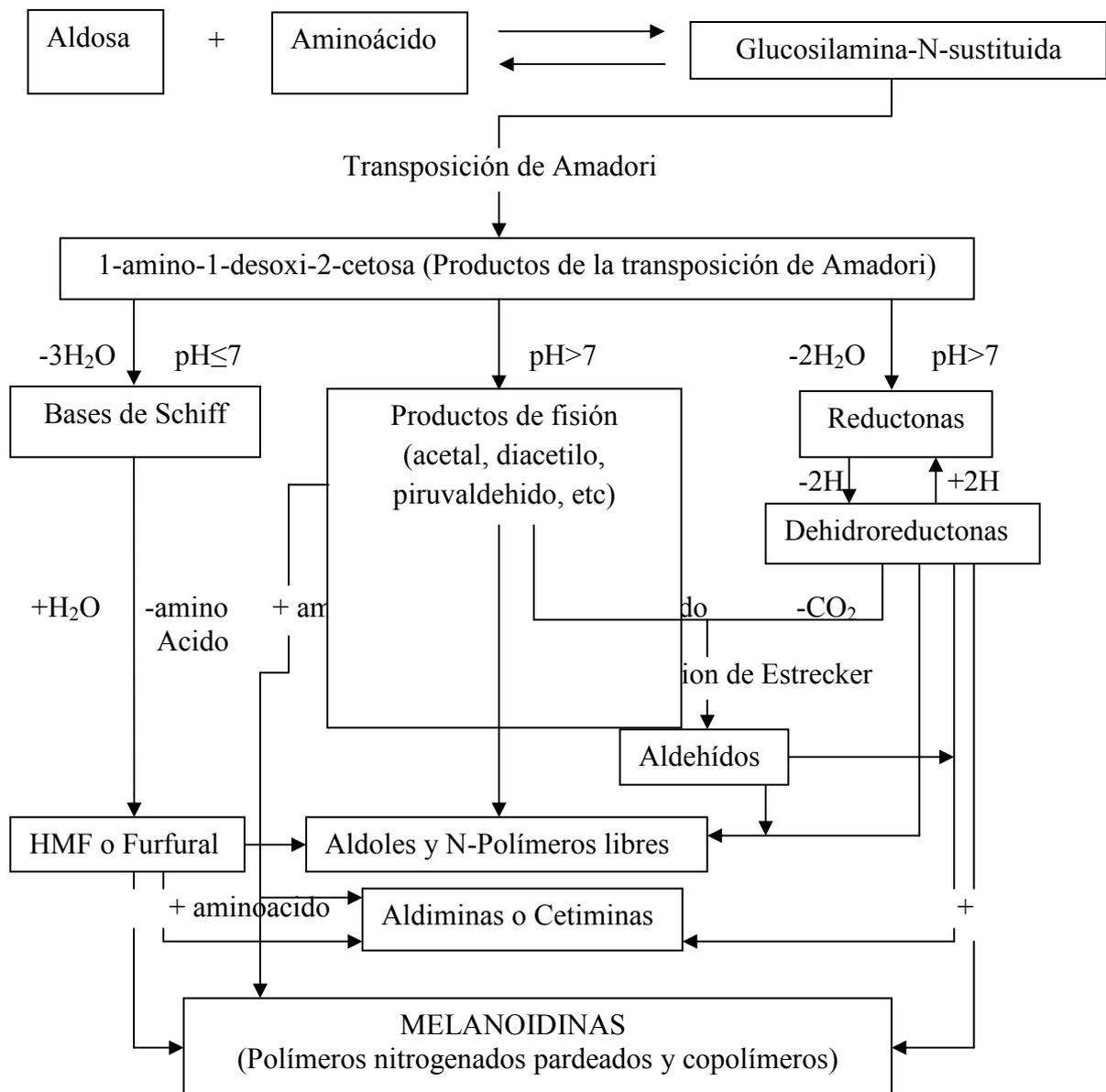
D) Secado por atomización: es una operación básica especialmente indicada para el secado de disoluciones y suspensiones. Se mezcla en cámara de secado leche pulverizada (concentrada) en gotitas (10-100 micras) con una corriente de aire caliente (150-220°C). El aire caliente cede calor a la leche, evaporando el agua y obteniendo la leche en polvo (Sharma y col., 2003).

I.2. REACCION DE MAILLARD

I.2.1. Química de la reacción de Maillard

La reacción de Maillard comprende un conjunto de reacciones en cadena que conducen a la formación de pigmentos pardos con modificaciones del color, olor y sabor de diversos alimentos. Se desarrolla generalmente a A_w bajas y pH básico, necesitando un aporte de calor moderado (Badui, 1981). Estas reacciones se denominan “*Reacción de Maillard*” debido a Louis Camille Maillard, que en 1912 describió la reacción entre la glicina y glucosa. En 1953 Hodge propuso un esquema (figura 2) considerado en la actualidad el más apropiado para describir esta reacción.

Figura 2: Reacción de Maillard (Hodge, 1953; Martins y col., 2001; Zhang y Zhang, 2007).



La etapa inicial de la reacción de Maillard comprende la condensación de un grupo carbonilo libre y un grupo amino, que tras deshidratación da lugar a una base de Schiff inestable que se transforma en la glicosilamina-N-sustituida. Esta reacción es reversible ya que en un medio fuertemente ácido se regenera el azúcar y el aminoácido. Las glicosilaminas son más estables cuando procedan de aminas aromáticas que de aminoácidos (Rosen y col., 1953; Pigman y Johnson, 1953; Finot y Magnenat, 1981).

El siguiente paso supone la inmediata reorganización irreversible de la glicosilamina-N-sustituida. Cuando se parte de una aldósilamina-N-sustituida, mediante la **transposición de Amadori**, se genera 1-amino-1-desoxi-2-cetosa, mientras que cuando se parte de una cetósilamina-N-sustituida, mediante la **transposición de Heyns** se genera 2-amino-2-desoxialdosa. Los compuestos de Amadori (Mauron, 1981) y de Heyns (McPherson y col., 1988) han sido encontrados en diversos alimentos y en el organismo humano.

La importancia de la transposición de Amadori para la producción de colores pardos, fue demostrada por Hodge y Rist (1953). Con estos conocimientos se pudo controlar las reacciones de pardeamiento en alimentos desecados.

Los compuestos de Amadori y de Heyns sufren una serie de descomposiciones que varían en función del pH o de la temperatura del medio. Estas reacciones comprenden las etapas intermedias de la reacción de Maillard y dan lugar a compuestos con color y olor.

A pH bajos ($\text{pH} \leq 7$) se produce una **enolización en posición 1,2** que origina compuestos dicarbonílicos (potentes precursores del pardeamiento) que dan lugar a 5-hidroximetilfurfural (HMF) cuando el carbohidrato implicado es una hexosa o furfural cuando es una pentosa (Moye y Krzeminski, 1963). Por el contrario, a pH básicos ($\text{pH} \geq 7$) se produce una **enolización en posición 2,3** que da lugar a reductonas (Cheftel y Cheftel, 1980) las cuales pueden deshidrogenarse para generar dehidroreductonas y estas a su vez en etapas más avanzadas pueden reaccionar con grupos amino y polimerizar.

Los compuestos de Amadori pueden escindirse dando lugar a diversos productos de fisión (compuestos dicarbonílicos) como el acetal o el diacetaldehído (Nursten, 1989).

La interacción de aminoácidos con los compuestos dicarbonílicos, ya sean dehidroreductonas o productos de fisión, se conoce como **degradación de Strecker** y supone la pérdida de aminoácidos del alimento (Cheftel y Cheftel, 1980). Como resultado de esta degradación se formarán nuevos aldehídos con un carbono menos que se elimina como CO_2 (Stadman y col., 1952).

Las etapas finales de la reacción de Maillard son complejas y dan lugar a dos tipos de compuestos: melanoidinas y compuestos aromáticos volátiles.

Los compuestos aromáticos volátiles de bajo peso molecular se producen sin la intervención de grupos amino a través de compuestos de Amadori, pero también puede realizarse sin formar estos compuestos (Guangyuan y col., 1997) a partir de la reacción de 2-desoxiglucosa con aminoácidos, lo cual aporta un 1% de dichos compuestos.

Cientos de productos volátiles de la reacción de Maillard han sido identificados en alimentos y sistemas modelo (Ferretti y Flanagan, 1971, 1972; Hayase y col., 1982; Millic y Piletic, 1984; Danehy, 1986) y pueden ser clasificados en tres grupos (Nursten, 1980):

- *Compuestos simples* generados a partir de la deshidratación de azúcares y/o productos de fragmentación: furanonas, pironas, ciclopentenos, carbonilos y ácidos.

- *Compuestos complejos*: productos de degradación de aminoácidos, aldehídos y compuestos azufrados.

- *Compuestos volátiles* producidos por nuevas reacciones: pirroles, piridinas, imidazoles, pirazinas, oxazoles, tiazoles, y productos de condensación de aldol.

Las melanoidinas son polímeros nitrogenados pardos y copolímeros producidos mediante la condensación de compuestos aminados procedentes de las etapas intermedias de la reacción de Maillard (O'Reilly, 1982) como son pirroles N-sustituídos, 2-formilpirroles N-sustituídos y 2-furaldehído (Tressl y col., 1998; Martins y col., 2001). Las melanoidinas varían ampliamente en peso molecular y poseen rasgos distintivos en la región visible del espectro (Richards, 1956; Clark y Tannenbaum, 1970).

I.2.1.1. Variables y prevención de la reacción de Maillard

Sustratos

Los sustratos que intervienen en la reacción de Maillard son el grupo carbonilo, principalmente de azúcares reductores, y el grupo amino de aminoácidos y proteínas. Grupos carbonilo procedentes de la oxidación de grasas y de procesos de fermentación y grupos amino de distinto origen al anterior también contribuyen, aunque en menor medida.

Aunque la reacción de Maillard es una reacción isomolecular entre un azúcar y un aminoácido, la pérdida del primero siempre es mayor que la del segundo, debido a que coexisten otras reacciones como la caramelización (Adrian, 1982).

Los **carbohidratos** de bajo peso molecular son más reactivos que los de alto peso molecular debido al menor impedimento estérico (Stepanenko y Serbyuk, 1950; Rubenthaler y col., 1963). Así, concentraciones estandarizadas de azúcares producen pérdidas de lisina próximas al 16% para los disacáridos, 42% para las hexosas y 60% para las pentosas. La reactividad de los azúcares es proporcional a la cantidad de forma abierta (Burton y McWeeny, 1963). En los isómeros, la configuración estereoquímica determina su reactividad. De forma general, el grado de pardeamiento en los azúcares decrece en el siguiente orden: (1) pentosas, ribosa > xilosa > arabinosa; (2) hexosas: (galactosa > manosa, glucosa > fructosa); (3) disacáridos (maltosa > lactosa).

Hay que tener en cuenta que el azúcar no tiene un grado de reactividad absoluta y su comportamiento depende también del estado y naturaleza de las proteínas con las que reacciona. Así, la rafinosa destruye 6 veces más lisina de la lactoalbúmina que de la

globulina, aunque pentosas y hexosas presentan una reactividad similar en ambas proteínas (Overby y Frost, 1952; Frangne y Adrian, 1972a).

Cuando el pardeamiento de Maillard no es deseado puede prevenirse eliminando uno de los sustratos, normalmente el azúcar

Otras moléculas con grupos carbonilo (Montgomery y Day, 1965; Pokorny, 1981) como las formadas por degradación de Strecker (formaldehído, acetal, propional) o las producidas durante la degradación de los compuestos de Amadori (furfural e hidroximetilfurfural) (Obretenov y col., 1983) pueden reaccionar con los grupos amino e iniciar otra vez la reacción. Cuando un alimento contiene productos de estas clases la reacción de Maillard puede producirse sin el concurso de los azúcares, como ocurre en el queso o en las frutas y zumos de fruta (Clegg, 1964).

Todas las **proteínas**, excepto las insolubles (queratina) son susceptibles de reaccionar con los azúcares. Los α -aminoácidos, que forman junto al grupo carbonilo el enlace peptídico, son poco accesibles durante los tratamientos por calor, al contrario que los α -aminoácidos terminales y los que tienen un segundo grupo amino en estado libre (lisina). En la caseína, la cantidad de grupos ϵ -amino libre es 50 veces mayor que la cantidad del grupo α -amino libre, por lo que la pérdida de lisina a través del grupo ϵ es la consecuencia nutricional más grave. Cuando una mezcla de caseína y glucosa se calienta, la destrucción de histidina alcanza el 17%, la arginina el 22% y la lisina el 46% (Erbersdobler y col., 1968; Brown y col., 1973).

La intensidad de pardeamiento es proporcional a la concentración de lisina en los alimentos proteicos. Así, las proteínas lácteas producen una mayor velocidad de pardeamiento que las proteínas de soja (Hackler y Stillings, 1967; Wolf y col., 1977) y estas mayor que las de los cereales (Frangne y Adrian, 1972a). La destrucción de lisina en productos lácteos es más rápida cuando la lactosa es hidrolizada o sustituida por glucosa; en este caso se puede llegar a una destrucción de hasta un 50% según el procedimiento utilizado para la obtención de leche en polvo (Burvall y col., 1978; Finot y col., 1981).

Los **aminoácidos básicos libres** no reaccionan con los azúcares a una velocidad marcadamente superior al resto de aminoácidos, sino que es la configuración estereoquímica la que determina su comportamiento. Así, los porcentajes de pérdida de los aminoácidos fenilalanina, metionina, lisina, isoleucina, treonina y valina fueron 57%, 62%, 69%, 73%, 78% y 80% respectivamente cuando se calentaron con glucosa a 120°C (Adrian, 1963). Por otra parte la presencia de aminoácidos libres condiciona el desarrollo de la reacción de Maillard entre lisina y azúcar; la valina acelera la velocidad de la reacción entre lisina-azúcar mientras que la arginina la disminuye.

Ashoor y Zent (1984) establecieron en sus ensayos una clasificación de los aminoácidos en función del grado de pardeamiento:

- Aminoácidos productores de alto grado de pardeamiento: lisina, glicina, triptófano y tirosina.

- Aminoácidos productores de un grado medio de pardeamiento: prolina, leucina, isoleucina, alanina, hidroxiprolina, fenilalanina, metionina, valina, ácido glutámico y asparragina.

- Aminoácidos productores de un grado bajo de pardeamiento: histidina, treonina, ácido aspártico, arginina, ácido glutámico y cisteína.

Sin embargo, otros autores (Wolfrom y Rooney, 1953) estudiaron este mismo efecto en un sistema glucosa-mezcla de aminoácidos y encontraron que la mayor intensidad y velocidad de coloración se obtenía con la arginina y el ácido 4-aminobutírico, seguidos de glicina, alanina, serina y prolina.

La **mezcla de proteínas completas y aminoácidos libres** produce una mayor pérdida nutricional; a la pérdida de lisina en proteínas intactas hay que unir la de los otros aminoácidos (Adrian y Frangne, 1973).

En cuanto a la prevención, la transformación del grupo amino en amido mediante las transglutaminasas impide la 1ª etapa de la reacción (Friedman, 1978; Friedman y Finot, 1990).

En alimentos, una mayor proporción de azúcares reductores respecto a grupos amino acelera el pardeamiento. Esto puede ser debido a diferentes mecanismos de destrucción de azúcares y aminoácidos. Jokinen y col. (1976) observaron en un sistema compuesto por proteína de soja/glucosa calentado a 130°C que la pérdida de glucosa seguía una cinética de primer orden, mientras que para la destrucción de lisina era de orden cero. El pardeamiento en sistemas modelo aminoácido/azúcar también es máximo cuando los azúcares están en exceso. Dworschak y Orsi (1977) comprobaron que la proporción molar óptima en un sistema metionina/glucosa era de 2:3.

El efecto que sobre el pardeamiento ejerce la concentración de azúcares reductores depende, así mismo, de la temperatura de reacción. Wolf y col. (1977) en un sistema modelo similar al anterior, demostraron que un tratamiento térmico de 80°C a 130°C supone un incremento de la reacción de 5 a 25 veces respectivamente cuando la concentración de glucosa es 10 veces la del aminoácido.

pH

El pH inicial de los productos y la capacidad tampón del sistema influyen en el tipo e intensidad de las reacciones (Ellis, 1959; Nursten, 1980). Los efectos del pH son complejos, ya que cada una de las etapas de pardeamiento tiene un pH óptimo: a pH < 3 el pardeamiento es bajo y se incrementa conforme aumenta el pH hasta un máximo de 10 (Ashoor y Zent, 1984). En todos los casos, el avance de la reacción de Maillard supone un descenso del pH debido a la desaparición de aminoácidos básicos.

La reactividad del grupo amino es mayor cuando el aminoácido está en forma aniónica y este valor depende del carácter ácido-base del aminoácido. En aminoácidos ácidos (ácido aspártico y glutámico) la forma aniónica se produce a pH=3, pero en aminoácidos básicos (lisina y arginina) se necesita un pH de 10 (Song y Chichester, 1967; Powell y Spark, 1971). A pH mayor de 10, el descenso de protones necesario para

la catálisis de la reestructuración de Amadori y Heyns, puede ser la causa del descenso de esta reacción (Carson, 1955; Isbell y Frush, 1958).

Si estudiamos el efecto del pH en los alimentos, podemos distinguir:

a) *Alimentos cuyo pH está comprendido entre 6 y 8* (leche, huevos, cereales, carnes) en los que las condiciones son favorables a la reacción de Maillard. Un descenso del pH permite atenuar el pardeamiento durante la deshidratación, pero modifica desfavorablemente los caracteres organolépticos.

b) *Alimentos cuyo pH está comprendido entre 2,5 y 3,5* (zumos y concentrados de frutas). Estos productos son pobres en aminoácidos y la reacción de Maillard aparece de forma muy débil. Es la degradación del ácido ascórbico, así como la caramelización de los azúcares, la responsable del pardeamiento. Estas reacciones están catalizadas por el ácido cítrico y algunos aminoácidos presentes.

c) *Alimentos de pH intermedio* (conservas vegetales, alimentos fermentados, miel, salsas, sopas) en los que puede ocurrir simultáneamente la reacción de Maillard y la degradación del ácido ascórbico.

Actividad de agua

La intensidad de la reacción de Maillard depende de la hidratación del medio. La máxima actividad se logra a humedad relativa del 50 y 70% (10-15% de agua en el producto). Jokinen y col. (1976) estudiaron la pérdida de lisina en sistemas modelo con proteínas de soja y encontraron que para una A_w de 0,67 a 0,70 la descomposición era máxima. A niveles de humedad más altos se produce una disminución de la velocidad y se considera que no existe en ausencia de agua.

Esta cinética se explica de la siguiente forma: con un contenido en agua muy bajo está frenada la difusión de especies químicas entre sí; la adición o aumento del agua facilitan la difusión de los reactantes (Schwart y Lea, 1952; Wolfrom y Rooney, 1953; Labuza y col., 1970) y aumenta la velocidad de pardeamiento. Sin embargo, con cantidades superiores de agua, las concentraciones de sustancias reactivas en solución disminuyen y se reduce, de acuerdo con la ley de acción de masas, la velocidad de la reacción (Eichner y Karel, 1972). En sistemas con una humedad pequeña o nula la reacción de Maillard podría proseguir por el agua que aparece en las deshidrataciones de las primeras etapas de la reacción (Adrian, 1982).

El estado fisicoquímico en sistemas de alimentos puede también afectar a la reacción de Maillard. La isoterma de sorción dependerá de si el sistema es cristalino o amorfo y de otros factores tales como el porcentaje en grasa (O'Brien y Morrisey, 1989). A bajas A_w un sistema de alimentos amorfo absorbe más agua en el espacio que hay entre las moléculas, mientras que en un sistema cristalino, la absorción del agua sólo puede darse en la superficie del entramado del cristal. En alimentos desecados como la leche en polvo, un cambio del estado amorfo al cristalino ocurre a valores de $A_w = 0,6$ a $0,7$ (O'Brien y Morrisey, 1989). La fase amorfa absorbe agua hasta que las moléculas adquieren suficiente movilidad y espacio para formar el entramado del cristal. Como la cristalización se ha iniciado, el agua es expulsada y puede quedar atrapada en áreas localizadas del alimento (Erbersdobler, 1971). Este agua está entonces

disponible para la interacción con otros componentes y afectará al grado de la reacción de Maillard, a no ser que se evapore (Erbersdobler y Zucker, 1966).

Por lo general, es durante la deshidratación cuando los riesgos de pardeamiento son mayores y en especial en la fase del proceso en que el contenido en agua es inferior al 20% y la temperatura es elevada. Tratamientos a temperaturas más bajas presentan el inconveniente de alargar el proceso de deshidratación y el alimento permanece más tiempo con un contenido crítico de agua.

Temperatura

La reacción de Maillard se produce tanto a temperatura ambiente (conservación de numerosos productos) como a altas temperaturas (esterilización). La energía de activación tiene valores que se encuentran entre 10-160kJ/mol; dependiendo de esta energía se favorecen unas etapas de la reacción frente a otras.

Si se correlaciona la temperatura con la pérdida de grupos amino se obtienen pérdidas equivalentes en un tratamiento corto a intensidad alta o en un calentamiento débil durante un periodo largo. Así, en una mezcla de β -lactoalbúmina y lactosa se observa la misma pérdida después de calentar 4 horas a 96°C que después de 4 días a 55°C (Freimuth y Trübsbach, 1969).

La temperatura que se alcanza en el medio proporciona una determinada energía de activación y marca el camino a seguir por las reacciones; el desarrollo de la reacción de Strecker, medido por la producción de CO₂, es independiente del color; a 56°C la reacción de Maillard produce un fuerte color marrón con una débil emisión de CO₂, pero a 100°C ocurre justo a la inversa; para la misma coloración, la producción de CO₂ es aproximadamente 5 veces mayor que a 56°C.

Por tanto diferentes aminoácidos con un mismo azúcar producirán diferentes aromas para una misma y distinta temperatura (Mabrouk, 1979), como se observa en el siguiente esquema:

Aminoácido	100°C	120°C	180°C
Leucina	Chocolate dulce	Corteza de pan	Queso quemado
Treonina	Chocolate	Trigo	Quemado
Valina	Pan de centeno	Corteza de pan	Chocolate-penetrante

Debido a las fuertes energías de activación de algunas de las reacciones de pardeamiento, no deben someterse los alimentos a tratamientos térmicos demasiado energéticos y además hay que conseguir que el almacenamiento sea a una temperatura moderada para minimizar el avance de la reacción de Maillard.

Compuestos aceleradores/inhibidores

La presencia o ausencia de cationes metálicos afecta a la reacción de Maillard. Las sales de cobre e hierro aceleran la reacción mientras que el manganeso y estaño la inhibe (Bohart y Carson, 1955; Kato y col., 1981; Alais y Linden, 1990). El hierro es considerado como catalizador del pardeamiento en la salsa de soja y también como constituyente de cromóforos melanoidínicos (Hashiba y col., 1981). Hay que hacer notar que los primeros estudios atribuyen efectos a los cationes metálicos debidos al descenso del pH que se produce en su incorporación al sistema (Powell y Spark, 1971). La influencia de los iones sobre la reacción depende de la concentración y del pH del sistema (Rendleman y Inglett, 1990). Ellis (1959) admitió que elementos como cobre, hierro y zinc inhibían el pardeamiento a pH ácido y que el cobalto sólo aceleraba la reacción en soluciones ácidas, pero no lo hacía en soluciones neutras.

Los compuestos carbonilos procedentes de los lípidos oxidados, son también capaces de reaccionar con los grupos amino favoreciendo el desarrollo de la reacción de Maillard (Zamora y Hidalgo, 1995; Seiquer y Navarro, 2003). Cuando los lípidos participan en la reacción, es posible que la presencia de *vitamina E*, debido a su carácter antioxidante reduzca la velocidad (Hermosin y col., 1992).

Compuestos como el etilmalonato, fenilacetona, sales de aminas terciarias, ácido acético y trifluoruro de boro catalizan la reacción de Maillard y la transposición de Amadori (Yoshimura y col., 1969).

La adición de ácido glutámico o aspártico en sistemas modelo con lisina/hexosa a pH constante, produce una disminución del pardeamiento (Nafisi y Markakis, 1983). Estos efectos pueden ser asociados a la estabilidad de los compuestos de Amadori formados con el ácido glutámico o aspártico, ya que se ha demostrado que el pardeamiento aparece más lentamente que con otros compuestos de Amadori (Eichner y Ciner-Doruk, 1981).

La presencia o ausencia de oxígeno no debería afectar a la reacción de Maillard. La intensidad de pardeamiento a veces varía con la atmósfera. El oxígeno tiende a incrementar la coloración (Webb, 1935; Volgunov y Pokhno, 1950; Kraft y Morgan, 1952) sin embargo este pardeamiento depende de factores más complejos, en los cuales, puede no darse la reacción de Maillard (Bohart y Carson, 1955). No obstante durante la conservación de cereales infantiles se observó un ligero incremento de los indicadores de pardeamiento, furosina, HMF y color, en los conservados en atmósfera de nitrógeno que en los conservados en atmósfera de oxígeno (Ramirez-Jimenez y col., 2003 y 2004d).

Los compuestos químicos más utilizados para la inhibición del pardeamiento son los sulfitos, que reaccionan con los compuestos carbonilos, bases de Schiff y compuestos carbonilos no saturados para dar sulfonatos muy estables. Los sulfitos fijan así los productos intermedios más reactivos del pardeamiento no enzimático, con lo que alargan el período de inducción y retardan mucho la aparición de pigmentos. Algunas veces, cuando desaparecen los sulfitos libres, se reinicia el proceso de pardeamiento.

Friedman y Molnar-Perl (1990a) realizaron un estudio sobre la posible inhibición o minimización de la reacción de Maillard, producida por aminoácidos

azufrados. Trataron a diferentes temperaturas y concentraciones mezclas de glucosa y β -alanina, N-acetil-L-lisina, glicilglicina y una mezcla de aminoácidos, en ausencia y presencia de los siguientes inhibidores potenciales: N-acetil-L-cisteína, L-cisteína, glutatión reducido, bisulfito sódico y urea. Los resultados indicaron que los compuestos que contienen grupos SH, tales como la cisteína, L-acetil-L-cisteína y glutatión reducido son casi tan efectivos en la prevención de la reacción de Maillard en mezclas calentadas de aminoácidos y glucosa, como el bisulfito de sodio. La urea es menos eficaz pero puede tener un importante papel en productos para alimentación animal por ser una importante fuente de nitrógeno para rumiantes como ovejas y vacas (Friedman y col., 1982).

Los sucesivos trabajos de Friedman y Molnar-Perl (1990a y b) han demostrado que los aminoácidos azufrados pueden prevenir el pardeamiento en varios productos alimenticios. En zumos frescos, zumos de frutas comerciales y alimentos proteicos, la N-acetil-L-cisteína tiene la misma eficacia que el bisulfito de sodio (Friedman y Molnar-Perl, 1990b).

I.2.1.2. Consecuencias nutricionales de la reacción de Maillard

Pérdida de aminoácidos esenciales

La reacción de Maillard reduce el valor nutritivo de los alimentos al disminuir la disponibilidad biológica de los aminoácidos esenciales (O'Brien y Morrissey, 1989). Esta reducción se produce aunque no se observen cambios en el color y aroma de los alimentos (Mauron, 1981) y se debe a la destrucción de aminoácidos mediante la reacción de Maillard. La lisina es el aminoácido más afectado de la reacción de Maillard; no obstante, el tratamiento térmico de los alimentos produce pérdida de otros aminoácidos esenciales como aminoácidos azufrados (Adrian, 1982; Bjorck y col., 1983), triptófano (Bjorck y col., 1983) e histidina (Lee y col., 1982).

La base de Schiff formada en la primera etapa de la reacción deja nutricionalmente disponible al aminoácido (Finot y Mauron, 1972; Finot y col., 1978; Finot y Magnenat, 1981); no sucede lo mismo con el compuesto de Amadori. Finot (1990) demostró que sólo un 5-15% de la N- ϵ -fructosa-lisina administrada a animales de experimentación es utilizada como fuente de aminoácido. Erbersdobler y col. (1989 y 1991) observan que el 90% de la N- ϵ -fructosa-lisina administrada oralmente a 42 personas voluntarias en forma de caseína glicosilada no se encontraba en orina ni en heces, e indica que puede ser metabolizada por la microflora intestinal.

Un nivel bajo de aminoácidos (< 0,5%) pueden ser generados "in vivo" a partir de los compuestos de Amadori (Sgarbieri y col., 1973; Finot y col., 1978; Finot y Magnenat, 1981; Perkins y col., 1981). La microbiota intestinal puede ser la responsable de la regeneración de estos aminoácidos (Finot y Magnenat, 1981).

La pérdida nutricional del alimento depende del tipo de proteína, carbohidrato, severidad del tratamiento y binomio tiempo/temperatura. Estudios en ratas alimentadas con diferentes tipos de proteína y combinadas con un 10% de carbohidratos tratados en autoclave (Knipfel y col., 1975) muestran que:

a) El peso ganado por ratas alimentadas con proteínas de huevo, independientemente del carbohidrato, es menor que el de las ratas alimentadas con proteínas de leche y soja y la utilización proteica neta de la caseína es mayor que la obtenida con proteínas de huevo y soja.

b) La digestibilidad de la proteína de huevo es menor que la de soja y leche.

c) La presencia de glucosa o fructosa reduce el valor nutritivo en una proporción mayor que cuando el tratamiento se realiza sólo con proteína. La celulosa y el almidón tienen poco efecto sobre el valor nutricional.

La suplementación de alimentos tratados térmicamente con aminoácidos de síntesis no restituye el valor nutricional inicial del alimento. Rao y col. (1963) demostraron que cuando la caseína se calentaba con glucosa el coeficiente de eficacia proteica (CEP) pasaba de 2,6 a 0,7 y cuando se adicionaba lisina y metionina se elevaba a 2,2; resultados similares se obtienen en leche en polvo.

La digestibilidad del nitrógeno y la liberación “in vitro” de aminoácidos por hidrólisis enzimática es menor que el porcentaje de pérdida o bloqueo de lisina. Una destrucción de un 52% de lisina y un 2% de metionina se produce cuando se calienta soja a 120°C durante 4 horas y sin embargo la proteólisis de estas muestras indica que la digestibilidad se reduce en un 72% para la lisina y 42% para la metionina (Riesen y col., 1947).

La fracción de aminoácidos útiles “in vitro” es siempre mayor que el CEP. Pérdidas de un 15% de lisina y 35% de metionina en carnes muestran una disminución de un 50% en la utilización proteica neta (Donoso y col., 1962). Además, el porcentaje de aminoácidos es menor que la digestibilidad obtenida sobre todo para la metionina, lisina y treonina (Bruggemann y Erbersdobler, 1968; Erbersdobler y col., 1972). Las proteínas que permanecen tienen menor eficacia nutricional.

A pequeñas dosis, las premelanoidinas formadas (8,5-50,0 mg de nitrógeno degradado/kg de dieta) poseen un efecto beneficioso, ya que gracias a su aroma y sabor estimulan la ingestión de alimentos. En los casos más favorables se ha observado un incremento de un 40%, lo que ha producido un aumento en peso de los animales de experimentación del 25% (Adrian y col., 1966). Sin embargo, a grandes dosis, el nitrógeno degradado de las premelanoidinas no es útil aunque sea retenido y su presencia es perjudicial para el organismo. En animales de experimentación se obtienen pérdidas de peso de 1,36 g/día (dieta libre de nitrógeno y premelanoidinas) frente a 1,13 g/día en el control (dieta libre de nitrógeno) (Adrian y Frangne, 1973).

Efecto sobre los enzimas digestivos

La reacción de Maillard produce cambios en la estructura proteica que impiden la acción de las peptidasas digestivas en las proximidades de los enlaces cruzados. “In vitro” se observa una mayor cantidad de péptidos y menor de aminoácidos libres (Ford y Salter, 1966; Adrian y Frangne, 1973) e “in vivo” un descenso de la digestibilidad (Adrian y Frangne, 1973).

Junto a estos efectos se ha observado que algunos componentes de la reacción de Maillard pueden inhibir la actividad de los enzimas digestivos. Adrian y Frangne, (1973) demostraron que los productos hidrosolubles (premelanoidinas) del sistema de reacción glucosa/glicina inhibían la proteólisis “in vitro” de globulinas de soja, seroalbúminas y α -lactoalbuminas por el sistema pepsina/tripsina/erepsina y que la tripsina es el enzima más afectado por la presencia de productos de Maillard. En otros ensayos (O'Brien y Morrisey, 1989), las cantidades de lisina y metionina resultantes de la digestión proteolítica de péptidos en presencia de compuestos pardos, eran inferiores a las determinadas en ausencia de los mismos.

Los efectos inhibidores de los productos de bajo peso molecular sobre la actividad de algunas enzimas fueron confirmados por Oste y col. (1986 y 1987). La tripsina, las carboxipeptidasas A y B, la aminopeptidasa N y la enzima citosólica glicina-leucina dipeptidasa, se afectan por estos compuestos. No se vieron afectadas la dipeptidilpeptidasa IV o la prolina dipeptidasa.

Las disacaridasas intestinales también pueden verse afectadas. Los productos de Maillard de bajo peso molecular son inhibidores “in vitro” de la lactasa, invertasa, maltasa y trehalasa, a concentraciones de 5 a 10 mg/ml (Oste y col., 1985). Los compuestos de peso molecular alto también causan inhibición a concentraciones de 1,4 a 2,8 mg/ml. Cuantitativamente sólo estos últimos parecen tener importancia en la disminución de la actividad enzimática (Oste y col., 1983, 1985). En contra de esto, otros autores afirman que la administración oral de melanoidinas a ratas incrementa la actividad disacaridasa de los enzimas del intestino delgado de forma proporcional a la dosis (Gomyo y Miura, 1986).

Moughan y col. (1996) han sugerido que los compuestos de la reacción de Maillard podrían incluso complicar la absorción y digestibilidad del nitrógeno que ha quedado sin reaccionar. En un estudio realizado con dietas animales ricas en caseína, estos autores han encontrado menor digestibilidad de la lisina intacta tras el tratamiento térmico frente a la lisina de la misma dieta sin tratar. Seiquer y col. (2006) también reportan efectos negativos de las dietas ricas en productos de la reacción de Maillard sobre la digestibilidad de las proteínas.

Efecto sobre las vitaminas

La influencia que sobre las vitaminas ejercen los compuestos de la reacción de Maillard no son muy conocidos. Algunas premelanoidinas pueden reaccionar con las vitaminas y destruirlas. Ford y col. (1983) demostraron la pérdida de tiamina y piridoxal durante el almacenamiento de leche en polvo durante 9 semanas a 60°C. La tiamina tiene un grupo amino y la vitamina B₆ o piridoxal tiene un grupo aldehído; ambos pueden, teóricamente, participar en la reacción de Maillard. A 70°C la destrucción de la tiamina, B₆, B₁₂ y ácido pantoténico era más rápida y ocurría de forma paralela a la degradación de la lactulosa-lisina y a la aparición de productos de la reacción de Maillard. Otros autores (Finot y Furniss, 1989) encontraron pérdidas similares de vitaminas B₁, B₆, B₁₂ y ácido pantoténico mientras que el ácido nicotínico y la biotina eran relativamente insensibles.

La destrucción del ácido ascórbico en algunos alimentos está estrechamente relacionada con la reacción de Maillard (Archer y Tannenbaum, 1979). El ácido

dehidroascórbico reacciona, vía Maillard, con los compuestos amino de los alimentos para formar pigmentos rojos y pardos (Namiki y col., 1986; Ishii y col., 1986). La pérdida nutricional de esta vitamina por la reacción de Maillard es insignificante; en las condiciones de almacenamiento y procesado habituales, gran parte del ácido ascórbico se destruye antes que la reacción de Maillard tenga carácter significativo (Archer y Tannenbaum, 1979).

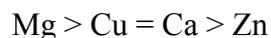
Efecto sobre los minerales

Los productos de la reacción de Maillard interfieren con el metabolismo de los minerales, aunque la naturaleza de las interacciones entre ambos es aún poco conocida.

La importancia de las uniones de los productos de la reacción de Maillard con los metales ha sido estudiada por diversos autores. Así, en 1975 Hrdlicka realizó un ensayo in vitro en el que señalaba que al calentar mezclas de glucosa-glicina o fructosa-glicina en presencia de sales de Fe^{+3} y Cu^{+2} , se originan pigmentos insolubles (melanoidinas) que actúan como agentes quelantes de dichos cationes, de manera que al ser introducidos en dietas para animales podrían afectar la biodisponibilidad de los cationes.

Rendleman (1986), en sus estudios de quelación de minerales por los productos de la reacción de Maillard en alimentos, demuestra que panes elaborados con leche presentan una mayor afinidad por el cobre y calcio que los que no la llevan como ingrediente. Al poseer la caseína una mayor afinidad por el calcio cuando se calienta junto con lactosa, este autor concluye que el efecto observado en los panes elaborados con leche se debe también a los productos de Maillard. Posteriormente, Rendleman y Inglet (1990) han propuesto que dos iones H^+ son sustituidos por un ión Cu^{2+} que se une así a la melanoidina.

La hipótesis del desplazamiento de los hidrogeniones ha sido constatada por O'Brien y col. (1994), quienes afirman que el desplazamiento de protones es evidente en la mayoría de los sistemas estudiados. Estos autores sugieren que existe un orden de afinidad para acomplejar los distintos minerales:



La capacidad de complejación de metales podría explicar algunos efectos como la inhibición de metaloenzimas (Carboxipeptidasas A y B) (Schepf y Satterle, 1986), el efecto inhibitor de los compuestos de Maillard en el transporte de metales en el intestino delgado (Schepf y Satterle, 1986) y el efecto antimicrobiano que poseen estos compuestos (Einarsson y col., 1988).

A nivel biológico existen datos experimentales, tanto en ratas como en humanos, que sugieren alguna influencia de los productos de la reacción de Maillard sobre la excreción urinaria de diversos cationes. Los primeros estudios del efecto adverso que tienen los productos de la reacción de Maillard sobre el metabolismo de los minerales aparecen en 1975 (Stegink y col., 1975; Freeman y col., 1975). Un grupo de voluntarios mostró un incremento notable en la excreción renal de zinc y cobre cuando se les administró intravenosamente soluciones de aminoácidos y proteínas calentadas en

autoclave con glucosa. Estos resultados se confirmaron seis años más tarde y se observó, además, que el efecto sobre el magnesio es nulo (Stegink y col., 1981).

Johnson y col. (1983) no encuentran el mismo efecto cuando la vía de administración es la oral, aunque observan una disminución de la capacidad de retención de zinc a largo plazo, en sujetos que se alimentan con productos pardos (corn flakes). La orina de estos sujetos contiene más compuestos aminados de alto peso molecular que la de los que no los toman y el zinc que aparece en orina se encuentra quelado a estos compuestos.

La formación de complejos entre iones metálicos y productos de la reacción de Maillard se ha demostrado "in vitro" (Hashiba, 1986; Homma y col., 1986; Gregor y Emery, 1987; O'Brien, 1988).

En animales de experimentación (ratas) se observa que cuando se administra oralmente en la dieta una cierta proporción de productos de Maillard aumenta la excreción urinaria de calcio, hierro, cobre (Hurrell, 1990) y especialmente zinc (Furniss y col., 1989; Friedman, 1996). Como el único elemento que se elimina cuando se administra intravenosamente es el zinc parece que existe un mecanismo distinto entre la excreción del zinc y la de los demás; la del zinc probablemente debida a su efecto nefrotóxico (Furniss y col., 1986) y a la quelación a nivel intestinal por parte de las premelanoidinas (Furniss y col., 1989). Estos efectos no se producen cuando se administra el compuesto de Amadori ϵ -fructosil-lisina libre (O'Brien y col., 1986; O'Brien y Morrissey, 1989).

En estos mismos animales se ha demostrado que los productos de Maillard inhiben la absorción de calcio por el intestino delgado, bien por efecto quelante, bien por afectar al metabolismo enterocítico. En ratas normales esta disminución se compensa por la mayor absorción de este elemento en el intestino grueso, hecho que no ocurre en ratas sin microflora intestinal. Esto parece indicar que la microflora metaboliza, en parte, los productos de Maillard, o bien que los productos de Maillard modifican la microflora (O'Brien y Morrissey, 1989). Sin embargo la eficacia neta de la absorción es menor ya que disminuye la cantidad de aminoácidos (sobre todo lisina de las proteínas) que actúan favoreciendo la absorción del calcio (Wasserman y Lengenmann, 1960). En otros estudios llevados a cabo recientemente en ratas alimentadas con fórmulas infantiles esterilizadas mostraron una mejor absorción de calcio en los productos con un estado más avanzado de la reacción de Maillard, pero a su vez se ha demostrado una peor utilización de este (Sarriá y col., 2001).

Animales alimentados con productos de la reacción de Maillard presentaron una marcada reducción de la concentración de Ca en hueso, en comparación con el grupo control (Delgado-Andrade y col., 2006). En estudios realizados en ratas, Delgado-Andrade y col. (2007a), sugieren que a largo plazo el consumo de productos de la reacción de Maillard podría dar lugar a alteraciones en la salud ósea, lo que podría contribuir al desarrollo y avance de enfermedades óseas degenerativas asociadas con el envejecimiento. Sin embargo la adición de glucosa-lisina y glucosa-metionina conteniendo productos de la reacción de Maillard en la dieta, incrementan la absorción y retención de cobre en ratas, y la acumulación en algunos órganos (Delgado-Andrade y col., 2002).

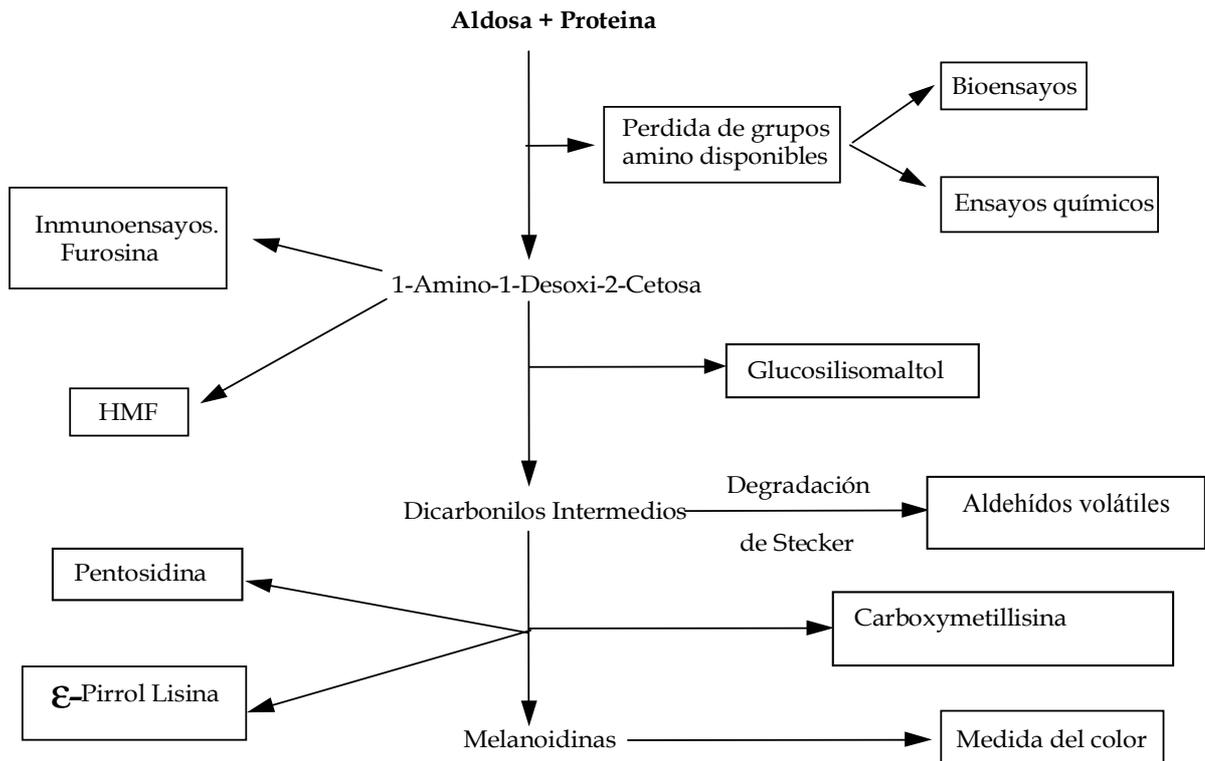
La formación de complejos con los productos de la reacción de Maillard pueden alterar la biodisponibilidad de los minerales (Navarro y col., 2000; Seiquer y col., 2000), por modificar su forma fisicoquímica (especie) en el alimento o en el lumen intestinal, por alterar el proceso de absorción o por afectar su normal metabolismo y excreción (Navarro, 2003).

I.2.1.3. Indicadores químicos y biológicos de la reacción de Maillard

La extensión de la reacción de Maillard en alimentos puede seguirse con numerosos métodos que incluyen desde los clásicos ensayos químicos a los ensayos biológicos. Los objetivos principales son definir en el alimento, el estado nutricional, características organolépticas y su posible toxicidad después del procesado y/o almacenamiento, para así optimizar los procesos de elaboración y conservación y conseguir productos con una buena calidad final y un alto valor nutritivo.

Según el método utilizado se obtendrá información de las diferentes etapas de la reacción (figura 3).

Figura 3: Indicadores de la reacción de Maillard.



La furosina, carboximetilisina (CML), hidroximetilfurfural (HMF), pirralina y pentosidina son los marcadores mas ampliamente utilizados en la evaluación nutricional de alimentos tratados por calor (Erbersdobler y Somoza, 2007). El continuo desarrollo de las técnicas analíticas hace posible que se aislen y caractericen cada vez más

compuestos específicos de cada etapa de la reacción (Ledl y Schleicher, 1990; Loscher y col., 1991; Westwood y Thonalley, 1995; Morales y Van Boeckel, 1996; Morales y Arnoldi, 1999; Drusch y col., 1999).

METODOS QUÍMICOS

Los métodos químicos que se utilizan en el control de las reacciones de pardeamiento químico en los alimentos no necesariamente se relacionan con el efecto biológico que estos alimentos producen en animales de experimentación (Adrian, 1982).

Determinación de azúcares

Los azúcares son sustrato de las reacciones de pardeamiento químico. Sin embargo, en alimentos que sufren calentamientos muy drásticos, la medida de la disminución del poder reductor, basado en la disminución de azúcares, no es adecuada. En condiciones extremas las reacciones de Maillard y caramelización producen sustancias reductoras que alcanzan las 2/3 partes del poder reductor total determinado (Adrian y Frangne, 1973).

La determinación de azúcares se suele realizar mediante cromatografía gaseosa con columna capilar, previa formación de los trimetilsilil derivados (Troyano y col., 1992; Jiménez y col., 1994; Mateo y Bosch-Reig, 1997; Fernández-Artigas y col., 2001; Contreras-Calderón y col., 2008). Otras técnicas son utilizadas para determinar los azúcares de muestras con lactosa hidrolizada (Corradini y col., 2001) y con maltodextrinas (Moreno y col., 1999) como son la cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de intercambio aniónico de alta resolución con detección mediante pulsos amperométricos (HPAEC-PED) (Delgado-Andrade y col., 2007b) y cromatografía líquida de alta resolución con detección mediante índice de refracción (HPLC-RI).

Determinación de aminoácidos

a) *Determinación de aminoácidos totales*

Los aminoácidos se determinan químicamente tras la hidrólisis proteica con ácido clorhídrico concentrado (6 N) a 110-130°C durante un periodo entre 10 y 24 horas. Esta hidrólisis no sólo libera la lisina disponible biológicamente sino una parte proporcional de la bloqueada y por lo tanto "no útil" (Finot y Mauron, 1972). De forma general puede decirse que la determinación del total de los aminoácidos en alimentos no transformados puede utilizarse como medida de la eficacia biológica (existen algunas excepciones como el caso de la metionina en la soja cruda) pero esta determinación no sirve en alimentos transformados.

b) *Determinación "in vitro" de aminoácidos disponibles*

El aminoácido más estudiado es la lisina y los métodos químicos utilizados se basan en la medida de la lisina disponible o reactiva. El grupo ε-amino libre puede reaccionar con agentes específicos y esto da lugar a los diferentes métodos: método del fluorodinitrobenzeno (Carpenter, 1960; Mottu y Mauron, 1967), método de guanidación

(Mauron y Bujard, 1964), método del ácido trinitrobenzeno-sulfónico, TNBS (Kakade y Liener, 1969; Tomarelli y col., 1985), método de reducción con borohidruro (Hurrell y Carpenter, 1974), método de pérdida de reactividad a determinados agentes fluorogénicos (Vigo y col., 1992), método de colorantes enlazados con lisina (Hurrell y Carpenter, 1975; Hurrell y col., 1979) y método de succinilación (Anderson y Quicke, 1984).

El 2,4 dinitrofluorobenceno (FDNB) es el reactivo clásico que se utiliza para reaccionar con el grupo amino. Carpenter y Ellinger (1955) y Carpenter (1960) lo aplicaron con éxito para determinar el grupo ϵ -amino de la lisina por medida colorimétrica (435 nm) del derivado formado (dinitrofenilisina, DNP-lisina) tras hidrólisis de la muestra con ácido clorhídrico. La separación de DNP-lisina de otros DNP-aminoácidos que se logra con éter y el paso por columnas cromatográficas tipo Amberlita mejoran la especificidad del método (Nielsen y Weidner, 1966). En alimentos ricos en carbohidratos y/o fuertemente calentados, este método, posee discrepancias con los métodos biológicos de "lisina útil" (Baliga y col., 1959; Miller y col., 1965; Boctor y Harper, 1968). Las discrepancias observadas en alimentos con alto contenido en carbohidratos se compensan, en parte, multiplicando por factores (1,05 y 1,1) que corrigen la pérdida de DNP-lisina sufrida por la presencia de sustancias reductoras (Carpenter, 1960; Kakade y Evans, 1966; Booth, 1971).

El DNP-lisina puede ser determinado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), lo que permite realizar el análisis de forma más específica. Por otra parte, la hidrólisis de las muestras en autoclave permite reducir considerablemente el tiempo de análisis (Rabasseda y col., 1988).

De forma indirecta la lisina útil puede determinarse midiendo el aminoácido antes y después del tratamiento con fluorodinitrobenzeno (Roach y col., 1967).

El método con el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) presenta la ventaja de ser más rápido que el ensayo con FDNB (2 horas de reacción con TNBS, seguido de 1 hora de hidrólisis). Sin embargo, la técnica sobrevalora la concentración de lisina disponible (Holsinger y Posati, 1975) debido a la reacción del TNBS con los compuestos de Amadori (Mauron, 1981).

El o-ftaldialdehído (OPA) es un reactivo fluorogénico que se utiliza para determinar grupos amino, principalmente lisina (Vigo y col., 1992). El método es muy sensible, requiere poca muestra, un tiempo de análisis reducido y no necesita hidrólisis de proteínas (Goodno y col., 1981). La pérdida de fluorescencia que ocurre tras el tratamiento de los alimentos ha sido usada para el control del procesado térmico de leche (Morales y col., 1996a), cereales infantiles (Ramírez-Jiménez y col., 2004a y b), fórmulas infantiles (Ferrer, 2001; Guerra-Hernández y col., 2002a y b) y fórmulas enterales (Rufián-Henares y col., 2002a y b).

Determinados aniones coloreados se combinan, a pH bajo, con los grupos básicos de lisina, histidina y arginina, y con los grupos α -amino terminales de proteínas. La medida del color desarrollado, que en un principio se utilizó para conocer la cantidad de proteínas de los alimentos, es utilizada también para medir el daño proteico como consecuencia de la reacción de Maillard. Los colorantes aniónicos ácido naranja 12 y azul brillante remazol han correlacionado bien con los valores de lisina útil obtenidos

con el método del FDNB (Hurrell y Carpenter, 1975; Holsinger y Posati, 1975; Hurrell y col., 1979). El tiempo requerido para realizar el ensayo con esta técnica es corto pero presenta el inconveniente de obtener un valor del daño causado por Maillard en proteínas inferior al real (Mauron, 1981; Hurrell y Carpenter, 1981; Erbersdobler y Anderson, 1983), además la técnica no es tan sensible como la del FDNB.

Compuestos de Amadori

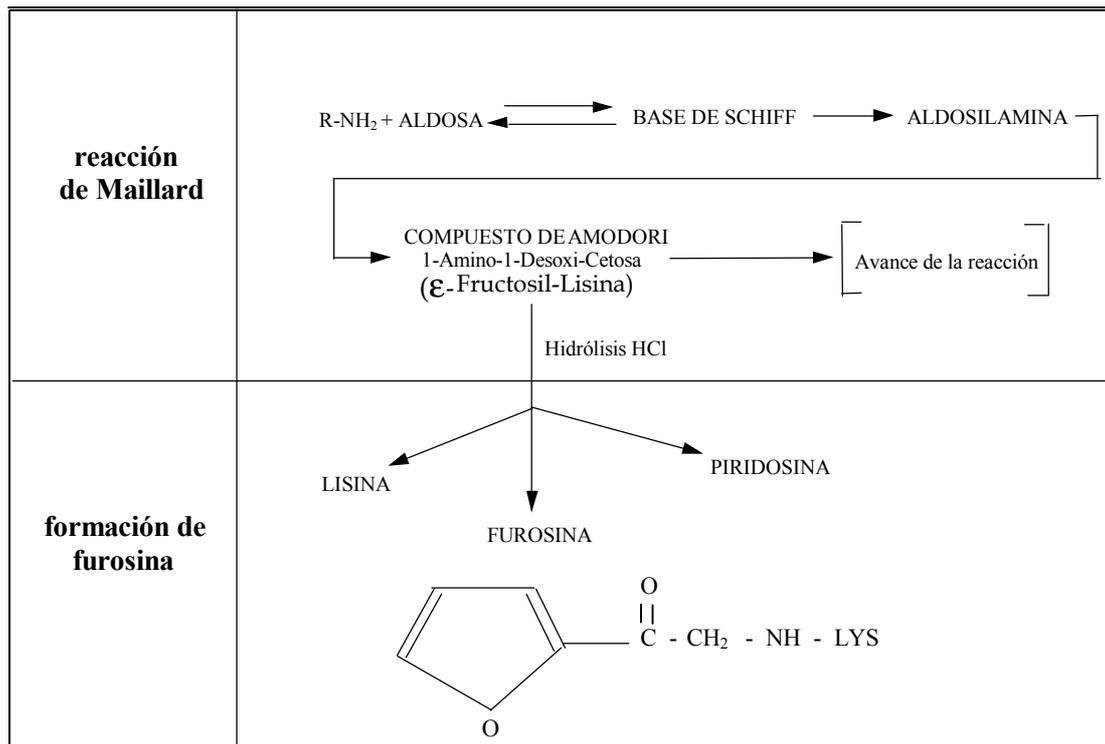
En leche y fórmulas infantiles también se evalúa el daño térmico mediante el análisis del compuesto de Amadori, **lactulosillisina** y no a través de la furosina, su producto de hidrólisis (Henle y col., 1991a). Los valores obtenidos por estos autores son de 3 a 6 veces más altos que los obtenidos mediante el análisis de furosina, lo que sugiere que este último método produzca una subestimación del daño térmico de las primeras etapas de la reacción de Maillard. El compuesto de Amadori **fructosil- γ -aminobutírico** ha sido propuesto como indicador de conservación de zumos de naranja deshidratados (Del Castillo y col., 1998).

Furosina

La furosina fue uno de los primeros productos identificados de la RM, la cual fue cuantificada en alimentos hace 40 años como un indicador químico de los compuestos de Amadori (N^ε-fructosillisina) (Erbersdobler y Somoza, 2007).

La furosina libre o combinada a proteínas, libera mediante hidrólisis ácida dos nuevos aminoácidos, furosina (20%) y piridosina (10%) y se recupera el 50% de la lisina bloqueada (Finot y Mauron, 1972) (Figura 4). En condiciones similares, la ϵ -lactulosa-lisina genera un 32% de furosina y un 40% de lisina (Bujard y Finot, 1978). Hay que tener en cuenta que la cantidad de furosina generada puede variar al depender de las condiciones de hidrólisis utilizadas (Erbersdobler y col., 1970; Finot y Mauron, 1972; Guerra y Corzo, 1996; Cárdenas y col., 2003).

Erbersdobler y Zucker (1966) fueron los primeros que detectaron en un hidrolizado de leche de leche en polvo desnatada secada con rodillos mediante cromatografía de intercambio iónico un compuesto que eluía en la zona de los aminoácidos básicos después de la arginina y daba positiva la reacción de la ninhidrina. Este compuesto aumentaba en función del tratamiento térmico aplicado a la leche. Heyns y col. (1968) y Finot y col. (1968) la sintetizaron e identificaron llamándole furosina (ϵ -N-furoil-metil-L-lisina).

Figura 4: Formación de furosina a partir de la ϵ -fructosilisina.


Los primeros métodos de determinación de furosina utilizan cromatografía de intercambio iónico de aminoácidos (Möller y col., 1977a y b; Finot y col., 1981; Erbersdobler y col., 1987; Messia y col., 2001). Estos métodos son caros y producen sobreestimación del daño producido en la lisina (Henle y col., 1991a y b). La cromatografía de gases, previa derivación (Ruttkat y Erbersdobler, 1994) y la electroforesis capilar (Tirelli, 1998; Delgado-Andrade y col., 2005) también han sido usadas. Pero es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la técnica más utilizada para la determinación de furosina. Resmini y col. (1990) propusieron la separación de furosina en fase reversa con par iónico (columna C_8) y elución con gradiente. Posteriormente Delgado y col. (1992) pusieron a punto un método en el que separaron furosina utilizando fase reversa con par iónico (columna C_{18}) y elución isocrática. Ambos métodos son sensibles, reproducibles y rápidos. Mediante este método se ha evaluado la modificación de la lisina en numerosos alimentos: leche (López-Fandiño y col., 1993; Corradini y col., 2001; Leclere y Birlouez-Aragon, 2001; Baptista y Carvalho, 2004; Rada-Mendoza y col., 2005), fórmulas infantiles (Evangelisti y col., 1994; Birlouez-Aragon y col., 1999; Sarriá y col., 2001; Guerra-Hernández y col., 2002a y b; Ferrer y col., 2003; Morales y col., 2004; Baptista y Carvalho, 2004; Martysiak-Zurowska y Stolyhwo, 2007), queso manchego (Corzo y col., 2000), galletas (Harris y Johnson, 1987), pasta (Resmini y Pellegrino, 1994), pan (Ramírez-Jiménez y col., 2001; Cárdenas y col., 2004), pasas de corinto (Sanz y col., 2001), huevos (Hidalgo y col., 1995), cereales infantiles (Guerra-Hernández y Corzo, 1996; Guerra-Hernández y col., 1999; Ramírez-Jiménez y col., 2003), miel (Cárdenas y col., 2003; Villamiel y col., 2001), fórmulas enterales (Rufián-Henares y col., 2002a y b), sistemas modelo (Rufián-Henares y col., 2004a), e ingredientes proteicos (Contreras-Calderón y col., 2008).

Los compuestos **2-furoilmetil- γ -aminobutírico** y **2-furoilmetil-arginina** han sido propuestos como indicadores de elaboración y conservación de pasas de corinto (Sanz y col., 2001).

Fluorescencia

La fluorescencia es específica de la reacción de Maillard y se favorece a altas temperaturas y medio alcalino (Stewart y Kline, 1948; Pearce, 1949). La aparición de compuestos fluorescentes se produce antes que la formación de pigmentos marrones (Friedman y Kline, 1950; Overby y Frost, 1952; Morales y van Boekel, 1997) aunque ambos presentan un periodo de inducción. Dependiendo de las condiciones del medio (pH, temperatura, Aw) y del tipo de reactantes la fluorescencia puede mostrar un máximo para luego decrecer (Baisier y Labuza, 1992), incrementan de forma continua (Cerutti y col., 1985; Huyghues-Despointes y Yaylayan, 1996) o bien alcanzar una concentración estable (Kato y col., 1989).

Los fluoróforos derivan de deshidrataciones como las que les suceden a las bases de Schiff y son moléculas con nitrógeno y dobles enlaces (Chio y Tappel, 1969). Los compuestos fluorescentes y los coloreados no necesitan tener la misma estructura pero los fluoróforos necesariamente son los precursores de los pigmentos pardos (Morales y van Boekel, 1998). La formación de compuestos fluorescentes se correlaciona mejor que el pardeamiento en la generación de compuestos antioxidantes en la reacción de Maillard (Morales y Jiménez-Pérez, 2001). Una de las estructuras propuesta es la siguiente (Chio y Tappel, 1969; Malshet y Tappel, 1973):



El estudio del avance de la reacción de Maillard se ha realizado mediante diversos sistemas modelo: estudios cinéticos de la reacción de caseína con glucosa o lactosa (Morales y col., 1996b), control de la formación de productos antioxidantes derivados de la reacción de Maillard en mezclas de glucosa o lactosa con lisina, alanina o glicina (Morales y Jiménez-Pérez, 2001) y estudio de la formación de puentes cruzados durante la degradación de la caseína con lactosa (Siegl y col., 2000). Así mismo, la determinación de compuestos fluorescentes ha sido aplicada para el control del tratamiento térmico en fórmulas infantiles (Birlouez-Aragon y col., 1999; Ferrer y col., 2005b; Bosch y col., 2007), leche (Morales y col., 1997a; Birlouez-Aragon y col., 1998) y fórmulas enterales (Rufián-Henares y col., 2002a y b).

5-Hidroximetilfurfural (HMF)

detección de HMF. Para su cuantificación se puede utilizar el método colorimétrico con ácido tiobarbitúrico propuesto por Keeney y Basette (1959) que permite obtener los valores de HMF libre, y el HMF libre más el HMF potencial, derivado de otros intermediarios de pardeamiento (HMF total). Sin embargo, la cantidad de HMF encontrada en leche procesada con este método son muy variadas e incluso contradictorias. La reacción entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el HMF para formar un complejo coloreado que se mide a 443 nm no es específica y el complejo obtenido no es muy estable (Konietztko y Reuter, 1986).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica que más se utiliza en la actualidad, ya que permite estimar el contenido de HMF de forma más

exacta al separarlo de posibles interferencias (Ferrer y col., 1999). Las muestras líquidas son sometidas a una clarificación previa con Carrez (García-Villanova y col., 1993) o TCA, separándose el sobrenadante obtenido con columnas de fase reversa y condiciones isocráticas (Porreta, 1992; García-Villanova y col., 1993). Aunque la técnica parece adecuada, en alimentos con proteínas lácteas se han encontrado compuestos que coeluyen con el HMF (Van Boekel y Zia-Ur-Rehman, 1987), por lo que es necesario controlar los componentes de las fases móviles (Morales y col., 1992) o purificar las muestras con solventes orgánicos (Rufian-Henares y col., 2001a). Así se han conseguido resultados satisfactorios analizando HMF en leche (Van Boekel y Zia-Ur-Rehman, 1987; Morales y col., 1992, 1995 y 1996a; Morales y Jimenez-Perez, 1999), cereales de desayuno (García-Villanova y col., 1993; Rufian-Henares y col., 2006a y b), zumos, concentrados y deshidratados de frutas (Porreta y Sandei, 1991; Garza y col., 2001; Fernandez-Artigas y col., 1999), café (Dauberte y col., 1990; Murkovic y Bornik, 2007), cerveza (Morawski y col., 1989), vino (Willians y col., 1983) cereales infantiles (Guerra-Hernández y col., 1992, Fernández-Artigas y col., 1999a), productos panarios (Ramírez-Jiménez y col., 2000a y b, 2001; Cárdenas y col., 2004), fórmulas enterales (Rufián-Henares y col., 201a y b), miel (Szczesna y Rybak-Chmielewska, 1999; Risner y col., 2006), churros (Morales y Arribas-Lorenzo, 2008) y fórmulas infantiles (Albalá-Hurtado y col., 1998 y 1999; Ferrer y col., 2000, 2002 y 2005a; Guerra-Hernandez y col., 2002a y b; Chávez-Servín y col., 2006; Martysiak-Żurowska y Stołyhwo, 2007).

Recientemente ha sido aplicada la técnica de electroforesis capilar a la determinación de HMF en leche (Morales y Jiménez-Pérez, 2001).

Este indicador también proviene de las reacciones de caramelización y como control de este proceso se utiliza en miel (Jeuring y Kupperts, 1980; Martínez-Gómez y col., 1993; Cárdenas, 2001) y zumos de frutas (Lee y col., 1986), entre otros.

Furfural

El furfural es un compuesto furánico que se produce en las reacciones de degradación del ácido ascórbico, caramelización y reacción de Maillard (etapas intermedias). Este compuesto es formado durante tratamientos térmicos, deshidratación o almacenamiento a temperaturas inadecuadas de alimentos como batatas (Sun y col., 1993), mermelada de fresa (Gomis y col., 1991), zumos de fruta (Lo Coco y Novelli, 1997), bebidas alcohólicas (Lo Coco y col., 1995), café (Kanjahn y col., 1996; Kanjahn y Maier, 1997 a y b), cereales de desayuno (Rufian-Henares y col., 2006a y b) y fórmulas infantiles sólidas y líquidas (Albalá-Hurtado y col., 1997a, 1999; Guerra-Hernández y col., 2002a; Ferrer y Col., 2002, 2005a y b; Chávez-Servín y col., 2006).

El furfural no se detecta en los zumos frescos, sin embargo este se incrementa en condiciones de calentamiento o almacenamiento a temperaturas elevadas. Se ha encontrado una buena correlación entre el contenido de furfural y aromas no deseables en estos productos, por tanto el furfural es un buen indicador de calidad (Nagy y Randall, 1973; Marcy y Rouseff, 1984; Mijares y col., 1986; Lee y Nagy, 1988; Espinosa-Mansilla y col., 1992).

En la actualidad la determinación de furfural se realiza casi exclusivamente por HPLC ya que esta técnica permite la cuantificación de forma individual. Se separa en columnas de fase reversa y se mide a 277 nm aprovechando el alto coeficiente de absorptividad molar.

Glucosilisomaltol

El glucosilisomaltol (glucopiranosil-oxi-2-furil-metil-cetona o 2-acetil-3-D-glucopiranosil-furano) es un compuesto que se forma en el calentamiento de maltosa con aminos primarias y secundarias (Kramhöller y col., 1992). Estos mismos autores demuestran que existe relación entre la formación de este compuesto y la temperatura y tiempo de reacción de los sustratos. Resmini y col. (1993) en estudios sobre sistemas modelo realizados con azúcares y azúcares-aminoácidos detectan glucosilisomaltol únicamente en el sistema que contiene maltosa y glutamina. Estos mismos autores proponen este compuesto como indicador de sobrecalentamiento de pasta durante el secado. Recientemente este compuesto ha sido identificado en productos panarios (Cardenas y col., 2004), papillas de cereales durante el proceso de elaboración y conservación de estos productos (Ramírez-Jimenez, 2001), cereales infantiles (Guerra-Hernández y col., 2002c), cereales de desayuno (Rufián-Henares y col., 2006a y b) y galletas (Rufián-Henares y col., 2008)

Absorción en el ultravioleta

Tanto la reacción de Maillard como la caramelización producen moléculas que absorben entre 250 y 300 nm (Friedman y Kline, 1950; Patton y Chism, 1951; Chichester y col., 1952). En medio ácido o en exceso de glucosa las sustancias responsables de la absorbancia son el HMF, que absorbe a 284 nm, y su producto de degradación, el ácido levulínico, que absorbe a 265 nm (Singh y col., 1948).

Un mismo aminoácido con diferentes azúcares y diferentes aminoácidos con un mismo azúcar producen, en su calentamiento, una gran variedad de compuestos que absorben en el ultravioleta. El azúcar y el aminoácido tienen la misma importancia. Las variables de la reacción (humedad, temperatura) determinan la intensidad de medida pero no modifican el espectro característico (Adrian, 1982).

Esta técnica a sido usada para monitoriar el avance de la reacción de Maillard en cereales infantiles (Fernandez-Artigas y col., 1999), pan (Ramirez-Jimenez y col., 2001), fórmulas infantiles (Guerra-Hernandez y col., 2002a) y en sistemas modelo aminoácidos-azucar (Ju-Woon y col., 2006; Chawla y col., 2007).

Aldehídos de Strecker

La degradación de aminoácidos produce aldehídos específicos (Nakanishi e Itoh, 1967; Ramshaw y Dunstone, 1969) como los que se observan en la tabla I.2.1.3-1 y que pueden ser determinados como medida de la intensidad de la reacción.

Tabla I.2.1.3-1: Aldehídos específicos generados durante la degradación de Strecker.

Aminoácido	Aldehído
Alanina	Acetal
Ácido glutámico	Butanal
Cisteína	Etanal o propanal
Glicina	Metanal
Isoleucina	Isobutiraldehído
Leucina	Isovaleraldehído
Metionina	Metional o propanal
Norvalina	Butanal
Ornitina	Pirrolina
Fenilalanina	Fenilacetal
Prolina	Pirrolina
Serina	Glyoxal
Treonina	2-hidroxiopropanal
Valina	2-metil propanal

Eichner y Ciner-Doruk (1981) analizan mediante espacio de cabeza, acetaldehído, aldehído isobutírico e isovaleriánico formados vía degradación de Strecker y encuentran que su concentración incrementa conforme aumenta la temperatura de obtención del tomate en polvo y es el isovaleraldehído, debido a su bajo umbral de percepción, el que mejor se correlaciona con los cambios organolépticos desagradables en este tipo de alimentos.

El metional, compuesto de la degradación de Strecker formado a partir de la metionina, también ha sido usado como indicador del grado de pardeamiento. La pérdida de metionina es importante en aquellos alimentos en los que este aminoácido es limitante. La adición de metionina libre da lugar a alimentos con muy mala palatabilidad, debido a la producción de sulfuros volátiles resultantes del pardeamiento y degradación de Strecker (Cuq y col., 1973; Shemer y Perkins, 1974). Las pérdidas nutricionales y el aroma desagradable, problemas asociados a la adición de metionina, se resolvieron con el uso de un derivado de la metionina, la N-acetil-L-metionina (NAM), que fue recomendada (Damico, 1975) y aprobada como aditivo (FDA, 1979). Este compuesto es más estable a la reacción de Maillard que la metionina (Porretta, 1992).

La medida del dióxido de carbono producido está ligada a la degradación de Strecker, aunque a veces, una pequeña proporción proviene de la acción de los azúcares

sobre los ácidos carboxílicos, como ocurre en leches en polvo mal conservadas (Henry y col., 1948) o en tomates y concentrados de ciruela.

Acidez

La reacción de Maillard produce acidificación del medio. El incremento que se produce en las primeras etapas es paralelo a la utilización de los grupos amino y al desarrollo de fluorescencia. La acidificación es el resultado de la pérdida de la capacidad tamponante del grupo amino sobre el carboxílico y de la aparición de ácidos débiles como levulínico, pirúvico, láctico y fórmico (Vodrazka y Soucek, 1960; Wahl, 1960; Fagerson, 1969). La medida de esta acidez, que se relaciona con la intensidad de tratamiento térmico, ha sido utilizada en leche (Van Boeckel, 1998).

Pirralina (Epsilon-pirrol-lisina)

La determinación de ϵ -pirrol-lisina es útil para el seguimiento de las etapas más avanzadas de la reacción de Maillard. La concentración de este compuesto es muy baja en comparación con la ϵ -fructosa-lisina cuando la intensidad del tratamiento térmico es pequeña y se incrementa notablemente cuando este se prolonga (Chiang, 1988).

La formación de ϵ -pirrol-lisina, denominada también lisilpirralina, lisilpirrolaldehído o pirralina, en la reacción de Maillard, fue descrita por vez primera por Nakayama y col. (1980) en un sistema glucosa y lisina calentado a 105°C durante 6 h. La determinación de este compuesto se ha realizado principalmente en cromatografía líquida, bien de cambio iónico (Henle y Klostermeyer, 1993) o de fase reversa (Chiang, 1988; Resmini y Pellegrino, 1994) aunque también se han descrito métodos que utilizan cromatografía de capa fina (Kato y col., 1982).

Este indicador ha sido propuesto para evaluar la extensión de la reacción en alimentos tratados a alta temperatura y/o en alimentos de larga conservación y se ha determinado de forma libre en leche sin grasa, salsas instantáneas, leches desecadas y cacao (Chiang, 1988) y unido a proteínas en leche esterilizada y evaporada (Henle y Klostermeyer, 1993; Morales y Van Boeckel, 1996), pasta (Resmini y Pellegrino, 1994), fórmulas enterales (Rufian-Henares y col., 2004b) e ingredientes proteicos (Contreras-Calderón y col., 2008). Recientemente, Hegele y col. (2008) determinan pirralina libre y unida a proteína en productos lácteos, encontrando valores muy superiores en la proteína libre, por lo que lo que concluyen que los productos de glicación libre no son un adecuado indicador de la extensión de la glicación de las proteínas en productos lácteos.

Carboximetilisina

La carboximetilisina (CML) es un indicador de etapas avanzadas y ha sido útil en alimentos tratados térmicamente. Uno de los orígenes de la carboximetilisina son los compuestos de Amadori, y se forma cuando el tratamiento térmico es más severo. La CML ha sido cuantificada por ELISA en fórmulas infantiles (Birlouez-Aragon y col., 2004; Dittrich y col., 2006), leches calentadas y en polvo (Tauer y col., 1999), leche materna (Dittrich y col., 2006) y en alimentos de consumo diario (Goldberg y col., 2004); y por técnicas cromatográficas GC/MS (Charissou y col., 2007), HPLC/FD (Drusch y col., 1999; Delgado-Andrade y col., 2007b) o por LC-MS/MS (Ahmed y

col., 2005; Fenaille y col., 2006; Hegele y col., 2008) en leche cruda, pasteurizada, UHT, leche condensada, leche semidescremada y fórmulas infantiles.

Lactulosa

El tratamiento térmico de carbohidratos conduce a la isomerización de los mismos. En productos con leche el calor puede producir lactulosa (Adachi y Patton, 1961). Este indicador es utilizado para diferenciar leches higienizadas a diferentes temperaturas: pasteurización, esterilización y UHT directo e indirecto (Geier y Klostermeyer, 1983; Andrews, 1984; Olano y col., 1986; Leclere y Birlouez-Aragon, 2001; Yurova y Denisovich, 2003; Montilla y col., 2006). También ha sido utilizado para controlar el proceso de esterilización y conservación de fórmulas infantiles (Sarriá y col., 2001; Guerra-Hernández y col., 2002a y b).

Color

La coloración se puede producir con el concurso o no del aminoácido. Durante la caramelización el color proviene de la degradación del azúcar y esta depende sobre todo del pH y temperatura (Schroeder y col., 1955).

La presencia de aminoácidos tiende a incrementar el fenómeno en proporciones variables. El aminoácido probablemente reacciona con compuestos carbonílicos insaturados que son formados al principio de la reacción y que son los responsables de la fluorescencia (Burton y col., 1963; Carson y Olcott, 1954). La coloración es débil a pH ácido y se intensifica a pH neutro y alcalino. Por tanto, los aminoácidos neutros o ácidos tienen poco efecto sobre la intensidad del color y los aminoácidos básicos la refuerzan a pH superiores a 6.

Los compuestos coloreados pueden ser divididos en dos grupos: compuestos de bajo peso molecular con 2-4 anillos fusionados y dobles enlaces conjugados (Ames, 1992; Ames y col., 1993) y melanoidinas, que poseen pesos moleculares de varios miles de daltons y presentan distintos cromóforos (Ames y Nursten, 1989; O'Brian y Morrissey, 1989).

El color se relaciona con el tratamiento térmico, aunque no es un criterio sensible para el estudio de la reacción de Maillard, comparado con otros métodos (Friedman y Kline, 1950; Bookwalter y Kwolek, 1981). La cuantificación del color puede ser un indicador de la severidad del tratamiento térmico (Rhim y col., 1988) o de la eficacia de los procesos tecnológicos (Giangiacomo y Messina, 1988) en leche, aunque para ello es necesario obtener una referencia estable de leche cruda sin tratar (Rampilli y Andreini, 1992; Pellegrino y col., 1993).

Los métodos empleados para determinar el pardeamiento incluyen tanto determinaciones analíticas como medidas ópticas (Morales y Van Boekel, 1998). Las técnicas analíticas para la determinación de compuestos coloreados se dividen de acuerdo con el peso molecular de estos. Tradicionalmente la cromatografía en capa fina, cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta resolución han sido empleadas para los compuestos de bajo peso molecular (<500 Da) mientras que la cromatografía de intercambio iónico y la de exclusión molecular son utilizadas para compuestos de alto peso molecular (Rizzi, 1997).

Las medidas ópticas comprenden tanto la determinación de la absorbancia a 420 nm y la medida de la reflectancia. La absorbancia a 420 nm ha sido clásicamente usada como medida de color en sistemas modelo de azúcares y azúcares-aminoácidos para indicar la reactividad de los diferentes componentes (McWeeny, 1981; Porter, 1987; Cuzzoni y col., 1988; Yeo y Shibamoto, 1991; Tsai y col., 1991; Izzo y Ho, 1993; Fernández-Artigas y col., 1999a; Morales y Van Boekel, 1998). Esta medida ha sido también aplicada en zumos de vegetales como indicador del tratamiento térmico y conservación de estos productos (Sullivan, 1981; Eichner y Wolf, 1983; Wong y Stanton, 1989; Nagy y col., 1990; Lee, 1992; Miltz y col., 1995) así como en panes tostados (Ramírez-Jiménez y col., 2001) y cereales infantiles (Fernández-Artigas y col., 1999a) para el control del tratamiento térmico.

El color desarrollado en las reacciones de pardeamiento químico también puede seguirse mediante medida de los parámetros de color del sistema CIE (1986) (Comision Internacional para la Iluminacion), L* (luminosidad), a* (rojo-verde) y b* (amarillo-azul) que nos proporciona el fotómetro de reflexión. Este método se ha usado en sistemas modelo (Hidalgo y Zamora, 1993; Morales y van Boekel, 1998; Rufian-Henares y col., 2004a) leches calentadas (Kessler y Fink, 1986; Pagliarini y col., 1990), leches almacenadas (Rampilli y Andreini, 1992), pan tostado (Ramírez-Jiménez y col., 2001) fórmulas infantiles (Ferrer y col., 2005b; Guerra-Hernández y col., 2002b; Rossi y Pompei, 1991), cereales infantiles (Fernández-Artigas y col., 1999a; Ramírez-Jiménez y col., 2003 y 2004d; Bosch y col., 2007), fórmulas enterales (Rufian-Henares y col., 2002a) y dietas consumidas usualmente por adolescentes (Delgado-Andrade y col., 2007b).

Hidrólisis enzimática “in vitro”

La hidrólisis enzimática “in vitro”, ha sido usada para evaluar la disponibilidad de aminoácidos en proteínas dañadas por calor (Ford y Salter, 1966; Mottu y Mauron, 1967; Bujard y Finot, 1978).

Estos métodos se basan en el hecho de que los aminoácidos bloqueados no son hidrolizables por las proteasas. Por tanto la utilización de papaína, tripsina, pepsina y pancreatína (Mauron y col., 1955; Ford, 1964; Kakade y Evans, 1966) y la medida de los aminoácidos y péptidos producidos en alimentos calentados frente a controles puede indicar el grado de biodisponibilidad de las proteínas en alimentos tratados térmicamente (Ford y Salter, 1966; Frangne y Adrian, 1967; Frangne y Adrian, 1972b). La técnica de hidrólisis enzimática “in vitro” puede realizarse inmovilizando las enzimas sobre un soporte granulado de cristal poroso, en un reactor de flujo continuo (Swaigood y Catignani, 1985; Chung y col., 1986).

La medida de aminoácidos libres es fácil pero no la de oligopéptidos; esto puede llevar a resultados de difícil interpretación. Por ello los métodos enzimáticos se han combinado con métodos microbiológicos en los que se mide el crecimiento de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* o *Streptococcus*, microorganismos que utilizan para su crecimiento tanto aminoácidos libres como oligopéptidos (Adrian, 1982).

ENSAYOS BIOLÓGICOS

Determinación "in vivo" de la eficacia proteica

Se han realizado numerosos **ensayos en ratas** para evaluar la pérdida de aminoácidos esenciales en alimentos como consecuencia de la reacción de Maillard (Mauron, 1981).

Dentro de los métodos biológicos se han utilizado y se siguen utilizando el PER (*Protein Efficiency Ratio*), Coeficiente de Eficacia en Crecimiento (CEC), Valor Sustitutivo de la Proteína, Valor Biológico (VB), Utilización Neta de la Proteína (NPU) y Valor Productivo de la Proteína (PPV) (Sánchez y col., 1963; Schaafsma, 1994). En el hombre, el índice biológico que mejor nos informa acerca de la calidad de la proteína es el balance de nitrógeno. Sin embargo, la aplicación de este método (en el que se debe calcular la ingesta de nitrógeno y las pérdidas fecales y urinarias) tiene dificultades técnicas y éticas que dificultan en gran medida su aplicación de rutina (Martinez-Agustin y Martinez de Victoria, 2006).

En alimentos donde no ha ocurrido reacción de Maillard, el valor de lisina digestible total puede ser muy cercano al valor de lisina disponible (Peterson y Warthesen, 1979). Para los alimentos que han sido procesados o almacenados por periodos largos, la lisina puede perder su valor nutritivo, principalmente debido a la reacción de Maillard. Esta lisina que reaccionó no es susceptible al ataque enzimático quedando nutricionalmente no disponible (Hurrell y carpenter, 1981; Moughan, 2005a).

Los métodos "in vitro" ofrecen información de la intensidad de la reacción de Maillard y de la inactivación de aminoácidos, pero no de la eficacia proteica de los alimentos fuertemente calentados. Estas discrepancias son debidas a efectos tóxicos y antinutricionales de las premelanoidinas formadas durante el calentamiento.

En los últimos años, los bioensayos más utilizados han sido, el PER, VB y NPU. Todos ellos utilizan ratas en crecimiento y evalúan la ganancia de peso por gramo de proteína ingerido, el primero y los dos últimos valoran el nitrógeno retenido frente al absorbido (VB) o al ingerido (NPU) por lo que tienen en cuenta la utilización metabólica y la digestiva y metabólica respectivamente. Las principales críticas a estos métodos están basadas en los diferentes requerimientos en aminoácidos de la rata y el hombre ya que en el hombre predominan los procesos de mantenimiento respecto al crecimiento y por otro lado, los requerimientos de aminoácidos azufrados son mayores en rata para sustentar el crecimiento del pelo (Moughan, 2005b; Bos y col., 2000; Schaafsma, 2005).

Con estos antecedentes, y gracias a los progresos tecnológicos en el análisis de aminoácidos y al mejor conocimiento de los requerimientos de aminoácidos indispensables en humanos (FAO/WHO, 1990; FAO/WHO/UNU, 1985), la calidad proteica puede evaluarse expresando el contenido del primer aminoácido indispensable limitante de la proteína problema como porcentaje del contenido del mismo aminoácido en el patrón de referencia de aminoácidos indispensables (o frente a una proteína "patrón" o "ideal"). Posteriormente, este porcentaje se corrige con el coeficiente de digestibilidad verdadero (CDV) de la proteína problema realizando un bioensayo en ratas. Este método se conoce como Computo de aminoácidos corregido con la digestibilidad de la proteína (PDCAAS) (Schaafsma, 2000).

PDCAAS (%) = $\text{mg/g de proteína del problema del primer aminoácido limitante} / \text{mg/g de proteína de referencia del mismo aminoácido} \times \text{CDV}$.

Este índice de calidad se basa en dos presunciones, que el aminoácido limitante esencial en una proteína o mezcla proteica es el factor crítico para alcanzar los requerimientos de aminoácidos y que la proteína solo puede cubrir los requerimientos nutricionales cuando se absorbe en el tracto gastrointestinal (Schaafsma, 2000).

También existen métodos para estimar la biodisponibilidad de forma global, especialmente para proteínas que han sido sometidas a un procesamiento químico o por calor. Estas aproximaciones tienen en cuenta los tres componentes citados, el de integridad química así como, utilización digestiva y metabólica. El método de uso más frecuente es el ensayo de razón de pendiente (*slope-ratio assay*) (Malcom y col., 2005). Se lleva a cabo en animales y básicamente consiste en comparar la fuente proteica (de aminoácidos) problema con el aminoácido estándar puro que queremos estudiar. Por ejemplo, para determinar la biodisponibilidad de la lisina en legumbres procesadas, se formula una dieta basal deficiente en el aminoácido a la que se le suplementa con la fuente problema (legumbres) o con lisina pura (100% biodisponible) en cantidades iguales a las que aporta la primera, junto con otros componentes que simulen los aportados por las legumbres. Se controla el crecimiento, la retención de nitrógeno u otro parámetro adecuado para nuestros objetivos. Se comparan las pendientes de las dos respuestas y la biodisponibilidad de la lisina se expresa como la relación entre las dos. El *slope-ratio assay* ha sido aplicado en harina de semilla de algodón, comidas con carne, harina de semilla de girasol, harina de colza, leche desnatada en polvo y harina de soja (Fernandez y Parsons., 1996; Batterham y col., 1979), harina de carne y huesos (Batterham y col., 1986; Wang y Parsons., 1998), harina de sangre (Batterham y col., 1986), granos secos de destilería (Lumpkins y Batal., 2005), maíz (Parsons y col., 1998) y guisantes calentados (Van Barneveld y col., 1994). Los inconvenientes de este ensayo son la duración, complejidad y costo ya que hay que diseñar dietas y experimentos repetidos para cada aminoácido. Se han propuesto otros ensayos más cortos y baratos que utilizan la oxidación de un aminoácido indicador (fenilalanina) cuando hay otro aminoácido limitante, por ejemplo la lisina. Cuando este último no sea limitante, disminuirá a oxidación del indicador, que se utilizará en la síntesis proteica (Ball y col., 2004; Moehn y col., 2005).

Se está postulando un nuevo concepto en calidad proteica al que se le denomina Índice de efectividad proteica (Darragh, 2005). Este índice aúna todos los aspectos clásicos de calidad proteica, digestibilidad, incluida la velocidad de absorción de aminoácidos, composición en aminoácidos y utilización metabólica, al que se le añade el de bioactividad potencial de la proteína en su conjunto, de distintos péptidos incluidos en ella y liberados durante el proceso de utilización digestiva y/o su posible impacto sobre otros nutrientes.

Recientemente Rutherford y Moughan (2007) han desarrollado un nuevo bioensayo (Biolysine) para determinar el contenido lisina útil en alimentos y piensos. Consiste en el ensayo de una dieta en hombres o animales, donde lo digerido es recogido a partir del ileum terminal, y el contenido en lisina reactiva tanto de la dieta como de lo digerido es determinada usando la reacción de guanidación. El digerido se muestrea como lo opuesto al total recogido, y el contenido de lisina reactiva en el ileum terminal es relacionada con la ingesta dietética. La digestibilidad aparente de la lisina

ileal es calculada como la diferencia entre los aminoácidos consumidos en la dieta y los degeridos en el ileum. La digestibilidad aparente se ajusta a la verdadera mediante la corrección de la lisina endógena (asumida como lisina reactiva). El ensayo de Biolisina ha sido usado en una amplia gama de alimentos procesados y piensos (Rutherford y col., 1997), productos a base de leche (Rutherford y Moughan, 2005), alimentos preparados, cereales de desayuno (Rutherford y col., 2006) y alimentos para mascotas (Rutherford y col., 2007).

Los **métodos microbiológicos** se basan en la utilización de microorganismos con requerimientos conocidos de aminoácidos, observando el crecimiento u otro parámetro relacionado con la utilización de la proteína de ensayo (Martinez-Agustin y Martinez de Victoria, 2006).

I.2.1.4. Reacción de Maillard en fórmulas infantiles

Las FI son sometidas a diferentes tratamientos térmicos durante su fabricación, tales como mezcla de ingredientes, esterilización y en el caso de las fórmulas sólidas a un secado por atomización.

Una de las más importantes modificaciones inducidas por el tratamiento térmico y condiciones prolongadas de almacenamiento es la reacción de Maillard, la cual envuelve aminoácidos y azúcares reductores y puede producir pérdida del valor nutricional (Henle y col., 1991a).

Además, en las FI en polvo se dan una serie de factores que las hacen muy sensibles a la reacción de Maillard: la calidad de la materia prima, la composición de las fórmulas (elevada relación lactosa/proteínas), los tratamientos térmicos a que se someten durante el proceso de elaboración y las condiciones de humedad y temperatura que sufren durante el almacenamiento que puede prolongarse a dos años (Palombo y col., 1984; Van Mil y Jans, 1991; Varnam y Sutherland, 1995).

La reacción de Maillard origina efectos favorables y desfavorables en los alimentos. Los aspectos desfavorables afectan al valor nutritivo, toxicológico, organoléptico y tecnológico. Los procesos tecnológicos aplicados a la leche y fórmulas infantiles son controlados para evitar la pérdida de aminoácidos esenciales y la aparición de características organolépticas indeseables (Evangelisti y col., 1994).

Las pérdidas de lisina útil y disminución de la digestibilidad de las proteínas son las principales consecuencias nutricionales de la reacción de Maillard durante la elaboración y conservación de fórmulas infantiles (Ferrer y col., 2003; Puig y col., 2003)

Con el objeto de controlar y limitar, en lo posible los efectos de la RM y conseguir que el contenido de lisina del producto final sea similar al de la materia prima, es necesario optimizar los tratamientos térmicos y las condiciones de almacenamiento del producto (Anantharaman y Finot, 1993).

Además del deterioro sensorial de los alimentos, como consecuencia de un procesado y conservación inadecuado, la reacción de Maillard tiene especial interés en

las FI en polvo que han sufrido en su elaboración procesos de concentración o deshidratación, formándose colores no deseados, o sabores a rancio o a viejo que impiden su comercialización. En estos sabores participan, además la oxidación de los lípidos.

La prevención de la reacción de Maillard en las FI es difícil y solo se puede conseguir controlando las condiciones de temperatura y tiempo de los tratamientos térmicos utilizados en la elaboración y de su posterior almacenamiento.

Predecir los cambios que sufren los alimentos durante el procesado es de gran importancia para la industria alimentaria, ya que les permitiría controlar y optimizar los procesos y obtener productos de mejor calidad. Para ello es de gran importancia conocer los cambios que se producen en los alimentos desde la materia prima, procesado y posterior almacenamiento, con el fin de proporcionar a la industria datos que permitan elaborar productos de la máxima calidad nutritiva y minimizar los compuestos que pueden tener propiedades tóxicas (Ames, 1998).

Ferrer y col. (2000) obtuvieron pérdidas del 20% de lisina, medida como OPA reactiva, durante la elaboración de fórmulas infantiles sólidas. Anantharaman y Finot (1993) pérdidas del 5 al 10% durante la atomización de fórmulas infantiles y del 20 al 50% en el secado de rodillos. Rossi y Pompei (1991) estudiaron diferentes procesados de fórmulas infantiles líquidas, encontrando pérdidas entre el 18,4 y 26,3%. Ferrer y col. (2003) conservan fórmulas infantiles de inicio y continuación durante 24 meses a 20 y 37°C, encontrando pérdidas en lisina útil entre 20-24%, y 48-49% respectivamente para las dos temperaturas ensayadas. Guerra-Hernandez y col. (2002b) reportan pérdidas en lisina útil de 8,9 y 88,3% en fórmulas infantiles conservadas durante 3 meses a 20 y 55°C respectivamente.

El contenido en carbohidratos reductores en ingredientes proteicos está estrechamente relacionado con la pérdida de lisina (Evangelisti y col., 1994; Albalá-Hurtado y col., 1997a; Sri-Sumartini y Kantasubrata, 1993).

Albalá-Hurtado y col. (1997b) determinaron compuestos furánicos totales y libres en fórmulas infantiles sólidas y líquidas y en leche en polvo. Posteriormente determinaron los compuestos furfúricos formados, HMF y furfural, durante el almacenamiento de fórmulas infantiles en polvo (Albalá-Hurtado y col., 1998). Estos autores encontraron que la concentración de ambos compuestos se incrementa durante el tiempo de almacenamiento, si bien el incremento de furfural es mayor (Albalá-Hurtado y col., 1999). En el mismo tipo de muestras (fórmulas infantiles), Ferrer y col. (2000, 2002, 2005a); Chávez-Servín y col. (2006) estudian la evolución de HMF y furfural durante la conservación, encontrando un aumento de estos indicadores cuanto mayor era el tiempo y temperatura de almacenamiento. Guerra-Hernandez y col. (2002b) conservan fórmulas infantiles en polvo a 20 y 30°C bajo atmósfera de oxígeno y nitrógeno, encontrando mayor incremento de HMF cuando las fórmulas se conservaron en nitrógeno. Contreras-Calderón y col. (2008) estudian el daño térmico por Maillard en ingredientes proteicos, encontrando compuestos furánicos solo en las proteínas de suero lácteo.

Ferrer y col. (2003), conservan fórmulas infantiles adaptadas y de continuación durante 24 meses a 20 y 37°C encontrando incrementos de furosina durante el primer

año para las dos fórmulas y temperaturas estudiadas. Guerra y col. (2002b) estudian los cambios químicos en fórmulas infantiles en polvo conservadas durante 90 días a 20 y 55°C bajo atmósfera de oxígeno y nitrógeno, encontrando los mayores incrementos de furosina tras 30 días a 55°C bajo atmósfera de nitrógeno, tiempo a partir del cual el indicador desciende. Otros autores (Morales y col., 2004; Fenaille y col., 2006; Penndorf y col., 2007; Martysiak-Zurowska y Stolyhwo, 2007) determinan furosina en diferentes tipos de fórmulas infantiles, encontrando valores comprendidos entre 130 y 1551 mg/100 g de proteína, los cuales son superiores a los encontrados por Baptista y Carvalho (2004), 21,4-81,5 mg/100 g de proteína.

Birlouez-Aragon y col. (2004) estudian la glicación de la proteína en fórmulas infantiles, encontrando una concentración media de 1,2 y 1,4 µg/g de proteína en fórmulas en polvo y líquidas, respectivamente. Dittrich y col. (2006) determinan CML en fórmulas infantiles, encontrando valores entre 514 y 11372 ng/ml. Charissou y col. (2007) encuentran concentraciones de CML en fórmulas infantiles en polvo entre 5 y 40 ng/mg de proteína. La modificación de las proteínas por la RM durante el procesado de fórmulas infantiles en polvo fue seguida mediante la determinación de CML, encontrando valores entre 26 y 322 ng/mg de proteína (Fenaille y col., 2006).

Los niveles de pirralina encontrados en alimentos procesados son bajos, lo que explica su limitado uso como indicador (Van Boeckel, 1998). No existen trabajos previos en fórmulas infantiles, sin embargo se ha encontrado pirralina en proteína de suero lácteo (41 mg/100 g de proteína) empleado en la elaboración de fórmulas infantiles (Contreras-Calderón y col., 2008).

Ferrer y col. (2005b) encuentran incrementos en la intensidad de fluorescencia tras conservar fórmulas infantiles de inicio y continuación durante 24 meses a 20 y 37°C. Rufian-Henares y col. (2006c) encuentran un incremento en la intensidad de fluorescencia de 3,8% (punto inicial) a 122% (tras calentamiento a 140°C/30 min) en sistemas modelo elaborados con proteínas usadas en la elaboración de fórmulas infantiles calentados a diferentes tiempos y temperaturas.

Ferrer y col. (2005b) estudian el color en fórmulas infantiles en polvo adaptadas y de continuación durante la conservación, observando incrementos (ΔE) en el tiempo. En estudios realizados en sistemas modelo de fórmulas infantiles, Rufian-Henares y col. (2004a) concluyen que las etapas avanzadas de la reacción de Maillard pueden ser seguidas mediante la determinación del color, cuando los ingredientes iniciales presentan un alto daño térmico, o los sistemas modelo han sido calentados a altas temperaturas por largo tiempo.

Otros estudios realizados en fórmulas infantiles han observado menor biodisponibilidad en calcio (Sarriá y col., 2001), hierro y zinc (Sarriá y Vaquero, 2001) en fórmulas líquidas que en fórmulas sólidas, lo que se ha correlacionado con el mayor pardeamiento de las primeras.

OBJETIVOS

Valorar el daño térmico de los ingredientes proteicos usados en la elaboración de fórmulas infantiles mediante la selección de indicadores de pardeamiento químico apropiados.

Evaluar el daño térmico sufrido durante el procesado de fórmulas infantiles elaboradas con diferentes ingredientes mediante la selección de los indicadores de pardeamiento químico más adecuados, así como determinar su pérdida nutricional.

Conocer la extensión de las reacciones de pardeamiento químico y la calidad nutricional durante la conservación de diferentes tipos de fórmulas infantiles a lo largo 2 años de vida útil bajo diferentes condiciones de temperatura y humedad.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. MUESTRAS

Los estudios realizados en este trabajo se llevaron a cabo en ingredientes proteicos, fórmulas infantiles comerciales, sistemas modelo y muestras correspondientes a las distintas etapas de elaboración de las fórmulas infantiles.

II.1.1. Ingredientes proteicos

Algunos ingredientes proteicos fueron cedidos por una industria de productos dietéticos y otros fueron obtenidos del comercio. En la tabla II.1.1-1 se muestran los ingredientes estudiados.

Tabla II.1.1-1: Ingredientes analizados.

Ingrediente	Denominación	Tipo/Estado
Lactosuero	Lactosuero 1	Sólido
Proteína de suero lácteo baja en lactosa	PSLBL	Sólido
Proteína de suero lácteo	PSL	Sólido
Lactosuero	E-300	Sólido
Lactosuero	Lactosuero 2	Sólido
Lactosuero	Lactosuero 3	Sólido
Caseinato de calcio	CC 1	Sólido
Caseinato de calcio	CC 2	Sólido
Caseinato de calcio	CC 3	Sólido
Caseinato de sodio	CS	Sólido
Aislado de proteína de soja	APS	Sólido
Proteína de soja	P. Soja	Sólido
Soja	Soja Austria	Sólido
Proteína de suero lácteo baja en lactosa parcialmente hidrolizada	PSLBLPH	Sólido
Hidrolizado de caseína	Hidrocasaína	Sólido

II.1.2. Fórmulas infantiles

El estudio fue desarrollado en cuatro fórmulas infantiles en polvo preparadas con diferentes carbohidratos (maltodextrinas, sacarosa o lactosa) y proteínas lácteas (caseinato de calcio (CC 2), proteína de suero lácteo baja en lactosa (PSLBL), proteína de suero lácteo (PSL), y proteína de suero lácteo baja en lactosa parcialmente hidrolizada (PSLBLPH) con peso molecular entre 8000 y 20000 Da. (Tabla II.1.2-1)

Las fórmulas fueron preparadas en planta industrial (PI) y piloto (PP) bajo las mismas condiciones por una industria de productos dietéticos. La composición de la fórmula durante las diferentes etapas del procesado y del producto final fue proporcionada por la industria (tablas II.1.2-1 y II.1.2-2). Aunque la formulación es la

misma en ambas plantas, los ingredientes son de diferentes lotes. En este estudio solo se tuvo acceso a los ingredientes usados en planta piloto.

Tabla II.1.2-1: Composición en proteína y carbohidratos de las fórmulas infantiles en las diferentes etapas del procesado.

Fórmulas	% Proteínas		% Carbohidratos	
	Planta Industrial	Planta Piloto	Planta Industrial	Planta Piloto
A				
Mezcla de ingredientes	8,84	8,78	-	
Adición de aceite	7,22	7,20	-	
Secado por atomización (producto final)	11,33	11,56	(54,9)	
B				
Mezcla de ingredientes	9,9	11,05	-	
Adición de aceite	8,09	8,89	-	
Secado por atomización (producto final)	11,94	12,10	(52,2)	
C				
Mezcla de ingredientes	7,94	8,36	-	
Adición de aceite	6,73	7,13	-	
Secado por atomización	13,83	13,65	-	
Producto final (adición de aminoácidos)	13,14	13,29	(55,9)	
D				
Mezcla de ingredientes	-	8,05	-	
Adición de aceite	-	6,96	-	
Secado por atomización	-	13,76	-	
Producto final (adición de aminoácidos)	-	13,50	(55,9)	

Tabla II.1.2-2: Composición final de las fórmulas infantiles.

Fórmulas	Contenido (%)	
	Planta Industrial	Planta Piloto
A		
Carbohidratos	54,90	
Sacarosa	24,70 (45%)	
Maltodextrinas	30,20 (55%)	
Proteínas	11,33	11,56
Proteína de suero lácteo bajo en lactosa (PSLBL)	5,38 (47,5%)	5,49 (47,5%)
Caseinato cálcico (CC 2)	5,90 (52,5%)	6,10 (52,5%)
Grasa	27,70	
Acido linoleico	4,20	
Minerales	3,10	
Humedad	3,30	
B		
Carbohidratos	55,20	
Lactosa	55,20 (100%)	
Proteínas	11,94	12,10
Proteína de suero lácteo (PSL)	5,73 (48%)	5,81 (48%)
Caseinato cálcico (CC 2)	6,21 (52%)	6,29 (52%)
Grasa	27,30	
Acido linoleico	5,50	
Minerales	2,90	
Humedad	3,00	
C		
Carbohidratos	55,90	
Sacarosa	8,40 (15%)	
Maltodextrinas	47,5 (85%)	
Proteínas	13,14	13,29
Proteína de suero lácteo baja en lactosa parcialmente hidrolizada (PSLBLPH)	13,14 (100%)	13,29 (100%)
Grasa	25,35	
Acido linoleico	4,10	
Minerales	2,90	
Humedad	2,60	
D		
Carbohidratos	55,90	
Sacarosa	8,40 (15%)	
Lactosa	47,50 (85%)	
Proteínas		13,50
Proteína de suero lácteo baja en lactosa parcialmente hidrolizada (PSLBLPH)		13,50 (100%)
Grasa	25,35	
Acido linoleico	4,10	
Minerales	2,90	
Humedad	2,60	

Se realizaron dos estudios en dichas fórmulas:

a) **Estudio de elaboración.** Se analizaron muestras correspondientes a las diferentes etapas del proceso de elaboración.

El análisis fue realizado en tres etapas del procesado: mezcla de ingredientes, adición de grasa y secado. Los ingredientes fueron mezclados con agua des-ionizada a temperatura menor de 60°C bajo agitación hasta obtener 40% de sólidos totales (aproximadamente 3 horas). Durante la adición de la grasa la mezcla es sometida a un tratamiento térmico de 90-95°C durante 22 segundos. Finalmente el secado por atomización se realiza a 215-230°C obteniéndose una temperatura de salida del aire de 85°-95°C. En las fórmulas parcialmente hidrolizadas se realiza una reconstitución en seco de aminoácidos (L-Arginina, L-Fenilalanina, L-Histidina, L-Triptofano and L-Tirosina). El producto final fue envasado bajo atmosfera de nitrógeno en botes de aluminio de 400 g.

b) **Estudio de conservación.** Se realizaron dos tipos de conservación en el laboratorio:

- Conservación a A_w propia del producto: para estudiar los efectos de una conservación a largo plazo, las fórmulas en sus botes originales (cerrados) fueron almacenadas en estufas a 20 y 30°C, y en cámara fría a 4°C. Por cada tiempo y temperatura de conservación se uso un bote diferente y se sacaron a medida que cumplían las condiciones de almacenamiento establecidas previamente. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

- Conservación a A_w 0,65: Estas condiciones extremas de almacenamiento permiten evaluar el comportamiento de estos productos bajo condiciones inadecuadas (extremas). Las muestras por cada tiempo y temperatura de conservación fueron puestas en placas petri abiertas dentro de desecadores acondicionados con una A_w de 0,65 mediante solución saturada de nitrito de sodio (Salmarch y Labuza., 1980) e introducidos en estufas a 20° y 30°C durante 1, 2, 3 y 4 semanas. Una vez cumplido el tiempo de conservación para cada muestra, fueron guardadas a -20°C hasta su análisis.

II.1.3. Fórmulas infantiles comerciales

Se realizo un estudio en 14 fórmulas infantiles en polvo adquiridas del comercio en donde se evaluó el daño térmico producido, mediante la reacción de Maillard. La composición en proteínas y azucares según la etiqueta se muestra en la tabla II.1.3-1.

Tabla II.1.3-1: Composición en proteínas y carbohidratos de las fórmulas infantiles comerciales.

Formula	% Proteínas	% Azúcares
1 ^a	Lactosuero, leche desnatada, proteínas lácteas (9,5)	Lactosa (57,9)
2 ^b	Lactosuero, leche desnatada, proteínas del suero (14,5)	Lactosa (35) Maltodextrinas (23)
3 ^b	Leche desnatada, lactosuero (12)	Lactosa (62,1)
4 ^a	Leche desnatada, lactosuero (12)	Lactosa (54,5)
5 ^a	Proteínas lácteas (10,4)	Lactosa (55,5)
6 ^b	Proteínas lácteas (11,6)	Lactosa (40,2) Maltodextrinas (13,2)
7 ^b	Leche desnatada (12,5)	Lactosa (55,9)
8 ^a	Leche desnatada (12,0)	Lactosa (43,4) Maltodextrinas (14)
9 ^b	Leche desnatada (14,6)	Lactosa (44,6) Maltodextrinas (11,9)
10 ^a	Proteína de suero lácteo parcialmente hidrolizada (11,5)	Lactosa (40,4) Maltodextrinas (17,3)
11 ^a	Proteína de suero lácteo parcialmente hidrolizada (11,5)	Lactosa (19,1) Maltodextrinas (26) Almidón (9,9)
12 ^a	Proteína de suero lácteo parcialmente hidrolizada (12,1)	Lactosa (20,1) Maltodextrinas (21,6) Almidón (12,6)
13 ^a	Proteína de suero lácteo parcialmente hidrolizada (12,4)	Maltodextrinas (33,7) Maltosa (20,5)
14 ^a	Proteína aislada de soja (14,2)	Maltodextrinas (52)

^a = Formula de Inicio

^b = Formula de Continuación

II.1.4. Sistemas modelo

Los sistemas modelo se elaboraron con los ingredientes nitrogenados e hidrocarbonados que están presentes en mayor proporción en las fórmulas citadas en el apartado II.1.2. Se seleccionaron concentraciones, temperaturas y tiempos de tratamiento similares a los utilizados en la elaboración de estos productos.

Los ingredientes utilizados para elaboración de los sistemas modelo fueron:

- Carbohidratos: lactosa (LAC), y maltodextrinas (MDX) obtenidos del mercado, y fructo-oligosacaridos (FOS) suministrados por la industria de productos dietéticos.

- Proteínas: caseinato de calcio (CC 2), proteína de suero lácteo baja en lactosa (PSLBL), proteína de suero lácteo (PSL) y proteína de suero lácteo baja en lactosa parcialmente hidrolizada (PSLBLPH) e hidroc caseína, suministradas por la industria de productos dietéticos.

En la tabla II.1.4-1 se pueden ver los diferentes sistemas elaborados y su composición total en carbohidratos y proteínas.

Tabla II.1.4-1: Composición de los sistemas modelo.

Sistema Modelo	% Carbohidratos	% Proteínas	Tipo/Estado
FOS-Hidroc caseína	Fructo-oligosacaridos (27,18)	Hidroc caseína (8,05)	Liquido
FOS-PSLBL	Fructo-oligosacarido (27,18)	PSLBL (8,05)	Liquido
FOS-CC 2	Fructo-oligosacaridos (27,18)	CC 2 (8,05)	Liquido
FOS-PSLBLPH	Fructo-oligosacaridos (27,18)	PSLBLPH (8,05)	Liquido
MDX-PSLBL	Maltodextrina (13)	PSLBL (8,84)	Liquido
MDX-CC 2	Maltodextrina (13)	CC 2 (8,84)	Liquido
MDX-Hidroc caseína	Maltodextrina (13)	Hidroc caseína (8,84)	Liquido
MDX-PSLBLPH	Maltodextrina (27,54)	PSLBLPH (7,94)	Liquido
LAC-PSL	Lactosa (24,61)	PSL (9,9)	Liquido
LAC-CC 2	Lactosa (24,61)	CC 2 (9,9)	Liquido
LAC-Hidroc caseína	Lactosa (24,61)	Hidroc caseína (9,9)	Liquido
LAC-PSLBLPH	Lactosa (27,18)	PSLBLPH (8,05)	Liquido

II.2. MÉTODOS

II.2.1. Elaboración de sistemas modelo

El porcentaje de proteínas de los ingredientes proteicos usados se recoge en la tabla II.2.1-1, y la pureza de los carbohidratos fue cercana al 100%.

Los sistemas modelo fueron elaborados respetando la composición mencionada en la tabla II.1.4-1, siguiéndose para todos el mismo proceso.

Tabla II.2.1-1: Contenido proteico de los ingredientes usados en la elaboración de los sistemas modelo.

Ingrediente Proteico	% Proteína
PSLBL	76
PSL	64
CC 2	90
PSLBLPH	82
Hidrocasaína	90

Los ingredientes fueron pesados en un vaso de precipitado disueltos en agua destilada con ayuda de un agitador magnético y aforados a 100 ml.

Los sistemas modelo fueron calentados a 80, 90 y 100°C durante 3, 6 y 10 minutos. En el caso de los sistemas con FOS también se calentaron a 120°C.

II.2.1.1. Estudios preliminares

Antes de proceder al calentamiento se realizó un estudio previo, para determinar el periodo aproximado de inducción a las temperaturas estudiadas. Los calentamientos se realizaron en un digestor (Multiplaces, Selecta) a las temperaturas y tiempos que se muestran en la tabla II.2.1.1-1, introduciendo tubos con 10 ml de agua destilada y midiendo la temperatura.

Tabla II.2.1.1-1: Temperaturas alcanzadas a diferentes tiempos y temperaturas.

T^a del Baño	3 min	9 min	12 min	16 min
Tiempos estudiados				
80°C	75°C	80°C	80°C	80°C
90°C	80°C	85°C	85°C	85°C
100°C	90°C	92°C	93°C	94°C

De este estudio se tomo como tiempo de inducción a las temperaturas deseadas, 3 minutos, ya que es el menor tiempo en el que se alcanzan los valores más próximos a los deseados.

De igual manera se determinó el pH del agua destilada usada en la elaboración de estos sistemas, siendo de 6,20. Una vez preparados los sistemas también se midió el pH, obteniéndose valores de 6,75 y 6,00 para los sistemas elaborados con proteínas intactas y proteínas hidrolizadas respectivamente.

II.2.2. Determinaciones analíticas

II.2.2.1. Determinación de Hidroximetilfurfural

Fundamento

Determinación por cromatografía líquida de alta resolución del hidroximetilfurfural contenido en ingredientes proteicos y fórmulas infantiles comerciales previa adición de clarificante.

Muestras

Se analizaron las muestras de ingredientes proteicos y fórmulas infantiles comerciales recogidas en los apartados II.1.1. y II.1.3. También se analizó la fórmula D del apartado II.1.2.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución: modelo 500A con detector espectrofotométrico UV/VIS modelo 200, ambos Konic, e integrador Hewlett Packard modelo 3394 A.
- Columna cromatográfica: Kromasil C₁₈ (5µm 250 mm x 4.6 mm) (Sugelabor).
- Centrifuga: Heraeus Christ GMBH de 5000 r.p.m.
- Agitador de tubos: Mixo-tub modelo 30 Gricel.
- Microjeringa: modelo Hamilton de 25 µl.
- Filtros: Millipore de 0,2 y 0,45 µm.
- Rotavapor: Buchi modelo B-480.

Reactivos

- Disoluciones clarificantes:
 - a) Ferrocianuro potásico al 15% (Merck) (Carrez I) y acetato de zinc al 30% (Merck) (Carrez II).
 - b) Ácido tricloroacético (ATC) al 40% (Merck).
- Eluyente: Acetonitrilo para HPLC (Panreac)-agua desionizada (5:95).
- Disolución madre de HMF: 3,57 mg/l de 5-hidroximetilfurfural (Merck).

- Disolvente orgánico para purificación y concentración: Triclorometano para HPLC (Panreac).

Preparación de la muestra

Las muestras almacenadas a -20°C fueron dejadas a temperatura ambiente previo al análisis.

Procedimiento

El análisis de HMF se realizó mediante la técnica desarrollada por este equipo de investigación (Guerra Hernández y col., 1992; García-Villanova y col., 1993) para la determinación de HMF en cereales infantiles y cereales de desayuno incluyendo algunas modificaciones.

Extracción

Técnica A: se depositan aproximadamente 0,8 y 0,4 g de ingrediente proteico y formula comercial respectivamente en tubos de centrífuga de 10 ml, se adicionan 4 ml de agua desionizada y 125 μl de solución clarificante Carrez I y 125 μl de Carrez II, tras lo cual se agitan en agitador de tubos durante 2 minutos. Las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 5000 r.p.m. y se separa el sobrenadante, que se lleva a un matraz aforado de 10 ml.

Se adicionan 3 ml de agua desionizada al precipitado, homogeneizándolo con la ayuda de una varilla de vidrio, se agita durante 2 minutos y se centrifuga de la misma forma que la vez anterior. Se recoge el sobrenadante junto al otro y se repite este procedimiento una vez más. Los tres sobrenadantes obtenidos se llevan a 10 ml y se filtran a través de un filtro de 0,2 μm antes de inyectar.

Técnica B: se depositan aproximadamente 0,8 g de muestra en tubos de centrífuga de 10 ml, se adicionan 3 ml de agua desionizada y 0,5 ml de ácido tricloroacético (ATC), tras lo cual se agitan en agitador de tubos durante 2 minutos. La muestra se centrifuga durante 10 minutos a 5000 r.p.m. y se separa el sobrenadante, que se lleva a un matraz aforado de 10 ml.

Se adicionan 5 ml de agua destilada al precipitado y 0,5 ml de ATC, homogeneizándolo con la ayuda de una varilla de vidrio, se agita durante 2 minutos y se centrifuga de la misma forma que la vez anterior. Se recoge el sobrenadante junto al otro, se llevan a 10 ml, se filtran a través de un filtro de 0,2 μm antes de la inyección.

Purificación y concentración

Se depositan los 10 ml extraídos en una ampolla de decantación, se le adicionan 10 ml de triclorometano y se agita manualmente durante dos minutos, tras lo cual se recoge la fase inferior (fase orgánica) y se repite la extracción 9 veces más. Tras recoger todas las fases orgánicas se adicionan 3 ml de agua desionizada y se elimina en rotavapor todo el disolvente orgánico (2 minutos, 50°C). Por último se filtra la fase acuosa a través de un filtro de 0,2 μm antes del análisis cromatográfico.

Análisis cromatográfico

- Volumen inyectado: 20 µl.
- Flujo: 1 ml/min.
- Condiciones isocráticas.
- Temperatura: 25°C.
- Sensibilidad: 0,01 AUFS.
- Longitud de onda del detector: 284 nm.
- Tiempo de análisis: 15 minutos.

Identificación

Se realizó mediante la adición de patrón de HMF, observando el incremento obtenido y la concordancia con el tiempo de retención.

Determinación

Se utilizó el método de estándar externo.

Curva de calibrado: se realizó una curva de calibrado para cubrir el intervalo de concentraciones de HMF en muestras (0,1 mg/l hasta 0,5 mg/l). Se tomó como ordenada la altura del pico de HMF y como abscisa la concentración del mismo en mg/l.

La ecuación obtenida fue la siguiente:

$Y = 419X - 6,2$	$r^2 = 0,9946$
------------------	----------------

II.2.2.2. Determinación de Furfural

Fundamento

Determinación por cromatografía líquida de alta resolución del furfural contenido en ingredientes proteicos de fórmulas infantiles previa extracción de la matriz y posterior purificación.

Muestras

Se analizaron las muestras de ingredientes proteicos y fórmulas infantiles recogidas en los apartados II.1.1. y II.1.3.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200
- Cromatógrafo líquido de alta resolución: Waters 600 controller, con detector espectrofotométrico UV/VIS modelo 200, y programa integrador Millennium chromatography manager. Inyector manual.

- Columna cromatográfica: Kromasil C₁₈ (5µm 250 mm x 4,6 mm) (Sugelabor).
- Centrifuga: Heraeus Christ GMBH de 5000 r.p.m.
- Agitador de tubos: Mixo-tub modelo 30 Gricel.
- Microjeringa: modelo Hamilton de 25 µl.
- Filtros: Millipore de 0,2 y 0,45 µm.
- Rotavapor: Buchi modelo B-480.

Reactivos

- Disoluciones clarificantes:
 - a) Ferrocianuro potásico al 15% (Merck) (Carrez I) y acetato de zinc al 30% (Merck) (Carrez II).
 - b) Ácido tricloroacético (ATC) al 40% (Merck).
- Eluyente: Acetonitrilo para HPLC (Panreac)-agua desionizada (5:95).
- Disolución madre de furfural: 2320 mg/l de 2-furancarbaldehído (Merck).
- Disolvente orgánico para purificación y concentración: Triclorometano para HPLC (Panreac).

Preparación de la muestra

Las muestras almacenadas a -20°C fueron dejadas a temperatura ambiente previo al análisis.

Procedimiento

Es el mismo empleado para la determinación de HMF (se usa la misma muestra).

Análisis cromatográfico

- Volumen inyectado: 50 µl.
- Flujo: 1 ml/min.
- Condiciones isocráticas.
- Temperatura: 25°C.
- Sensibilidad: 0,002 AUFS.
- Longitud de onda del detector: 277 nm.
- Tiempo de análisis: 15 minutos.

Identificación

Se realizó mediante la adición de furfural patrón, observando el incremento obtenido y la concordancia con el tiempo de retención.

Determinación

Se utilizó el método de estándar externo.

Curva de calibrado: se realizó una curva de calibrado para cubrir el intervalo de concentraciones de furfural en muestras (0,00575 mg/l hasta 0,115 mg/l). Se tomó como

ordenada la altura del pico de furfural y como abscisa la concentración del mismo en mg/l.

La ecuación obtenida fue la siguiente:

$Y = 1 \times 10^6 X - 554,25$	$r^2 = 0,9999$
--------------------------------	----------------

II.2.2.3. Determinación de Furosina

Fundamento

Determinación por cromatografía líquida de alta resolución del ϵ -N-furoilmetil-L-lisina (furosina) generada mediante hidrólisis ácida.

Muestras

Se analizaron las muestras de ingredientes proteicos de fórmulas infantiles, fórmulas y sistemas modelo, recogidas en los apartados II.1.1., II.1.2., II.1.3. y II.1.4.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución: Waters 600 controller, con detector espectrofotométrico UV/VIS modelo 200, y programa integrador Millennium chromatography manager. Inyector manual.
- Columna cromatográfica: C₈. Furosine-dedicated (250 x 4,60 mm i.d.). (Alltech).
- Cartuchos de extracción en fase sólida: Sep-pack C₁₈ (Millipore).
- Rotavapor: Buchi modelo B-480.
- Horno Pasteur: Selecta.
- Tubos pyrex de 19 cm de altura y 1 cm de diámetro con tapón de rosca y junta de teflón (Sugelabor).
- Baño de agua: Selecta

Reactivos

- Furosina patrón del 74,4% de pureza (Neosystem laboratoires).
- Metanol para HPLC (Panreac).
- Ácido clorhídrico 7,95 M y 3 M (Panreac).
- Ácido acético glacial para HPLC (Panreac).
- Cloruro potásico (Panreac).
- Eluyente A: disolución ácido acético 0,4%/agua (V/V).
- Eluyente B: eluyente A/cloruro potásico 0,3% (P/V).
- Disolución madre de furosina de 0,744 mg/ml.

- Disolución de calibración: a partir de diluciones obtenidas de la disolución madre de furosina se mezclaron con hidrolizado de leche cruda.

Preparación de la muestra

Las muestras almacenadas a -20°C fueron dejadas a temperatura ambiente previo al análisis.

Procedimiento

El análisis de furosina se realizó siguiendo la técnica desarrollada por Resmini y col. (1990) con ligeras modificaciones.

Formación de furosina

Se adicionan aproximadamente entre 0,052 y 0,33 g de muestra (6,5 mg de proteína/ml de HCl 7,95 M) para los ingredientes proteicos y 0,050 gramos aproximadamente (0,75 mg de proteína/ml de HCl 7,95 M) en el caso de las fórmulas A, B C y D, en tubos pyrex con tapón de rosca y junta de teflón junto con 8 ml de ácido clorhídrico 7,95 M. En los sistemas modelo se tomaron entre 0,5 y 0,6 ml (6,0 mg de proteína/ml de HCl 7,95 M). Se burbujea nitrógeno durante 2 minutos y se lleva a estufa a 110°C durante 24 horas.

Purificación

El hidrolizado se filtra y 0,5 ml del mismo se pasan a través de un cartucho Sep-pack C_{18} previamente acondicionado con 5 ml de metanol y 10 ml de agua. La muestra se eluye con ácido clorhídrico 3 M.

Análisis cromatográfico

- Volumen inyectado: 50 μl .
- Flujo: 1,2 ml/min.
- Rampa de elución (tabla II.2.2.3-1)
- Sensibilidad 0,002 AUFS.
- Longitud de onda del detector: 280 nm.
- Tiempo de análisis: 32 minutos.
- Temperatura de la columna: 34°C .

Tabla II.2.2.3-1: Rampa de elución de furosina.

Tiempo (minutos)	% A	% B
0-13	100	0
13-20	100	0
20-22	50	50
22-23	50	50
23-32	100	0
32	100	0

Identificación

Se realizó mediante la adición de patrón de furosina observando el incremento obtenido y concordancia con el tiempo de retención de la furosina patrón.

Determinación

Se realizó por el método de patrón externo.

Curvas de calibrado: para la construcción de las curvas se tomó como ordenada el área del pico de furosina y como abscisa la cantidad del mismo en μg inyectados. Según las concentraciones obtenidas en las muestras se elaboraron dos curvas: curva 1 con concentraciones de 0,000135 a 0,0636 μg y curva 2 de 0,000135 a 0,4132 μg .

Curva 1	$Y = 6 \times 10^6 X + 10718$	$r^2 = 0,9952$
Curva 2	$Y = 6 \times 10^6 X + 46049$	$r^2 = 0,9920$

II.2.2.4. Determinación de lisina útil

Fundamento

Determinación por cromatografía líquida de alta resolución del derivado N- ϵ -dinitrofenil-lisina (N- ϵ -DNP-lisina) obtenido tras hidrólisis y formado por reacción del grupo ϵ -amino de la lisina con fluorodinitrobenceno (FDNB).

Muestras

Se analizaron las muestras de ingredientes proteicos de fórmulas infantiles, fórmulas y sistemas modelo, recogidas en los apartados III.1.1., II.1.2., II.1.3. y II.1.4.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución: Waters 600 controller, con detector espectrofotométrico UV/VIS modelo 200, y programa integrador Millennium chromatography manager. Inyector manual.
- Columna cromatográfica: Nova-Pak C18 (150 X 3,9 mm) (Waters).
- Baño de agua: Selecta.
- Horno Pasteur: Selecta.
- Placa agitadora: Rotaterm Selecta.
- Filtros: Millipore 0,2 μm y 0,45 μm .

- Tubos pyrex de 19 cm de altura y 1 cm de diámetro con tapón de rosca y junta de teflón (Sugelabor).
- pHmetro Radiometer modelo 26.

Reactivos

- N-ε-2,4-DNP-L-lisina HCl (Sigma).
- Etanol absoluto (Panreac).
- 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB) (Sigma).
- HCl 8 N (Panreac).
- Disolución reguladora de acetato de sodio 0,01 M y pH 5: se disuelven 1,36 g de acetato de sodio trihidratado (Merck) en agua desionizada y se llevan a 1000 ml. Ajustar el pH a 5 con HCl 6,9 N.
- NaHCO₃ al 8%: se disuelven 8 g de NaHCO₃ (Panreac) en 100 ml de agua.
- NaOH al 33%: se disuelven 33 g de hidróxido sódico (Panreac) en 100 ml de agua desionizada.
- NaHCO₃ 1M: 16,8020 g de NaHCO₃ (Panreac) se disuelven en 100 ml de agua desionizada.
- Solución madre de ε-DNP-lisina: 100 mg/l de N-ε-2,4-DNP-L-lisina HCl en metanol/agua (1:4).
- Disolución de calibración: se diluye la disolución madre de N-ε-DNP-lisina en disolución reguladora de acetato sódico 0,01M hasta obtener concentraciones de 2, 4, 6, 8, y 10 mg/l.
- Reactivo de derivación: se prepara una disolución de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB) al 3% en etanol absoluto.
- Eluyente: metanol para HPLC (Panreac): tampón acetato de sodio 0,01 M (1:1).

Preparación de la muestra

El método seguido para la determinación de lisina útil está basado en el propuesto por Ramirez-Jimenez y col. (2004c) para la determinación de lisina útil en cereales infantiles con algunas modificaciones.

- *Formación del fluorodinitroderivado*: se parte de una cantidad de muestra que contenga aproximadamente 4 miligramos de proteína, se afora a 10 ml con agua desionizada, seguidamente se deposita 1 ml de la anterior disolución en tubos pyrex de 15 ml con tapón de rosca y junta de teflón junto con 1 ml de NaHCO₃ al 8% y 1,5 ml de FDNB al 3%, se agita durante tres horas a temperatura ambiente y se evapora el etanol por inmersión en un baño a 85°C.

- *Hidrólisis de la muestra*: se adicionan 6 ml de HCl 8 N, se agitan los tubos hasta eliminar el CO₂ y se introducen cerrados en estufa a 110°C durante 24 h. Se filtra en caliente y se enrasa a 25 ml con agua desionizada. A 10 ml de la disolución anterior se le ajusta el pH a 5 con disolución de NaOH 6 M y NaHCO₃ 1M y se enrasa a 25 ml con metanol:tampón acetato (1:1). Se toman 3 ml de la disolución anterior y se limpian con éter etílico (tres veces), eliminando este con pipeta pasteur y las últimas porciones con nitrógeno. La muestra se pasa a través de un filtro de 0,2 µm antes de ser inyectada. El análisis se realizó por duplicado.

Análisis cromatográfico

- Volumen inyectado: 50 µl.
- Flujo: 1ml/min.
- Condiciones isocráticas.
- Temperatura de la columna: 25°C.
- Sensibilidad: 0,02 AUFS.
- Longitud de onda del detector: 360 nm.
- Tiempo de análisis: 10 minutos.

Identificación

Se realizó mediante la adición de patrón de N-ε-DNP-lisina observando el incremento obtenido y la concordancia con el tiempo de retención.

Determinación

Se utilizó el método de estándar externo.

Curvas de calibrado: se realizó una curva de calibrado en la que se tomó como ordenada el área del pico de DNP-lisina y como abscisa la cantidad en miligramos/l.

Las concentraciones de DNP-lisina utilizadas para la obtención de la curva de calibrado están comprendidas entre 1 y 10 mg/l. La ecuación de la recta fue la siguiente:

$Y = 42082X + 2188 \quad r^2 = 0,9903$
--

III.2.2.5. Determinación de pirralina

Fundamento

Determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución de pirralina (ε-pirrol-lisina) contenida en ingredientes proteicos de fórmulas infantiles y en fórmulas, previa hidrólisis enzimática de las proteínas.

Muestras

Se analizaron las muestras de ingredientes proteicos de fórmulas infantiles y fórmulas recogidas en los apartados II.1.1., II.1.2. y II.1.4.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución: Perkin-Elmer modelo 250 con detector diodo Array modelo 235 e integrador-computador Perkin-Elmer

Nelson con programa 1020. Inyector automático Waters 717 y registrador Epson LX 600 junior.

- Columna cromatográfica: Nova-Pack C₁₈ (5 µm 150 X 4,6 mm) (Waters).
- Cartuchos de extracción en fase sólida: Sep-pack C₁₈ (Millipore).
- Filtros: Millipore de 0,2 y 0,45 µm.
- Tubos pyrex de 10 cm de altura y 1 cm de diámetro con tapón de rosca y junta de teflón (Sugelabor).
- pHmetro Crison Basic 20.
- Ultracentrífuga L8-70M (Beckman).
- Orbital incubador cooled (Gallen Kamp).

Reactivos

- Ácido clorhídrico 0,02 N y 1 N (Panreac).
- Timol (Sigma).
- Solución de pepsina 100 U.I./ml (Sigma) en HCl 0,02N: Disolver 100 mg de pepsina (10 U.I./mg) en 10 ml de HCl.
- Solución de pronasa E 27 U.I./ml (Merck) en tampón borato 1 M pH 8,2: Disolver 10 mg de pronasa E (4000 U.I./mg) en 10 ml de tampón borato y hacer una dilución 1/100. De esta dilución tomar 6,75 ml y enrasar hasta 10 ml.
- Solución de leucino-aminopeptidasa 12 U.I./ml (Sigma) en tampón borato 1 M pH 8,2: Diluir 500 µl del enzima (240,8 U.I./ml) hasta 10 ml con tampón borato.
- Solución de prolidasa 17 U.I./ml (Sigma) en tampón borato 1 M pH 8,2: Disolver 1,5 mg de enzima (134 U.I./mg) en 10 ml de tampón borato, tomar 8,6 ml y completar hasta 10 ml con el tampón.
- Hidróxido sódico 1 N (Panreac).
- Tampón borato 1 M pH 8,2: Disolver 6,58 g de NaBO₂ (Panreac) en 50 ml de agua destilada, adicionar HCl 4 N hasta pH 8,2 y completar hasta 100 ml con agua destilada.
- Solución metanol-agua (20:80).
- Metanol para HPLC (Panreac).
- Disolución patrón de pirralina: de 22 picomoles/µl.
- Eluyente: eluyente A compuesto por una solución metanol-agua (2,5:97,5) y eluyente B compuesto por una solución metanol-agua (50:50).

Preparación de la muestra

Las muestras almacenadas a -20°C fueron dejadas a temperatura ambiente previo al análisis.

Procedimiento

El análisis de pirralina se realizó siguiendo la técnica desarrollada por Morales y van Boekel (1996).

- Hidrólisis de la muestra: se parte de una cantidad de muestra que contenga 24 mg de proteínas y se mezcla con 1,2 ml de HCl 0,02 N, un cristal de timol y 300 µl de solución de pepsina. El tubo cerrado se incuba a 40°C durante 24 horas, tras lo cual se ajusta el pH a 8,2 con NaOH 1 N, se adicionan 0,5 ml de solución de pronasa y se incuba otras 24 horas. Por último se adiciona 1 ml de solución de prolidasa y 1 ml de la

solución de leucino-aminopeptidasa y se continúa la hidrólisis 24 horas más (72 horas en total).

- Purificación: tras la hidrólisis se ajusta el pH=6,0-6,2 y se centrifuga a 14000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante es purificado en un Sep-pack (previamente activado con 5 ml de metanol y 10 ml de agua) y la pirralina se eluye con 3 ml de la mezcla metanol:agua (20:80) descartando las tres primeras gotas. El cartucho Sep-pack se limpia con 3 ml de metanol y 5 de agua y se seca con 1 ml de aire.

Análisis cromatográfico

- Volumen inyectado: 20 µl.
- Flujo: 1,2 ml/min.
- Temperatura de la columna: 25°C.
- Sensibilidad: 0,02 AUFS.
- Longitud de onda del detector: 297 nm.
- Tiempo de análisis: 20 minutos.
- Rampa de elución (tabla III.2.2.5-1).

Tabla III.2.2.5-1: Rampa de elución de pirralina.

Tiempo (minutos)	% A	% B
0-2	100	0
2-8	95	5
8-9	95	5
9-14	0	100
14-16	0	100
16-17	100	0
17-20	100	0

Identificación

Se realizó mediante la adición de patrón de pirralina observando el incremento obtenido, y concordancia con el tiempo de retención de la pirralina patrón. También se realizó confirmación con diodo array.

Determinación

Se utilizó el método de estándar externo.

Curvas de calibrado: se realizó una curva de calibrado en la que se tomó como ordenada el área del pico de pirralina y como abscisa la cantidad en picomoles. Las concentraciones de pirralina utilizadas para la obtención de la curva de calibrado se encuentran entre 69 y 550 picomoles en 50 µl de inyección. La ecuación de la recta fue la siguiente:

$$Y = 7936,2 X - 152545 \quad r^2 = 1,0000$$

II.2.2.6. Síntesis y determinación de N^ε-carboximetilisina (CML)

II.2.2.6.1. Síntesis de CML

Fundamento

Síntesis de la N^ε-Carboximetilisina por alquilación reductora del grupo ε-amino de N^α-Boc-L-Lisina con ácido glioxílico seguido por la eliminación del grupo protector (Liardon, 1987).

Material e instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Aparato de hidrogenación (Parr).
- Placas de gel de sílice para cromatografía en capa fina (Merck).
- Columna (bureta) de vidrio (Pobel).
- Rotavapor: Büchi modelo R110.
- Filtros: Millipore de 0,2 μm.
- Horno Pasteur: Selecta.
- Desecador de vidrio con sílica-gel.

Reactivos

- N^ε-Boc-L-Lisina (Sigma).
- Glioxilato de sodio (Panreac).
- Tampón de ácido cítrico 0,1M pH 6: se pesan 3,4 g de ácido cítrico (Panreac) y se afora a 100 ml con agua destilada, y se ajusta pH con NaOH 1M.
- Solución de fenol-agua (4:1): se pesaron 4 g de fenol (Panreac) y se disolvieron con 1 ml de agua desionizada hasta completa disolución.
- Solución de ninhidrina 0,1% en ácido sulfúrico al 5% en etanol: 0,157 mg de ninhidrina (Merck) se disuelven en 150 ml de etanol (Panreac) y 7,5 ml de ácido sulfúrico al 96% (Panreac).
- Celulosa (Panreac).
- Metanol (Merck).
- Solución de HCl 0,1 N: 0,83 ml de HCl 12,06 N (Panreac), se aforan a 100 ml con agua desionizada.
- Carbón activo (Merck).
- Pd/C 10% (Fluka).

Obtención del compuesto

Se depositan 0,365 g de N^ε-Boc-L-Lisina en un tubo de ensayo (15 X 1,5 cm) junto con 0,255g de glioxilato ácido de sodio, 0,03 g (10%) de Pd/C y 3 ml de tampón de ácido cítrico. La mezcla se agita y mezcla bien; el tubo se introduce en un sistema con agitación en presencia de H₂ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo la reacción es monitorizada por cromatografía de capa fina, utilizando placas de gel de sílice como fase estacionaria, fenol-agua (4:1) como fase móvil y ninhidrina como solución reveladora, obteniendo una mancha blanca con un R_f=0,3518. Seguidamente la muestra se filtra, se recoge en un matraz y deseca en rotavapor a 50°C. El residuo se disuelve en 20 ml de etanol y se pasa a través de una columna rellena con celulosa previamente

acondicionada con metanol. El filtrado se recoge y lleva a sequedad en rotavapor; el residuo se deja en desecador bajo vacío durante 48 horas. Para monitorizar la reacción se realizó un RMN de carbonos y protones del residuo obtenido (CML-bloqueada) y de la N^ε-Boc-L-Lisina de partida, lo que indicó la presencia del compuesto esperado (CML). Seguidamente se realiza la hidrólisis del compuesto con HCl 1 N a 70°C durante 75 minutos, tiempo al cabo del cual el exceso de HCl se evapora y el residuo se deja en desecador bajo vacío durante 12 horas. La purificación del compuesto se realiza con 1 ml de agua destilada y una alícuota de carbón activo calentando y agitando unos minutos; finalmente la solución se filtra, obteniéndose un compuesto de color amarillo-pardo, el cual se deseca en rotavapor y se deja en desecador bajo vacío durante 48 horas. Finalmente se obtiene un residuo viscoso amarillo-pardo (CML) el cual se confirmó por RMN de protones (figura 5), carbonos (figura 6) y por espectrometría de masas de alta resolución empleando la técnica de ionización FAB⁺ (figura 7).

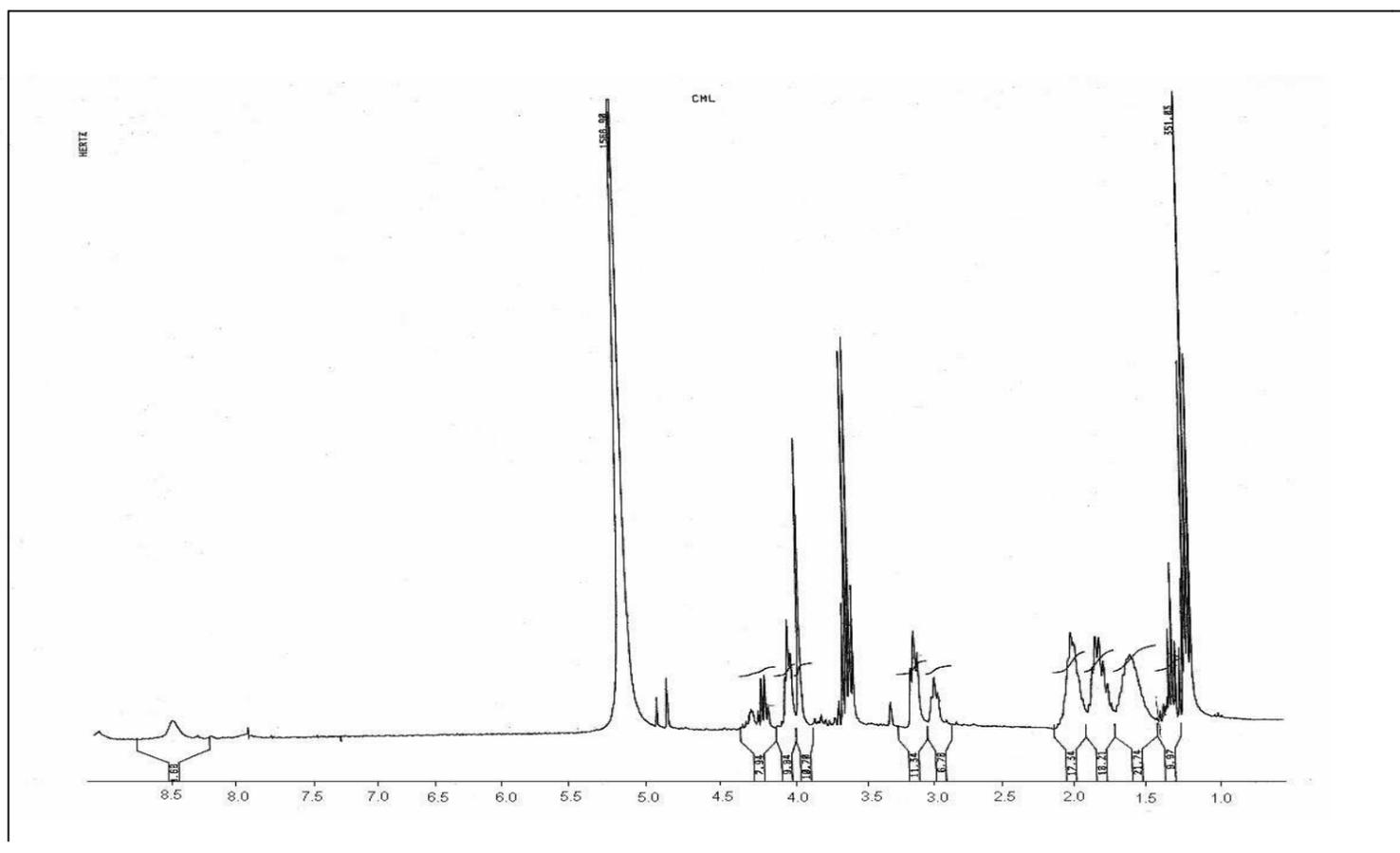


Figura 5: Espectro de RMN de protones de CML.

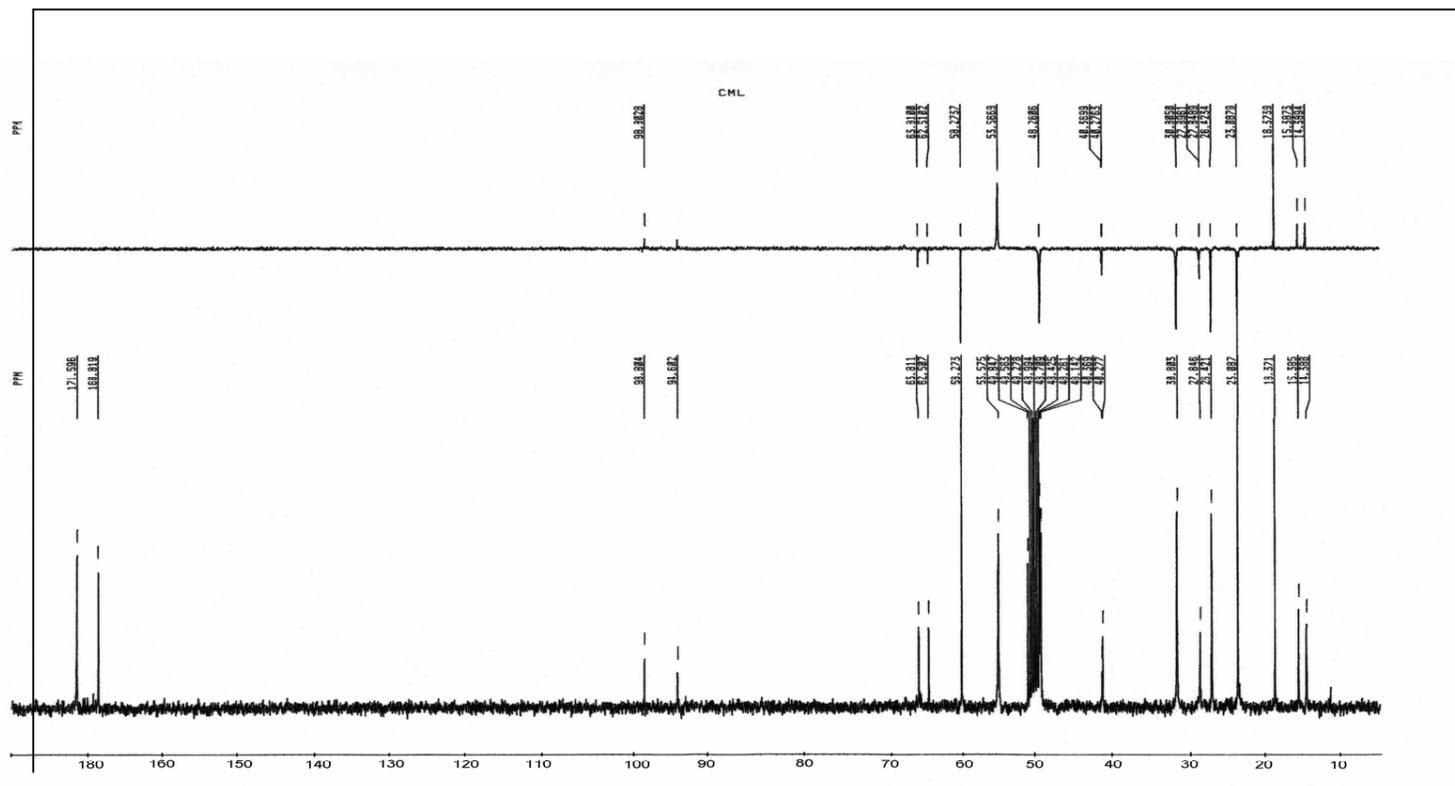


Figura 6: Espectro de RMN de carbonos de CML.

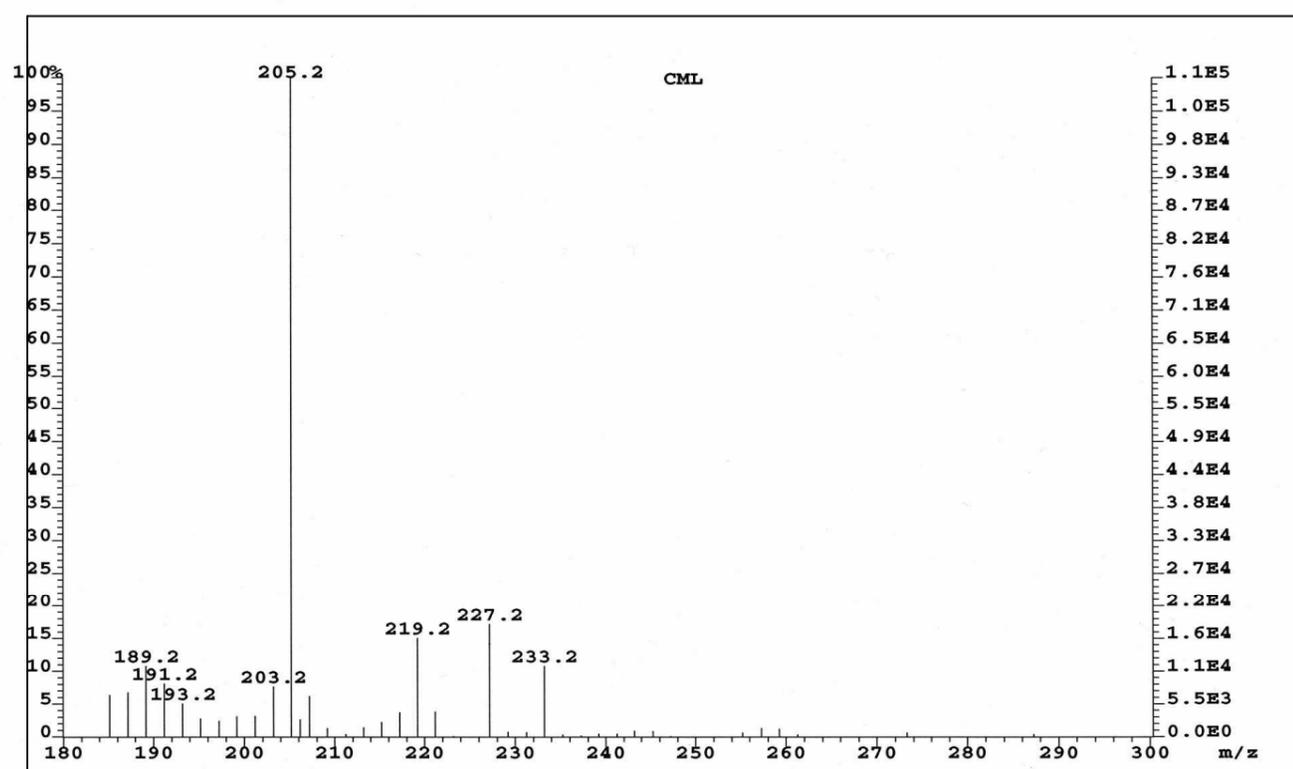


Figura 7: Espectro de masas de alta resolución de CML.

II.2.2.6.2. Determinación de CML

Fundamento

Determinación por cromatografía líquida de alta resolución del N^ε-Carboximetilisina (CML) contenido en las muestras, extraído previa reducción e hidrólisis ácida.

Muestras

Se analizaron las fórmulas infantiles recogidas en los apartados II.1.1. y II.1.2. (A, B y C planta industrial), en el paso 1 del procesado, punto 0 de conservación, conservación a 30° C durante 15 meses y conservaciones a 30° C durante 1 y 4 semanas a Aw: 0,65.

Material e instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución: modelo 230 plus con detector de fluorescencia modelo 363, ambos Varian, y programa integrador Varian. Inyector manual de 20µl.
- Columna cromatográfica: Tracer Excel 120 ODSA 5µm 25x0,46 (Teknokroma)
- Rotavapor: Büchi modelo R110.
- Horno Pasteur: Selecta.
- Tubos pyrex con tapón de rosca y junta de teflón.
- Microjeringa: modelo Hamilton de 25 µl.
- Filtros: Millipore de 0,2 µm.

Reactivos

- Disolución de tampón borato 0,4M pH 9,5: 3,814g de borato de sodio (Panreac) se disolvieron y aforaron a 100 ml con agua desionizada, y el pH se ajustó con HCl 6N.
- Disolución de tampón borato 0,25M pH 9,5: 2,384g de borato de sodio (Panreac) se disolvieron y aforaron a 100 ml con agua desionizada, y el pH se ajustó con HCl 6N.
- Disolución de tampón borato 0,2M pH 9,5: 1,907g de borato de sodio (Panreac) se disolvieron y aforaron a 100 ml con agua desionizada, y el pH se ajustó con HCl 6N.
- Disolución de borohidruro sódico 1M en NaOH 0,1M: se pesan 0,3783g de borohidruro sódico (Sigma) y se aforan a 10 ml con NaOH 0,1 M.
- HCl 12,06M (Panreac).
- Disolución de o-phtaldialdehído (OPA): se pesan 50mg de OPA (Merck), y disuelven con 1 ml de metanol para HPLC (Panreac); seguidamente se adicionan 3 ml de tampón borato 0,4M pH 9,5, 50µl de mercaptoetanol (Merck), y finalmente 2 ml más de tampón borato. Se trabaja con una dilución a la mitad de esta.

- Eluyente A (tampón fosfato 0,015M, pH 7,2): 2,34g de fosfato monosodico y 2,13g fosfato disodico fueron pesados y aforados a 1l con agua desionizada, el pH se ajustó con HCl 6N
- Eluyente B: acetonitrilo para HPLC (Panreac).

Preparación de la muestra

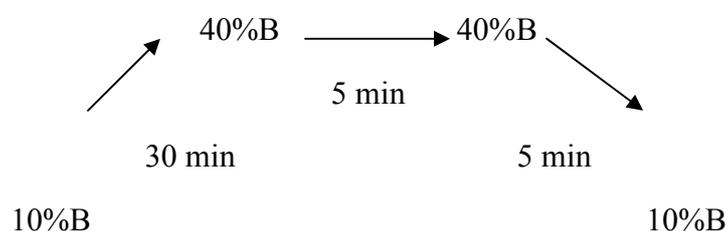
El análisis de CML se realizó siguiendo el método de Drusch y col. (1999) con algunas modificaciones.

Se depositan 0,5 ml de formula previamente reconstituida (1,2 g aforados a 10 ml con agua desionizada) en tubos pyrex con tapón de rosca y junta de teflón, junto con 1,5 ml de tampón borato 0,2 M pH 9,5 y 1 ml de borohidruro sódico 1 M y se dejan a temperatura ambiente durante 4 horas para que tenga lugar la reducción. Seguidamente se adicionan 0,5 ml de HCl 12,06 M, se dejan reaccionar y finalmente se adicionan 2,5 ml más de HCl, hasta obtener una concentración final de 6 M, se pasa N₂ por 2 minutos, se cierran los tubos y finalmente se llevan a hidrólisis a 110°C/20 horas.

El contenido de los tubos es trasvasado a un matraz de 50 ml y llevados a sequedad en rotavapor a 60° C. El residuo se disuelve en 5 ml de agua desionizada y se filtra, se lleva nuevamente a sequedad en rotavapor y disuelve en 10 ml de tampón borato 0,25 M pH 9,5, se pasa por filtro de 0,2 µm, y se inyecta.

Análisis cromatográfico

- Volumen inyectado: 20 µl.
- Flujo: 0,8 ml/min.
- Temperatura: ambiente.
- Sensibilidad: estándar.
- Ganancia: X10
- Longitudes de onda del detector: 340 nm de excitación y 455 nm de emisión.
- Tiempo de análisis: 40 minutos.
- Rampa de elución:

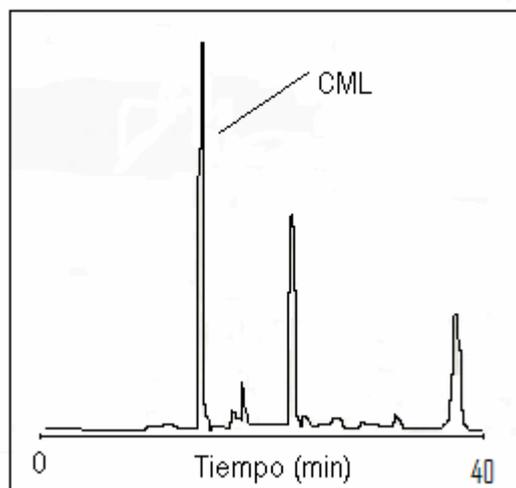


Identificación

Se realizó mediante la adición de patrón CML sintetizado (figura 8), observando el incremento obtenido y la concordancia con el tiempo de retención, previa derivatización con OPA (500µl de tampón borato 0,4M pH 9,5+100µl de muestra+50µl de OPA) e inyección tras 5 minutos en oscuridad. Así mismo, la identidad y pureza

(9%) fue confirmada por comparación con un patrón cedido por el Instituto del Frio (CSIC) de Madrid.

Figura 8: Cromatograma de patrón CML.



Determinación

Se utilizó el método de estándar externo.

Curva de calibrado: se realizó una curva de calibrado en la que se tomó como ordenada el área del pico de CML y como abscisa la cantidad en g/ml. Las concentraciones de CML utilizadas para la obtención de la curva de calibrado se encuentran entre $1,9 \times 10^{-5}$ y $9,5 \times 10^{-4}$ g/ml. La ecuación de la recta fue la siguiente:

$$Y = 1 \times 10^6 X + 98635 \quad r^2 = 1,0000$$

II.2.2.7. Determinación de fluorescencia

Fundamento

Determinación espectrofluorimétrica a 345 nm de excitación y 415 nm de emisión de los compuestos fluorescentes no ligados a proteínas separados mediante precipitación con ácido tricloroacético (ATC) y posterior centrifugación.

Muestras

Se analizaron las muestras de fórmulas infantiles, y sistemas modelo, recogidas en los apartados II.1.2. y II.1.4.

Instrumental

- Espectrofluorímetro Perkin Elmer modelo 204 .
- Centrífuga: Heraeus Christ GMHB de 5000 r.p.m.

Reactivos

- Disolución de ATC 40% (Sigma) en agua.
- Tampón fosfato 0,02 M pH 7 y ClNa 0,015 M: disolver 0,4228 g de fosfato monosódico anhidro (Panreac), 1,4640 g de fosfato disódico anhidro (Panreac) y 0,8766 g de cloruro sódico (Sigma) en 1 l de agua destilada.
- Disolución de sulfato de quinina (Merck): 1 mg/l en H₂SO₄ (Merck) 0,1N.

Preparación de la muestra

Para la determinación de los compuestos fluorescentes no unidos a proteínas se procede a la precipitación de estas con TCA. Para ello a 1 ml de fórmula infantil previamente reconstituida (0,12 g/ml) con agua desionizada, o sistema modelo se le adiciona 1 ml de TCA 40% y se centrifuga durante 15 minutos a 4500 r.p.m.

Procedimiento

La técnica fluorimétrica utilizada está basada en el método de determinación de compuestos fluorescentes de Morales y Jiménez-Pérez (2001).

Se toman 500 µl del sobrenadante previamente obtenido y se añaden 2,5 ml de tampón fosfato, midiendo la fluorescencia a una $\lambda_{\text{ex}} = 345$ nm y una $\lambda_{\text{em}} = 415$ nm frente a un patrón de sulfato de quinina de 1 mg/l.

II.2.2.8. Determinación de reflectancia

Fundamento

Medida de los parámetros colorimétricos L*, a* y b*, utilizados como sistema de medida oficial de la Comisión Internacional de Iluminación (CIE), mediante espectrofotometría de reflectancia.

Muestras

Se analizaron las muestras de fórmulas infantiles recogidas en el apartado II.1.2.

Instrumental

- Espectroradiómetro modelo PR-704/pc SpectraScan (PhotoResearch).
- Cámara especial (modelo CAC 120 de Verivide).
- Iluminación estándar (D₆₅).
- Blanco estándar de referencia.
- Placas petri (Ø = 9 cm).

Preparación de la muestra

Las muestras almacenadas a -20°C fueron descongeladas previo a su análisis manteniéndolas a temperatura ambiente. Las muestras son depositadas en placas petri y compactadas lo más homogéneamente posible, ejerciendo siempre una presión similar con un embolo metálico de diámetro ligeramente inferior al de la placa.

Procedimiento

Tras la calibración del espectroradiómetro con el blanco estándar se introducen las muestras en la cámara especial y se efectúan las medidas utilizando un sistema de colorimetría triestímular (X, Y, Z) como se sugiere en el CIE 1931, (1986). A partir de estos valores, las coordenadas de cromaticidad (L*, a* y b*) de cada muestra fueron calculados. El índice de amarillez fue calculado con la siguiente fórmula: $YI = 142,86b^*/L^*$ (Pagliarini y col., 1990). La lectura fue tomada 8 veces en cada muestra, 4 en un mismo punto y 4 moviendo el campo.

II.2.2.9. Determinaciones complementarias

II.2.2.9.1. Determinación de extracto seco

Fundamento

Determinación gravimétrica del residuo, expresado en porcentaje en peso, obtenido a partir de una cantidad conocida de fórmula desecada.

Muestras

Se analizaron los ingredientes y fórmulas infantiles recogidos en los apartados II.1.1. y II.1.2.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Horno Pasteur: Selecta.
- Pesasustancias de vidrio de 2 cm de altura y de 6 cm de diámetro.

Preparación de la muestra

Las muestras fueron descongeladas previo análisis a temperatura ambiente.

Procedimiento

El análisis de las muestras se realizó siguiendo el método n° 927.05 de la Asociación Oficial de Analistas Químicos (AOAC, 1990).

Secar el pesasustancias a 102°C durante 30 minutos, colocar el pesasustancias tapado en un desecador, dejarlo enfriar y pesarlo. Poner 1,5 g de muestra e introducir en estufa a 100°C durante 5 horas, enfriar en desecador y pesar. Repetir la operación hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas no sea mayor de 0,5 mg.

Cálculos

$$\text{Contenido en extracto seco \%} = (P - P' / P) \times 100$$

P' = Peso en gramos de la muestra tras la desecación.

P = Peso en gramos de la muestra antes de la desecación.

II.2.2.9.2. Determinación de proteínas

Fundamento

El contenido en proteína es el resultado de multiplicar el contenido en nitrógeno, determinado por el método Kjeldahl, por 6,40, establecido como factor de transformación del nitrógeno en proteína para leche y productos lácteos.

Muestras

Se analizaron los ingredientes y fórmulas infantiles recogidos en los apartados II.1.1, II.1.2 y II.1.3.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Aparato Kjeldahl: Büchi modelo B-316.
- Placa calefactora: Bloc Digest 12 (Selecta).

Reactivos

- Catalizador: 100 g de sulfato potásico (Merck), 6 g de sulfato de cobre (Merck) y 1 g de selenio (Merck) triturados y homogeneizados.
- Ácido sulfúrico concentrado (Panreac).
- Disolución de hidróxido sódico al 33% (p/v) (Panreac).
- Disolución titulante: ácido clorhídrico 0,0995 N (Merck).
- Indicador: 0,2 g de rojo de metilo (Merck) y 0,1 g de azul de metileno (diluidos ambos en 100 ml de etanol al 95%).
- Disolución de ácido bórico al 4% (Panreac).

Preparación de la muestra

Las muestras fueron descongeladas previo análisis a temperatura ambiente.

Procedimiento

El análisis de las muestras se realizó siguiendo el método n° 920.105 de la Asociación Oficial de Analistas Químicos (AOAC, 1990).

Se depositan alrededor de 0,20 g de ingrediente proteico y 5 g de fórmula infantil en un tubo de digestión. Se adiciona también 2 g de catalizador, 20 ml de ácido sulfúrico concentrado y unas perlas de vidrio. Se lleva a la placa calefactora donde se realiza la digestión durante 30 minutos a 200°C, 90 minutos a 400°C y 30 minutos en extracción de vapores. Posteriormente se adicionan 25 ml de agua destilada.

En el aparato de destilación, se ajusta el tubo de digestión y se coloca un matraz erlenmeyer de 250 ml de capacidad que contiene 50 ml de ácido bórico al 4% y unas gotas de indicador.

Se adiciona disolución de hidróxido sódico al 33% al tubo Kjeldahl de digestión hasta cambio de color y se procede a su destilación con vapor de agua durante 6 minutos. Se recogen aproximadamente 150 ml de destilado y se valora el borato producido con disolución de ácido clorhídrico.

Calculos

$$\% \text{ Nitrógeno} = (V \times 0,00995 \times 1,4)/P$$

V = ml de HCL 0,00995 gastados en la valoración.

P = peso de la muestra en gramos

$$\% \text{ Proteínas} = \%N \times 6,40$$

6,40 = factor de conversión de nitrógeno en proteínas para leche y productos lácteos.

II.2.2.9.3. Determinación de azúcares

Fundamento

Determinación de los mono, di y trisacáridos mediante cromatografía gaseosa previa formación de los derivados trimetilsililados de sus oximas.

Muestras

Se analizaron los ingredientes recogidos en el apartado II.1.1.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Cromatógrafo de gases: Autosystem GC (Perkin Elmer) e integrador-computador Perkin-Elmer Nelson con programa 1020.
- Columna cromatográfica: Columna capilar Chrompack CP-SIL 5 CB de 25 m x 0,25 mm y 0,25 μ m (Sugelabor).
- Microjeringa graduada: Hamilton-Bonaduz 7002 de 2 μ l.
- Horno Pasteur: Selecta.
- Rotavapor: Buchi modelo B-480.
- Centrifuga: Heraeus Christ GMBH de 5000 r.p.m.

Reactivos

- Disolución de TCA al 40% (Panreac).
- Disolución etanol-agua (50:50) (Panreac).
- Acetona (Panreac).
- Disolución de clorhidrato de hidroxilamina 5% (Sigma) en piridina (Panreac).
- Sulfato magnésico (Sigma).
- Hexametildisilazano (HMDS) (Merck).
- Ácido trifluoroacético (TFA) (Merck).
- Hexano (Sigma).
- Patrón interno: disolución de trehalosa al 0,5% (Sigma) y mioinositol al 0,25% (Sigma) en metanol-agua (60:40).
- Azúcares patrón: galactosa, sacarosa, lactosa, maltosa, maltotriosa (Sigma) y glucosa (Merck).

Preparación de la muestra

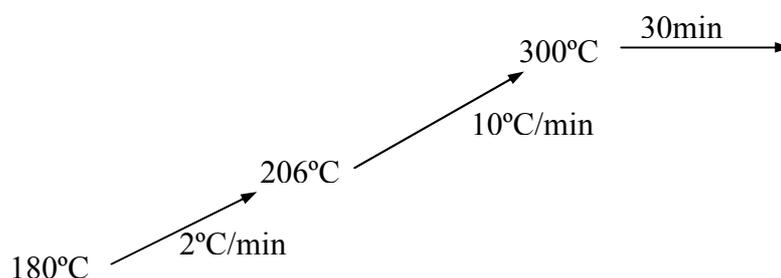
Se parte de 2 g aproximadamente de cada ingrediente proteico y se aforan a 25 ml con agua desionizada. A 1 ml de la disolución anterior se le adiciona 1 ml de TCA 40% y se centrifuga a 4500 r.p.m. durante 10 minutos. Se toma 1 ml de sobrenadante y se adicionan 9 ml de disolución de etanol-agua (1:1), se agita y se deja reposar. De la disolución resultante se toma 1 ml y se adiciona 1 ml de patrón interno, se deseca en rotavapor y finalmente se termina de secar con nitrógeno. Para realizar el proceso de oximación se añaden 1 ml de clorhidrato de hidroxilamina y se llevan a 75°C/30 minutos. En los FOS no es necesario precipitar, se parte de 1 g de muestra y se realiza el mismo procedimiento.

Procedimiento

El análisis de mono, di y trisacáridos se realizó siguiendo el método de Troyano y col. (1992). Se toma 1 ml de la solución anteriormente preparada y se generan los trimetilsilil derivados de los azúcares mediante adición de 1 ml de HMDS, 100 μ l de TFA y calentamiento a 60°C durante 1 hora en tubos con tapón de rosca. Posteriormente se enfría, se adicionan 100 μ l de hexano, se agita y se añaden 1 ml de agua. Tras agitación y reposo se forman dos capas y se procede al análisis de los derivados contenidos en el hexano (capa superior).

Análisis cromatográfico

- Volumen inyectado: 1,5 μ l.
- Temperatura del inyector: 270°C.
- Temperatura del detector: 300°C.
- Detector: detector de ionización de llama (FID).
- Splitt 1:35.
- Flujo del gas portador (N_2): 1,43 ml/min.
- Tiempo de análisis: 50 minutos.
- Programa de temperatura y tiempos:



Identificación

La identificación se realizó mediante concordancia con el tiempo de retención de los derivados obtenidos de los patrones y de los diversos azúcares.

Determinación

Se realizó por el método de patrón interno: mioinositol (0,25%) para monosacáridos y trehalosa (0,5%) para disacáridos y trisacáridos.

Curvas de calibrado: se construyeron tres curvas de calibrado, una para glucosa, maltosa y maltotriosa, otra para lactosa y galactosa y una para la sacarosa. Las concentraciones de los azúcares de las rectas estaban comprendidas entre 0,4375-7% para glucosa, maltosa y lactosa, 0,25-4% para sacarosa y maltotriosa, y 0,0625-1% para la galactosa. Las ecuaciones obtenidas son:

GLUCOSA	$Y = 0,4901 X - 0,007$	$r^2 = 0,9999$
---------	------------------------	----------------

LACTOSA	$Y = 0,185 X + 0,0669$	$r^2 = 0,9944$
---------	------------------------	----------------

MALTOTRIOSA	$Y = 0,1648 X - 0,0231$	$r^2 = 0,9992$
-------------	-------------------------	----------------

SACAROSA	$Y = 0,1398 X - 0,0004$	$r^2 = 1,0000$
GALACTOSA	$Y = 0,3549 X + 0,005$	$r^2 = 0,9978$
MALTOSA	$Y = 0,2392 X - 0,011$	$r^2 = 1$

II.2.2.9.4. Determinación de ácidos grasos

Fundamento

Determinación por cromatografía gaseosa de los ácidos grasos previa formación de los correspondientes esteres metílicos.

Muestras

Se analizaron las fórmulas infantiles recogidas en el apartado II.1.2.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Cromatógrafo de gases: Autosystem GC (Perkin Elmer) e integrador-computador Perkin-Elmer Nelson con programa 1020.
- Columna cromatográfica: Columna capilar SP-2330 de 30 m x 0,75 mm (Teknokroma, Barcelona, España).
- Microjeringa graduada: Hamilton-Bonaduz 7002 de 2 μ l.
- Horno Pasteur: Selecta.
- Rotavapor: Buchi modelo B-480.
- Centrifuga: Heraeus Christ GMBH de 5000 r.p.m.
- Refrigerante.
- Mechero, trípode y rejilla.

Reactivos

- Cloroformo (Sigma).
- Metanol (Sigma)
- Butil hidroxil anisol (BHA) (Sigma).
- Hexano (Panreac).
- Disolución de metilato sódico: se disuelven 5 g de sodio metal en 1000 ml de metanol absoluto.
- Disolución de ácido sulfúrico al 3% en metanol (Sigma).
- Disolución saturada de NaCl.
- Patrón interno: ácido margárico C17 en hexano (20 mg/ml).
- Esteres metílicos patrón de ácidos grasos (Sigma).

Preparación de la muestra

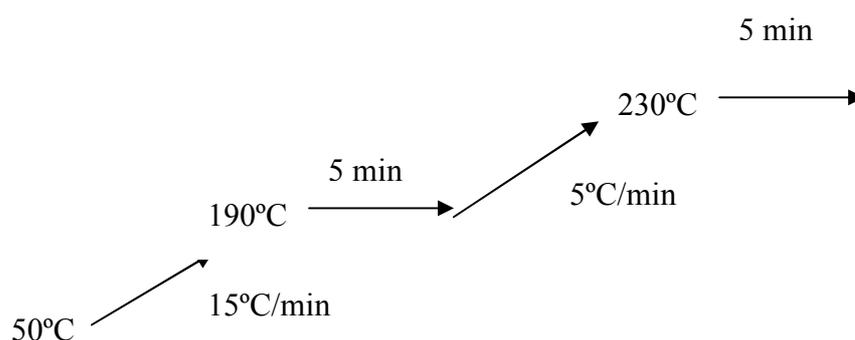
Para la extracción de la grasa se siguió el método de Folch y col. (1957). Se parte de 1,2 g aproximadamente de cada fórmula y se añoran a 10 ml con agua desionizada. A 2 ml de la disolución anterior se le adiciona 20 ml de solución cloroformo-metanol (2:1), 2 ml de antioxidante butil hidroxil anisol (BHA) 1500 ppm y 200 μ l de patrón interno C17 (20 mg/ml), se agitan durante 30 minutos en un erlenmeyer ámbar de 250 ml provisto de un tapón de caucho. Seguidamente esta solución es centrifugada a 4500 rpm durante 10 minutos obteniéndose tres capas. Se toma la capa clorofórmica (inferior) y deseca en rotavapor a 35°C.

Procedimiento

Se generan los ésteres metílicos mediante adición de 6 ml de metilato sódico y calentando durante 5 minutos en un sistema con refrigerante; una vez que ha dejado de ebulir se adicionan 6 ml de H₂SO₄ al 3% y se calienta durante 5 minutos más. Una vez frío se adicionan 4 ml de hexano y solución saturada de NaCl hasta separar la fase etérea, la cual es extraída con pipeta pasteur e inyectada.

Análisis cromatográfico

- Volumen inyectado: 2,0 μ l.
- Temperatura del inyector: 250°C.
- Temperatura del detector: 300°C.
- Detector: detector de ionización de llama (FID).
- Splitt 1:35.
- Flujo del gas portador (N₂): 1,43 ml/min.
- Tiempo de análisis: 30 minutos.
- Programa de temperatura y tiempos:



Identificación

La identificación se realizó mediante concordancia con el tiempo de retención de los derivados obtenidos de los patrones y de los diversos ésteres metílicos patrón.

Determinación

Se realizó por el método de patrón interno: ácido margárico (C17).

Curvas de calibrado: se construyeron dos curvas de calibrado, una para el C12, C16 y C18, y otra para el C8, C10, C14, C18:1, C18:2, C18:3, C20 y C22. Mediante estas curvas se obtuvieron los factores de respuesta de cada ester metílico con respecto al patrón interno de referencia. Cada recta fue inyectada tres veces, obteniéndose los siguientes factores de respuesta: 1,0527 (C8), 0,989 (C10), 0,913 (C12), 0,958 (C14), 0,908 (C16), 0,947 (C18), 0,914 (C18:1), 0,997 (C18:2), 1,13 (C18:3), 1,015 (C20), 1,061 (C22). Las concentraciones de los esteres metílicos de las rectas estaban comprendidas entre 0.00094 - 0.015 mg/ml para el C12, C16 y C18, y 0,0005 – 0,008 mg/ml para, el C6, C10, C14, C18:1, C18:2, C18:3, C20 y C22.

Cálculos

$$\text{mg Ácidos grasos/ml} = \text{FR} \times \text{mg Patrón} \times \text{R.áreas (Ácidos grasos/Patrón)}$$

FR = Factor de respuesta

Patrón = C₁₇

R. áreas = relación de áreas

$$\% \text{Ácidos grasos} = (\text{mg Ácidos grasos/mg de muestra}) \times 100$$

II.2.2.9.5. Índice de peróxidos

Fundamento

Determinación del oxígeno activo contenido en grasa, mediante la valoración del I₂ liberado por la oxidación del IK en medio ácido el cual es proporcional a los peróxidos existentes.

Muestras

Se analizaron las fórmulas infantiles recogidas en el apartado II.1.2.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Horno Pasteur: Selecta.
- Rotavapor: Buchi modelo B-480.
- Centrifuga: Heraeus Christ GMBH de 5000 r.p.m.

Reactivos

- Cloroformo (Sigma).
- Metanol (Sigma)
- Acido acético glacial (sigma).
- Disolución saturada de yoduro potásico (Panreac).
- Disolución de tiosulfato sódico (Panreac) 0.01N.
- Disolución de almidón (Panreac) al 1%.

Preparación de la muestra

Para la extracción se siguió el método de Folch y col. (1957). Se parte de 3 g aproximadamente de cada formula y se aforan a 25 ml con agua desionizada. A 10 ml de la disolución anterior se le adicionan 40 ml de solución cloroformo-metanol (2:1), y se agitan durante 30 minutos en un erlenmeyer ámbar de 250 ml provisto de un tapón de caucho. Seguidamente esta solución es centrifugada a 4500 rpm durante 10 minutos obteniéndose tres capas. Se toma la capa cloroformica (inferior) y deseca en rotavapor a 35°C.

Procedimiento

El análisis del índice de peróxidos en las muestras se realizó siguiendo el método nº 965.33 de la Asociación Oficial de Analistas Químicos (AOAC, 1990) para aceites y grasas.

A la grasa extraída (0,25 g aproximadamente) se le adicionan 4 ml de una mezcla de tres volúmenes de acido acético y un volumen de cloroformo, agitando hasta total disolución de la muestra. Por último se adiciona 1 ml de solución saturada de yoduro potásico, se cierra el matraz y se mantiene en agitación durante un minuto, imprimiéndole un suave movimiento de rotación, conservándolo después en la oscuridad durante cinco minutos. Al cabo de este tiempo se agregan 10 ml de agua y 1 ml de disolución de almidón, se agita vigorosamente y se valora el yodo liberado con disolución de tiosulfato 0,01 N, hasta desaparición del color del complejo I₂ – almidón (azul).

Paralelamente se efectúa una prueba en blanco.

Cálculos

$$\text{Meq O}_2 \text{ activo/Kg de grasa} = \frac{(n-n') N 1000}{P}$$

n= ml de tiosulfato consumido en la valoración

n'= ml de tiosulfato consumido en la prueba en blanco

N= normalidad de la disolución de tiosulfato (0,01N)

P= peso de la grasa

II.2.2.9.6. Determinación de pH

Fundamento

Determinación de la concentración de hidrogeniones mediante pHmetro.

Muestras

Se analizaron los sistemas modelo recogidos en el apartado II.1.4.

Instrumental

- pHmetro Crison Basic 20.

Reactivos

- Soluciones patrón de pH 4,01 y 7,00 (Crison).

Preparación de la muestra

Las muestras congeladas a -20°C fueron descongeladas previo análisis manteniéndolas a temperatura ambiente.

Procedimiento

Se procede a la calibración diaria del pHmetro con las soluciones tampón a 25°C . Posteriormente se procede a la determinación del pH de las muestras, mantenidas a similar temperatura.

III. RESULTADOS

III.1. Determinación de compuestos furánicos (hidroximetilfurfural y furfural)

III.1.1. Análisis de muestras

III.1.1.1. Ingredientes proteicos

Los resultados obtenidos en la determinación de HMF y furfural expresados en mg/kg de muestra y mg/100 g de proteína se pueden observar en la tabla III.1.2.1-1.

Tabla III.1.1.1-1: Contenido de HMF y furfural en ingredientes proteicos de fórmulas infantiles.

Ingredientes	HMF		Furfural
	mg/kg	mg/100g de proteína	
Lactosuero 1	-	-	-
PSLBL	4,60±0,14	0,60±0,02	n.d.
PSL	1,00±0,05	0,16±0,01	n.d.
E-300	7,42±0,19	2,47±0,06	n.d.
Lactosuero 2	0,26±0,04	0,16±0,03	n.d.
Lactosuero 3	0,29±0,02	0,22±0,02	n.d.
CC 1	n.d.	n.d.	n.d.
CC 2	n.d.	n.d.	n.d.
CC 3	n.d.	n.d.	n.d.
CS	n.d.	n.d.	n.d.
APS	n.d.	n.d.	n.d.
P. Soja	n.d.	n.d.	n.d.
Soja Austria	0,21±0,04	0,05±0,01	n.d.
PSLBLPH	n.d.	n.d.	n.d.
Hidrocasaína	n.d.	n.d.	n.d.

n=2

n.d.=no detectado

III.1.1.2. Fórmulas infantiles

Los resultados obtenidos en la determinación de HMF y furfural expresados en mg/kg de muestra y mg/100 g de proteína de la formula D se pueden observar en la tabla III.1.1.2-1.

Tabla III.1.1.2-1: Contenido de HMF y furfural en la formula D.

	HMF		Furfural	
	mg/kg	mg/100g de proteína	mg/kg	mg/100g de proteína
Mezcla de ingredientes	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Producto final	0,22±0,05	0,16±0,06	n.d.	n.d.
3 meses/30°C	0,59±0,03	0,44±0,07	n.d.	n.d.
12 meses/30°C	0,99±0,05	0,74±0,06	n.d.	n.d.
24 meses/30°C	1,04±0,07	0,77±0,08	n.d.	n.d.

n=2

n.d.=no detectado

III.1.1.3. Fórmulas infantiles comerciales

Los resultados obtenidos en la determinación de HMF y furfural expresados en mg/kg de muestra y mg/100 g de proteína se pueden observar en la tabla III.1.1.3-1.

Tabla III.1.1.3-1: Contenido de HMF y furfural en fórmulas infantiles comerciales.

Fórmulas	HMF		Furfural	
	mg/kg	mg/100g de proteína	mg/kg	mg/100g de proteína
1 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2 ^b	2,28±0,39	1,57±0,27	0,17±0,01	0,12±0,01
3 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4 ^a	1,28±0,00	1,07±0,00	0,31±0,05	0,26±0,04
5 ^a	5,01±0,13	4,82±0,13	0,08±0,01	0,08±0,01
6 ^b	3,45±0,03	2,97±0,03	0,12±0,00	0,10±0,00
7 ^b	5,17±0,33	4,14±0,26	0,08±0,00	0,06±0,00
8 ^a	2,08±0,07	1,73±0,06	0,19±0,01	0,16±0,01
9 ^b	4,52±0,05	3,10±0,03	0,14±0,00	0,10±0,00
10 ^{a*}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11 ^{a*}	4,59±0,04	3,99±0,03	0,16±0,01	0,14±0,01
12 ^{b*}	14,2±0,50	11,7±0,41	0,62±0,04	0,51±0,03
13 ^{a*}	2,27±0,02	1,83±0,02	0,08±0,00	0,06±0,00
14 ^a	4,92±0,09	3,46±0,06	0,06±0,00	0,04±0,00

n=2

n.d.=no detectado

^a = Fórmulas de Inicio^b = Fórmulas de Continuación

* = Fórmulas parcialmente hidrolizadas

III.2. Determinación de furosina

III.2.1. Estudios preliminares

Se realizó un estudio para optimizar la transformación de los compuestos de Amadori a furosina para cada tipo de fórmula A, B y C tomando diferentes cantidades de proteínas e hidrolizando bajo las mismas condiciones. Las concentraciones analizadas expresadas en mg de proteína/ml de HCl de hidrólisis fueron 0,28, 0,71, 1,42, 2,83 y 6,37 para las fórmulas A y B, y 0,33, 0,82 y 6,24 para la fórmula C. Las fórmulas fueron hidrolizadas con 8 ml de HCl 7,95 N durante 24 horas a 110°C.

La figuras 9, 10 y 11 ilustran los resultados obtenidos.

Figura 9: Furosina obtenida en la fórmula A.

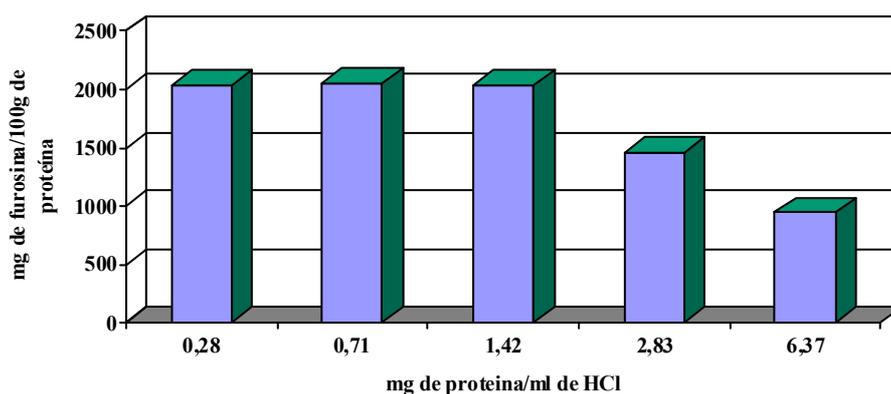


Figura 10: Furosina obtenida en la fórmula B.

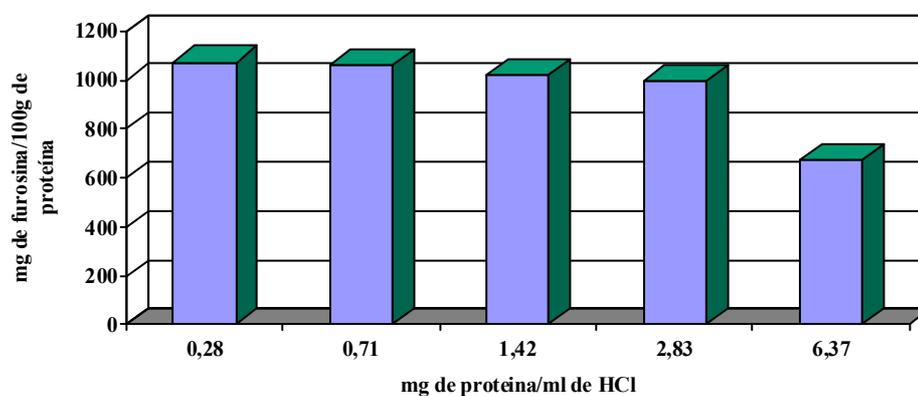
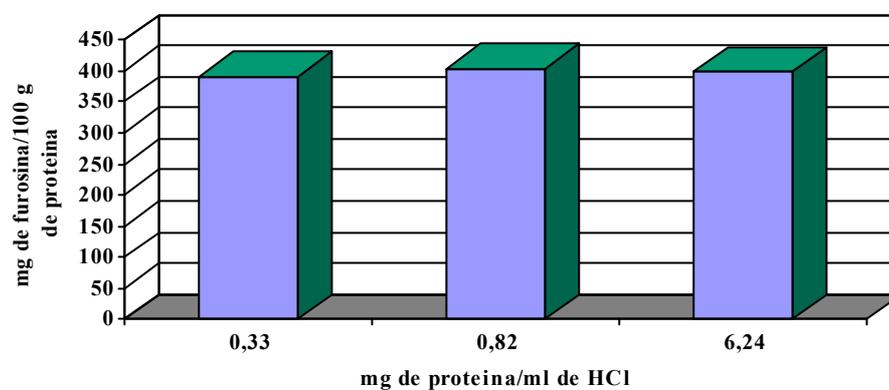


Figura 11: Furosina obtenida en la formula C.

Precisión

El estudio de precisión se realizó en una formula infantil comercial de continuación (n=8). Los resultados obtenidos se observan en la tabla III.2.1-1.

Tabla III.2.1-1: Precisión de la medida de furosina.

Muestra	Furosina mg/100g prot
1	1168
2	1186
3	1173
4	1271
5	1268
6	1231
7	1217
8	1254

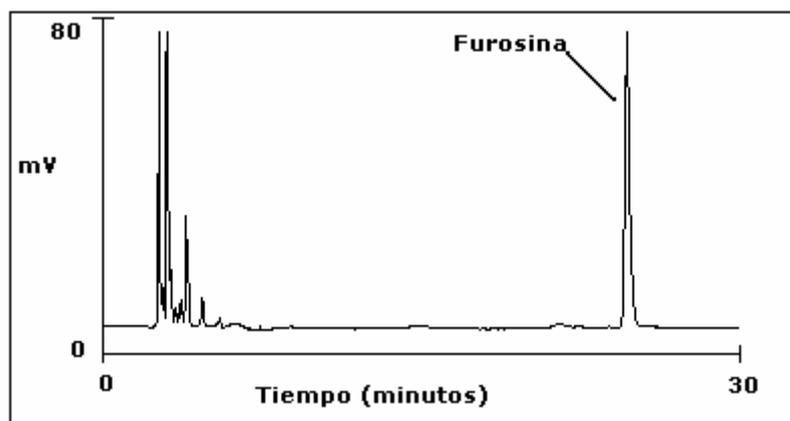
Media = 1221

$\sigma_{n-1} = 41,8$

CV (%) = 3,4

La figura 12 muestra el cromatograma obtenido para la formula A conservada a 30°C durante 4 semanas a Aw 0,65.

Figura 12: Cromatograma de furosina en la formula A conservada a 30°C durante 4 semanas a Aw 0,65.



III.2.2. Análisis de las muestras

III.2.2.1. Ingredientes proteicos

La tabla III.2.2.1-1 recoge los valores de furosina expresados en mg/g de muestra y mg/100 g de proteína.

Tabla III.2.2.1-1: Contenido de furosina en ingredientes proteicos.

Ingredientes	mg/g de muestra	mg/100 g de proteína
Lactosuero 1	11,0±0,11	1250±13
PSLBL	10,9±0,16	1435±21
PSL	2,97±0,05	464±7,7
E-300	2,52±0,00	841±0,1
Lactosuero 2	0,57±0,04	354±23
Lactosuero 3	0,84±0,02	644±18
CC 1	0,60±0,02	60,3±2,0
CC 2	0,21±0,00	22,8±0,1
CC 3	0,36±0,01	39,6±1,4
CS	0,51±0,01	60,5±1,7
APS	0,30±0,01	33,8±1,3
P.Soja	0,05±0,00	5,85±1,1
Soja Austria	0,11±0,00	26,7±2,4
PSLBLPH	0,17±0,01	20,3±0,7
Hidrocasaína	0,01±0,00	1,36±0,4

n=2

III.2.2.2. Fórmulas infantiles

a) Procesado

La tabla III.2.2.2-1 muestra los contenidos de furosina expresados en mg/g y mg/100 g de proteína en fórmulas infantiles obtenidas en planta industrial y piloto durante las diferentes etapas de elaboración.

Tabla III.2.2.2-1: Contenido de furosina en las fórmulas A, B, C y D durante el procesado.

Fórmulas	Planta Industrial		Planta Piloto	
	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína
A				
Mezcla de ingredientes	0,55±0,01	620±15,0	0,70±0,04	802±41,6
Adición de grasa	0,50±0,02	687±28,5	0,59±0,00	818±0,40
Secado (Producto final)	2,20±0,06	1937±60,5	1,19±0,05	1033±42,1
B				
Mezcla de ingredientes	0,355±0,01	360±4,45	0,65±0,03	593±24,7
Adición de grasa	0,445±0,04	551±42,9	0,59±0,00	663±1,60
Secado (Producto final)	0,955±0,01	800±4,71	0,98±0,08	812±64,0
C				
Mezcla de ingredientes	0,1±0,01	123±1,04	0,05±0,00	55,4±0,16
Adición de grasa	0,15±0,01	217±12,4	0,08±0,00	109±3,15
Secado	0,35±0,01	250±8,47	0,30±0,03	217±20,0
Producto final	0,34±0,02	256±15,3	0,27±0,00	199±2,08
D				
Mezcla de ingredientes	-	-	0,10±0,00	121±0,88
Adición de grasa	-	-	0,15±0,04	217±6,09
Secado	-	-	0,70±0,03	511±23,1
Producto final	-	-	0,62±0,06	458±42,4

n=2

b) Conservación

En las tablas III.2.2.2-2 a III.2.2.2-5 se muestran los contenidos de furosina expresados en mg/g y mg/100 g de proteína de las fórmulas infantiles elaboradas en planta industrial y piloto conservadas a 4, 20 y 30°C durante 3, 6, 12, 15 y 24 meses.

Tabla III.2.2.2-2: Contenido de furosina (expresado en extracto seco) durante la conservación de la fórmula A.

Planta Industrial						
	4°C		20°C		30°C	
Tiempo (meses)	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína
0	2,25±0,07	1982±61,9	-	-	-	-
3	-	-	2,23±0,04	1972±37,1	2,63±0,03	2323±28,6
6	2,40±0,05	2118±43,4	2,48±0,03	2191±28,8	2,86±0,03	2526±30,6
12	2,89±0,02	2551±17,7	2,89±0,00	2547±0,00	3,36±0,03	2962±25,1
15	2,85±0,02	2518±20,0	3,11±0,02	2744±17,7	3,29±0,03	2906±30,0
24	2,57±0,01	2271±9,51	2,57±0,02	2270±17,7	3,11±0,00	2742±3,91
Planta Piloto						
	4°C		20°C		30°C	
Tiempo (meses)	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína
0	1,22±0,05	1055±43,0	-	-	-	-
3	-	-	1,32±0,05	1146±47,7	1,39±0,03	1199±27,8
6	1,20±0,00	1042±3,10	1,32±0,01	1144±4,70	1,41±0,01	1223±10,6
12	1,32±0,00	1141±0,00	1,37±0,03	1188±29,6	1,59±0,05	1377±46,6
15	1,40±0,03	1211±30,2	1,36±0,06	1173±54,9	1,55±0,05	1341±44,6
24	1,52±0,03	1316±24,0	1,50±0,02	1300±19,4	1,89±0,01	1636±5,88

n=2

Tabla III.2.2.2-3: Contenido de furosina (expresado en extracto seco) durante la conservación de la fórmula B.

Planta Industrial						
	4°C		20°C		30°C	
Tiempo (meses)	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína
0	0,97±0,01	815±4,80	-	-	-	-
3	-	-	1,10±0,04	924±33,8	1,18±0,02	985±12,9
6	1,13±0,01	948±6,95	1,15±0,01	967±8,01	1,26±0,01	1053±9,63
12	1,15±0,04	962±31,6	1,27±0,07	1060±56,7	1,28±0,01	1076±6,67
15	1,22±0,03	1026±26,1	1,25±0,02	1047±14,9	1,57±0,02	1314±20,1
24	1,13±0,02	945±16,1	1,38±0,04	1158±29,8	1,75±0,01	1462±7,13
Planta Piloto						
	4°C		20°C		30°C	
Tiempo (meses)	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína
0	0,99±0,08	822±64,8	-	-	-	-
3	-	-	1,15±0,03	950±21,6	1,34±0,03	1104±21,4
6	1,10±0,02	913±12,7	1,13±0,03	933±28,8	1,16±0,02	961±15,5
12	1,24±0,00	1027±1,30	1,26±0,02	1043±17,8	1,42±0,06	1174±45,9
15	1,25±0,02	1031±17,1	1,26±0,02	1043±17,6	1,44±0,02	1194±16,7
24	1,60±0,01	1319±7,68	1,61±0,01	1328±12,2	1,64±0,05	1353±42,4

n=2

Tabla III.2.2.2-4: Contenido de furosina (expresado en extracto seco) durante la conservación de la formula C.

Planta Industrial						
	4°C		20°C		30°C	
Tiempo (meses)	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína
0	0,34±0,02	261±15,6	-	-	-	-
3	-	-	0,42±0,00	323±2,29	0,43±0,00	331±0,55
6	0,50±0,00	378±0,28	0,54±0,01	408±5,93	0,60±0,01	460±3,80
12	0,55±0,03	421±26,0	0,63±0,03	480±19,4	0,72±0,03	551±19,1
15	0,53±0,01	401±5,14	0,61±0,01	461±11,1	0,71±0,01	538±11,2
24	0,42±0,01	322±6,38	0,46±0,02	349±15,3	0,81±0,01	616±10,8
Planta Piloto						
	4°C		20°C		30°C	
Tiempo (meses)	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína
0	0,27±0,00	202±2,11	-	-	-	-
3	-	-	0,30±0,00	225±0,23	0,33±0,01	247±4,97
6	0,34±0,01	258±4,40	0,37±0,01	282±6,32	0,44±0,01	333±8,17
12	0,31±0,03	236±21,9	0,40±0,03	302±24,9	0,47±0,04	352±30,6
15	0,30±0,01	223±8,56	0,36±0,01	271±4,61	0,47±0,03	355±20,4
24	0,44±0,00	333±3,37	0,43±0,01	320±9,24	0,74±0,02	554±12,2

n=2

Tabla III.2.2.2-5: Contenido de furosina (expresado en extracto seco) durante la conservación de la fórmula D.

Tiempo (meses)	Planta Piloto					
	4°C		20°C		30°C	
	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína	mg/g	mg/100 g proteína
0	0,59±0,00	435±2,44	-	-	-	-
3	-	-	0,58±0,00	427±2,83	0,60±0,00	444±1,02
6	0,57±0,00	426±1,95	0,59±0,01	437±3,62	0,62±0,01	456±4,54
12	0,65±0,00	481±0,48	0,66±0,02	487±15,5	0,70±0,01	520±3,54
15	0,75±0,03	554±20,4	0,76±0,02	562±17,2	0,82±0,03	619±24,0
24	0,84±0,00	621±0,53	0,84±0,02	619±14,3	0,96±0,03	709±23,1

n=2

c) Conservación Aw 0,65

En las tablas III.2.2.2-6 a III.2.2.2-9 se muestran los contenidos de furosina expresados en mg/g y mg/100 g de proteína de las fórmulas infantiles elaboradas en planta industrial y piloto conservadas a Aw 0,65 durante 1, 2, 3 y 4 semanas a 20 y 30°C.

Tabla III.2.2.2-6: Contenido de furosina (expresado en extracto seco) durante la conservación a Aw 0,65 de la formula A.

Tiempo (semanas)	Planta Industrial				Planta Piloto			
	20°C		30°C		20°C		30°C	
	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína
0	2,24±0,07	1981±61,9	-	-	1,22±0,05	1055±43,0	-	-
1	2,81±0,04	2479±34,6	3,27±0,03	2883±22,7	1,39±0,03	1199±29,5	1,83±0,02	1583±20,0
2	2,97±0,01	2624±11,8	3,78±0,01	3308±4,10	1,40±0,03	1208±28,6	2,69±0,01	2327±8,76
3	3,17±0,06	2796±51,3	4,34±0,03	3829±23,0	1,54±0,04	1336±31,5	2,98±0,05	2579±44,4
4	3,03±0,01	2673±8,10	4,47±0,00	3945±1,46	1,73±0,04	1502±35,5	3,49±0,07	3021±58,7

n=2

Tabla III.2.2.2-7: Contenido de furosina (expresado en extracto seco) durante la conservación a Aw 0,65 de la formula B.

Tiempo (semanas)	Planta Industrial				Planta Piloto			
	20°C		30°C		20°C		30°C	
	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína
0	0,97±0,01	815±4,80	-	-	0,99±0,08	822±64,8	-	-
1	1,22±0,06	1019±51,8	1,64±0,00	1373±2,18	1,06±0,00	878±3,54	1,57±0,01	1299±10,1
2	1,15±0,04	967±37,3	2,00±0,04	1677±32,6	1,03±0,01	852±11,8	1,87±0,02	1549±15,6
3	1,44±0,03	1206±28,3	2,26±0,03	1895±27,8	1,25±0,03	1033±23,7	1,87±0,05	1547±39,7
4	1,78±0,04	1490±35,3	2,50±0,03	2090±27,7	1,47±0,06	1215±45,9	2,17±0,04	1797±29,2

n=2

Tabla III.2.2.2-8: Contenido de furosina (expresado en extracto seco) durante la conservación a Aw 0,65 de la formula C.

Tiempo (semanas)	Planta Industrial				Planta Piloto			
	20°C		30°C		20°C		30°C	
	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína
0	0,34±0,02	261±15,6	-	-	0,27±0,01	202±2,11	-	-
1	0,44±0,02	332±15,5	0,74±0,01	562±4,52	0,33±0,05	251±38,4	0,57±0,01	427±11,2
2	0,51±0,01	390±7,72	0,96±0,03	730±25,0	0,32±0,00	240±1,42	0,81±0,05	608±35,1
3	0,53±0,04	405±27,2	1,47±0,00	1120±1,57	0,31±0,00	231±0,29	1,14±0,02	855±14,3
4	0,57±0,02	430±18,5	1,79±0,04	1361±33,6	0,38±0,02	289±16,3	1,49±0,03	1119±22,5

n=2

Tabla III.2.2.2-9: Contenido de furosina (expresado en extracto seco) durante la conservación a Aw 0,65 de la formula D.

Tiempo (semanas)	Planta Piloto			
	20°C		30°C	
	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína
0	0,58±0,00	435±2,44	-	-
1	0,64±0,06	476±41,3	0,67±0,01	501±7,57
2	0,63±0,02	463±12,8	0,99±0,05	733±33,4
3	0,65±0,02	483±16,7	1,06±0,03	783±22,9
4	0,66±0,01	492±6,99	1,14±0,02	847±11,6

n=2

III.2.2.3. Fórmulas infantiles comerciales

En la tabla III.2.2.3-1 se muestran los contenidos de furosina expresados en mg/g y mg/100 g de proteína.

Tabla III.2.2.3-1: Contenido de furosina en fórmulas infantiles comerciales.

Formula	mg/g	g/100g de proteína
1 ^a	0,89±0,03	936±29,8
2 ^b	1,77±0,06	1221±41,8
3 ^b	1,40±0,04	1166±35,7
4 ^a	1,67±0,04	1392±31,2
5 ^a	0,83±0,02	796±16,1
6 ^b	1,00±0,03	865±25,7
7 ^b	0,95±0,02	757±16,6
8 ^a	1,00±0,03	830±21,3
9 ^b	0,89±0,03	608±20,7
10 ^{a*}	1,68±0,01	1459±10,8
11 ^{a*}	0,86±0,00	752±1,97
12 ^{b*}	1,03±0,01	859±10,1
13 ^{a*}	0,88±0,02	711±16,6
14 ^a	0,54±0,02	379±10,8

n=2

^a = Fórmulas de Inicio

^b = Fórmulas de Continuación

* = Fórmulas parcialmente hidrolizadas

III.2.2.4. Sistemas modelo

En las tablas III.2.2.4-1 a III.2.2.4-3 se muestran los contenidos de furosina expresados en mg/g y mg/100 g de proteína de los sistemas modelo elaborados, sometidos a diferentes tratamientos térmicos.

Tabla III.2.2.4-1: Contenido de furosina en sistemas modelo elaborados con FOS y proteínas lácteas.

Sistemas Modelo	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)							
		80°		90°		100°		120°	
		mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína
FOS-Hidrocaseína	0	-	3,52±1,12	-	-	-	-	-	-
	3	-	3,09±0,36	-	3,71±0,62	-	4,99±0,47	-	4,23±0,23
	6	-	2,96±0,20	-	4,78±0,15	-	5,13±0,09	-	5,34±0,46
	10	-	3,18±0,35	-	5,14±0,14	-	7,78±0,62	-	7,48±0,64
FOS-PSLBL	0	1,20±0,09	1423±2,02	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	0,97±0,07	1206±85,1	-	-
FOS-CC 2	0	0,02±0,00	26,0±0,50	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	0,02±0,00	26,7±0,07	0,02±0,00	27,3±2,14
FOS-PSLBLPH	0	0,01±0,00	17,4±1,00	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	0,01±0,00	19,8±0,68
	10	-	-	-	-	0,01±0,00	18,3±0,14	0,02±0,00	20,7±1,32

n=2

Tabla III.2.2.4-2: Contenido de furosina en sistemas modelo elaborados con maltodextrinas y proteínas lácteas.

Sistemas Modelo	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)					
		80°		90°		100°	
		mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína
MDX-PSLBL	0	1,28±0,02	1442±25,0	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	1,10±0,06	1249±71,1
MDX-CC 2	0	0,03±0,00	30,2±0,60	-	-	-	-
	3	0,03±0,00	32,1±2,52	0,03±0,00	35,0±1,84	0,04±0,00	42,4±3,35
	6	0,03±0,00	34,5±2,00	0,04±0,00	40,5±1,57	0,05±0,00	59,3±0,44
	10	0,03±0,00	35,2±3,22	0,04±0,00	46,7±1,69	0,06±0,00	68,9±0,09
MDX-Hidroc caseína	0	0,01±0,00	5,06±1,10	-	-	-	-
	3	0,01±0,00	7,59±0,30	0,01±0,00	10,6±1,21	0,02±0,00	25,8±1,65
	6	0,01±0,00	8,96±0,99	0,02±0,00	16,5±0,75	0,02±0,00	24,5±1,30
	10	0,02±0,00	21,4±1,99	0,02±0,00	19,0±1,51	0,03±0,00	36,9±1,25
MDX-PSLBLPH	0	0,02±0,00	21,4±2,50	-	-	-	-
	3	0,02±0,00	28,1±4,31	0,03±0,00	40,2±0,15	0,06±0,01	73,6±6,51
	6	0,03±0,00	35,6±4,47	0,05±0,01	67,1±8,07	0,07±0,01	87,5±8,86
	10	0,03±0,00	38,5±0,06	0,06±0,00	74,1±0,57	0,12±0,01	147±16,3

n=2

Tabla III.2.2.4-3: Contenido de furosina en sistemas modelo elaborados con lactosa y proteínas lácteas.

Sistemas Modelo	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)					
		80°		90°		100°	
		mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína	mg/g	mg/100g proteína
LAC-PSL	0	0,49±0,03	492±32,8	-	-	-	-
	3	0,56±0,04	564±42,5	0,47±0,01	473±8,00	0,52±0,01	524±7,88
	6	0,49±0,00	497±3,69	0,54±0,00	550±2,93	0,50±0,06	503±56,9
	10	0,52±0,00	524±3,63	0,56±0,03	563±32,3	0,62±0,01	629±10,3
LAC-CC 2	0	0,04±0,01	35,4±5,76	-	-	-	-
	3	0,07±0,00	66,8±2,02	0,08±0,00	77,5±2,39	0,19±0,01	191±12,2
	6	0,08±0,00	82,1±3,82	0,12±0,00	120±9,68	0,27±0,01	271±8,25
	10	0,10±0,00	99,0±0,69	0,16±0,00	159±1,58	0,35±0,01	351±11,3
LAC-Hidroc caseína	0	0,01±0,00	9,03±2,47	-	-	-	-
	3	0,04±0,00	41,9±0,49	0,07±0,00	68,7±1,75	0,12±0,00	121±0,64
	6	0,06±0,01	56,1±4,53	0,08±0,00	84,8±0,47	0,15±0,00	154±7,57
	10	0,08±0,01	82,9±5,63	0,10±0,00	97,6±3,08	0,20±0,00	198±0,06
LAC-PSLBLPH	0	0,01±0,00	17,2±0,88	-	-	-	-
	3	0,03±0,00	32,4±1,04	0,05±0,00	61,3±0,52	0,09±0,00	108±2,04
	6	0,03±0,00	42,0±0,09	0,07±0,01	91,2±7,92	0,13±0,00	167±5,49
	10	0,04±0,01	46,5±6,79	0,10±0,01	125±11,0	0,22±0,00	269±4,26

n=2

III.3. Determinación de lisina útil

III.3.1. Estudios preliminares

Precisión

El estudio de precisión se realizó en una formula infantil comercial de continuación (n=7). Los resultados obtenidos se observan en la tabla III.3.1-1.

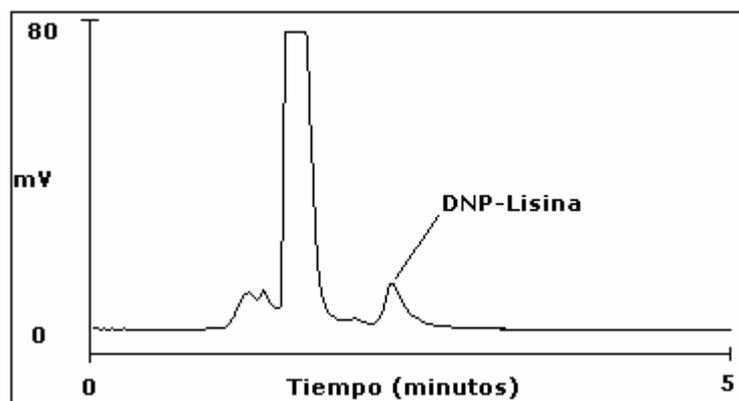
Tabla III.3.1-1: Precisión de la medida de lisina útil.

Muestra	Lisina útil g/100g prot
1	3,75
2	4,02
3	3,69
4	3,60
5	3,52
6	3,53
7	3,71

Meda = 3,69
 $\sigma_{n-1} = 0,17$
 CV (%) = 4,64

La figura 13 muestra el cromatograma de DNP-Lisina obtenido en la formula A conservada a 30°C durante 4 semanas a actividad de agua 0,65.

Figura 13: Cromatograma de DNP-Lisina de la formula A conservada a 30°C durante 4 semanas a actividad de agua 0,65.



III.3.2. Análisis de las muestras

III.3.2.1. Ingredientes proteicos

En la tabla III.3.2.1-1 se pueden observar los resultados expresados en mg/g y g/100 g de proteínas.

Tabla III.3.2.1-1: Contenido de lisina útil en ingredientes proteicos.

Ingredientes	mg/g muestra	g/100g proteína
Lactósuero 1	65,4±0,79	7,45±0,09
PSLBL	48,1±0,72	6,33±0,10
PSL	32,9±0,76	5,14±0,12
E-300	16,0±0,17	5,31±0,06
Lactósuero 2	6,93±0,47	4,33±0,30
Lactósuero 3	7,26±0,40	5,58±0,31
CC 1	79,1±0,60	7,91±0,06
CC 2	50,5±1,03	5,61±0,11
CC 3	58,5±1,52	6,50±0,17
CS	67,0±8,34	7,87±0,98
APS	36,6±0,16	4,06±0,01
P.Soja	46,4±3,44	5,15±0,39
Soja Austria	15,0±0,77	3,73±0,19
PSLBLPH	39,9±4,64	4,87±0,57
Hidrocasaína	16,6±0,61	1,85±0,07

n=2

III.3.2.2. Fórmulas infantiles

a) Procesado

La tabla III.3.2.2-1 muestra los contenidos de lisina útil en las fórmulas infantiles elaboradas en planta industrial y piloto durante las diferentes etapas de elaboración.

Tabla III.3.2.2-1: Contenido de lisina útil en las fórmulas A, B, C y D durante las diferentes etapas del procesado.

Fórmulas	Planta Industrial		Planta Piloto	
	mg/g	g/100g proteína	mg/g	g/100g proteína
A				
Mezcla de ingredientes	5,58±0,99	6,32±0,11	5,97 ±0,07	6,8 ±0,07
Adición de grasa	4,80 ±0,11	6,65 ±0,13	4,67 ±0,12	6,49 ±0,17
Secado (Producto final)	5,54 ±0,16	4,88 ±0,13	6,65 ±0,05	5,75 ±0,04
B				
Mezcla de ingredientes	7,96 ±0,09	8,04 ±0,09	7,19 ±0,11	6,51 ±0,09
Adición de grasa	4,24 ±0,17	6,32±0,18	5,65 ±0,21	6,35 ±0,24
Secado (Producto final)	7,23 ±0,22	5,24 ±0,22	7,12 ±0,03	5,88 ±0,03
C				
Mezcla de ingredientes	5,12 ±0,37	6,46 ±0,47	5,15 ±0,09	6,17 ±0,11
Adición de grasa	3,45 ±0,11	5,13 ±0,16	3,78 ±0,05	5,30±0,06
Secado	7,58±0,00	5,48 ±0,00	6,95 ±0,21	5,10±0,15
Producto final	7,33 ±0,30	5,58 ±0,23	6,93 ±0,12	5,22 ±0,09
D				
Mezcla de ingredientes	-	-	4,81±0,11	5,97±0,13
Adición de grasa	-	-	4,02±0,01	5,77±0,02
Secado	-	-	6,96±0,04	5,06±0,03
Producto final	-	-	6,95±0,21	5,14±0,15

n=2

b) Conservación

En las tablas III.3.2.2-2 a III.3.2.2-5 se muestran los contenidos de lisina útil expresados en mg/g y g/100 g de proteína, así como las pérdidas en las fórmulas infantiles de planta industrial y piloto conservadas a 4, 20 y 30°C durante 3, 6, 12, 15 y 24 meses.

Tabla III.3.2.2-2: Contenido de lisina útil (expresado en extracto seco) durante la conservación de la formula A.

Planta Industrial									
Tiempo (meses)	4°C			20°C			30°C		
	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)
0	5,66±0,15	4,99±0,13	0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	5,41±0,02	4,78±0,02	4	5,26±0,01	4,64±0,01	7
6	5,46±0,00	4,82±0,00	3	4,91±0,01	4,33±0,01	13	5,02±0,01	4,44±0,01	11
15	4,88±0,09	4,31±0,08	14	4,85±0,05	4,28±0,04	14	4,57±0,11	4,03±0,09	19
24	-	-	-	-	-	-	2,87±0,11	2,53±0,09	49
Planta Piloto									
Tiempo (meses)	4°C			20°C			30°C		
	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)
0	6,79±0,05	5,87±0,04	0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	5,75±0,02	4,98±0,02	15	5,71±0,14	4,94±0,12	16
6	5,78±0,19	5,00±0,17	15	5,56±0,04	4,81±0,03	18	5,51±0,11	4,76±0,09	19
15	5,61±0,02	4,85±0,02	17	5,38±0,01	4,65±0,01	21	4,79±0,18	4,14±0,16	29
24	-	-	-	-	-	-	3,26±0,00	2,82±0,00	52

n=2

Tabla III.3.2.2-3: Contenido de lisina útil (expresado en extracto seco) durante la conservación de la formula B.

Planta Industrial									
Tiempo (meses)	4°C			20°C			30°C		
	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)
0	7,69±0,22	6,44±0,18	0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	6,72±0,17	5,63±0,14	13	6,41±0,07	5,37±0,06	17
6	6,29±0,17	5,27±0,14	18	6,03±0,05	5,05±0,04	22	5,79±0,23	4,86±0,20	25
15	5,68±5,68	4,76±0,08	26	5,79±0,01	4,85±0,01	25	5,30±0,06	4,44±0,05	31
24	-	-	-	-	-	-	4,45±0,16	3,73±0,13	42
Planta Piloto									
Tiempo (meses)	4°C			20°C			30°C		
	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)
0	7,20±0,04	5,95±0,03	0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	6,52±0,49	5,39±0,41	9	6,37±1,09	5,27±0,90	11
6	6,16±0,20	5,09±0,16	14	5,97±0,52	4,94±0,43	17	5,58±0,27	4,61±0,23	23
15	5,58±0,23	4,61±0,19	22	5,26±0,10	4,34±0,08	27	4,89±0,01	4,04±0,01	32
24	-	-	-	-	-	-	3,92±0,41	3,24±0,34	46

n=2

Tabla III.3.2.2-4: Contenido de lisina útil (expresado en extracto seco) durante la conservación de la formula C.

Planta Industrial									
Tiempo (meses)	4°C			20°C			30°C		
	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)
0	7,48±0,31	5,69±0,24	0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	7,22±0,01	5,49±0,01	4	6,97±0,01	5,31±0,01	7
6	7,32±0,01	5,57±0,01	2	7,23±0,03	5,50±0,02	3	6,70±0,01	5,10±0,01	10
15	5,74±0,01	4,37±0,01	23	5,66±0,12	4,31±0,09	24	5,52±0,01	4,20±0,00	26
24	-	-	-	-	-	-	4,45±0,29	3,39±0,22	40
Planta Piloto									
Tiempo (meses)	4°C			20°C			30°C		
	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)
0	7,05±0,12	5,31±0,09	0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	6,11±0,20	4,60±0,15	13	6,07±0,15	4,57±0,11	14
6	5,55±0,04	4,17±0,03	21	5,38±0,12	4,05±0,09	24	5,35±0,15	4,02±0,11	24
15	5,62±0,05	4,23±0,04	20	5,29±0,14	3,98±0,10	25	4,95±0,08	3,73±0,06	30
24	-	-	-	-	-	-	3,96±0,03	2,98±0,02	44

n=2

Tabla III.3.2.2-5: Contenido de lisina útil (expresado en extracto seco) durante la conservación de la formula D.

Tiempo (meses)	Planta Piloto								
	4°C			20°C			30°C		
	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)
0	7,15±0,23	5,30±0,17	0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	7,09±0,12	5,25±0,09	1	7,20±0,06	5,33±0,04	0
6	7,03±0,01	5,21±0,01	2	7,13±0,04	5,28±0,03	0	7,18±0,03	5,32±0,02	0
15	7,01±0,10	5,20±0,07	2	6,76±0,06	5,01±0,04	5	6,89±0,08	5,10±0,06	4
24	-	-	-	-	-	-	4,52±0,32	3,35±0,24	37

n=2

c) Conservación Aw 0.65

En las tablas III.3.2.2-6 a III.3.2.2-9 se muestran los contenidos de lisina útil expresados en mg/g y g/100 g de proteína, así como las pérdidas en las fórmulas infantiles elaboradas en planta industrial y piloto conservadas a Aw=0,65 durante 4 semanas a 20 y 30°C.

Tabla III.3.2.2-6: Contenido de lisina útil (expresado en extracto seco) durante la conservación a $A_w=0,65$ de la formula A.

Tiempo (semanas)	Planta Industrial						Planta Piloto					
	20°C			30°C			20°C			30°C		
	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)
0	5,59±0,15	4,93±0,13	0	-	-	-	6,79±0,05	5,87±0,04	0	-	-	-
1	3,50±0,05	3,09±0,04	38	2,95±0,00	2,60±0,00	48	5,56±0,02	4,81±0,02	18	4,50±0,04	3,90±0,03	34
4	2,99±0,04	2,64±0,03	47	2,16±0,01	1,90±0,01	62	4,44±0,05	3,84±0,04	35	2,94±0,06	2,54±0,05	57

n=2

Tabla III.3.2.2-7: Contenido de lisina útil (expresado en extracto seco) durante la conservación a $A_w=0,65$ de la formula B.

Tiempo (semanas)	Planta Industrial						Planta Piloto					
	20°C			30°C			20°C			30°C		
	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)
0	7,69±0,22	6,44±0,18	0	-	-	-	7,20±0,04	5,95±0,03	0	-	-	-
1	5,54±0,05	4,64±0,04	28	4,58±0,05	3,83±0,04	40	5,31±0,06	4,39±0,05	26	4,29±0,01	3,54±0,01	40
4	5,15±0,08	4,31±0,06	33	3,66±0,00	3,07±0,00	52	4,26±0,05	3,52±0,04	41	4,19±0,04	3,46±0,03	42

n=2

Tabla III.3.2.2-8: Contenido de lisina útil (expresado en extracto seco) durante la conservación a $A_w=0,65$ de la formula C.

Tiempo (semanas)	Planta Industrial						Planta Piloto					
	20°C			30°C			20°C			30°C		
	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)
0	7,48±0,31	5,69±0,24	0	-	-	-	7,05±0,12	5,31±0,09	0	-	-	-
1	5,80±0,12	4,41±0,09	23	4,91±0,07	3,74±0,05	34	6,10±0,08	4,59±0,06	14	4,94±0,06	3,72±0,04	30
4	4,66±0,06	3,55±0,04	38	4,32±0,04	3,29±0,03	42	4,56±0,04	3,43±0,03	35	4,64±0,03	3,49±0,02	34

n=2

Tabla III.3.2.2-9: Contenido de lisina útil (expresado en extracto seco) durante la conservación a $A_w=0,65$ de la formula D.

Tiempo (semanas)	Planta Piloto					
	20°C			30°C		
	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)	mg/g	g/100g proteína	Perdidas (%)
0	7,15±0,23	5,30±0,17	0	-	-	-
1	5,61±0,04	4,16±0,03	21	4,47±0,06	3,31±0,04	38
4	4,46±0,03	3,31±0,02	38	4,47±0,07	3,31±0,05	38

n=2

III.3.2.3. Fórmulas infantiles comerciales

En la tabla III.3.2.3-1 se muestran los contenidos de lisina útil expresados en mg/g y g/100 g de proteína.

Tabla III.3.2.3-1: Contenido de lisina útil en fórmulas infantiles comerciales.

Formula	mg/g	g/100g de proteína
1 ^a	4,20±0,09	4,42±0,10
2 ^b	6,35±0,32	4,38±0,22
3 ^b	4,91±0,09	4,09±0,08
4 ^a	4,80±0,41	4,00±0,34
5 ^a	4,57±0,02	4,39±0,02
6 ^b	4,52±0,10	3,74±0,08
7 ^b	4,85±0,06	4,18±0,05
8 ^a	5,33±0,02	4,44±0,01
9 ^b	6,26±0,00	4,29±0,00
10 ^{a*}	3,93±0,25	3,41±0,22
11 ^{a*}	4,47±0,04	3,88±0,03
12 ^{b*}	5,32±0,08	4,26±0,06
13 ^{a*}	2,83±0,10	2,28±0,08
14 ^a	4,81±0,04	3,39±0,03

n=2

^a = Fórmulas de Inicio

^b = Fórmulas de Continuación

*= Fórmulas parcialmente hidrolizadas

III.3.2.4. Sistemas modelo

En la tabla III.3.2.4-1 se muestran los contenidos de lisina útil expresados en mg/g y g/100 g de proteína de los sistemas elaborados, así como las pérdidas tras el tratamiento térmico.

Tabla III.3.2.4-1: Contenido de lisina útil en sistemas modelo.

Sistemas Modelo	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)		
		100°C		
		mg/g	g/100g proteína	Perdidas %
FOS-Hidroc caseína	0	1,49±0,00	1,85±0,00	3,24
	10	1,44±0,02	1,79±0,02	
MDX-CC 2	0	4,51±0,10	5,10±0,11	5,29
	10	4,27±0,04	4,83±0,05	
MDX-Hidroc caseína	0	1,56±0,01	1,77±0,01	6,21
	10	1,46±0,02	1,66±0,02	
MDX-PSL BLP H	0	3,01±0,01	3,80±0,01	8,42
	10	2,77±0,04	3,48±0,05	
LAC-PSL	0	5,09±0,02	5,14±0,02	1,75
	10	5,00±0,02	5,05±0,02	
LAC-CC 2	0	5,05±0,11	5,10±0,11	18,6
	10	4,10±0,01	4,15±0,01	
LAC-Hidroc caseína	0	1,83±0,00	1,85±0,01	7,03
	10	1,70±0,00	1,72±0,00	
LAC-PSL BLP H	0	3,32±0,02	4,12±0,02	8,74
	10	3,03±0,00	3,76±0,00	

n=2

III.4. Determinación de pirralina

III.4.1. Análisis de las muestras

La pirralina analizada corresponde a la unida a proteínas.

III.4.1.1. Ingredientes proteicos

Solo se detecto pirralina en la muestra de lactosuero 1 con un valor de 41,4±0,41 mg/100g de proteína.

III.4.1.2. Fórmulas infantiles

a) Procesado

Pirralina no fue detectada en ninguna de las muestras.

b) Conservación

Pirralina solo fue detectada, cuantificada y confirmada por diodo array en la formula A planta industrial. Los valores obtenidos fueron muy bajos y cuantificados desde los 12 meses de conservación a 30°C (6,46 y 6,50 mg/100 g de proteína, después de 12 y 24 meses respectivamente).

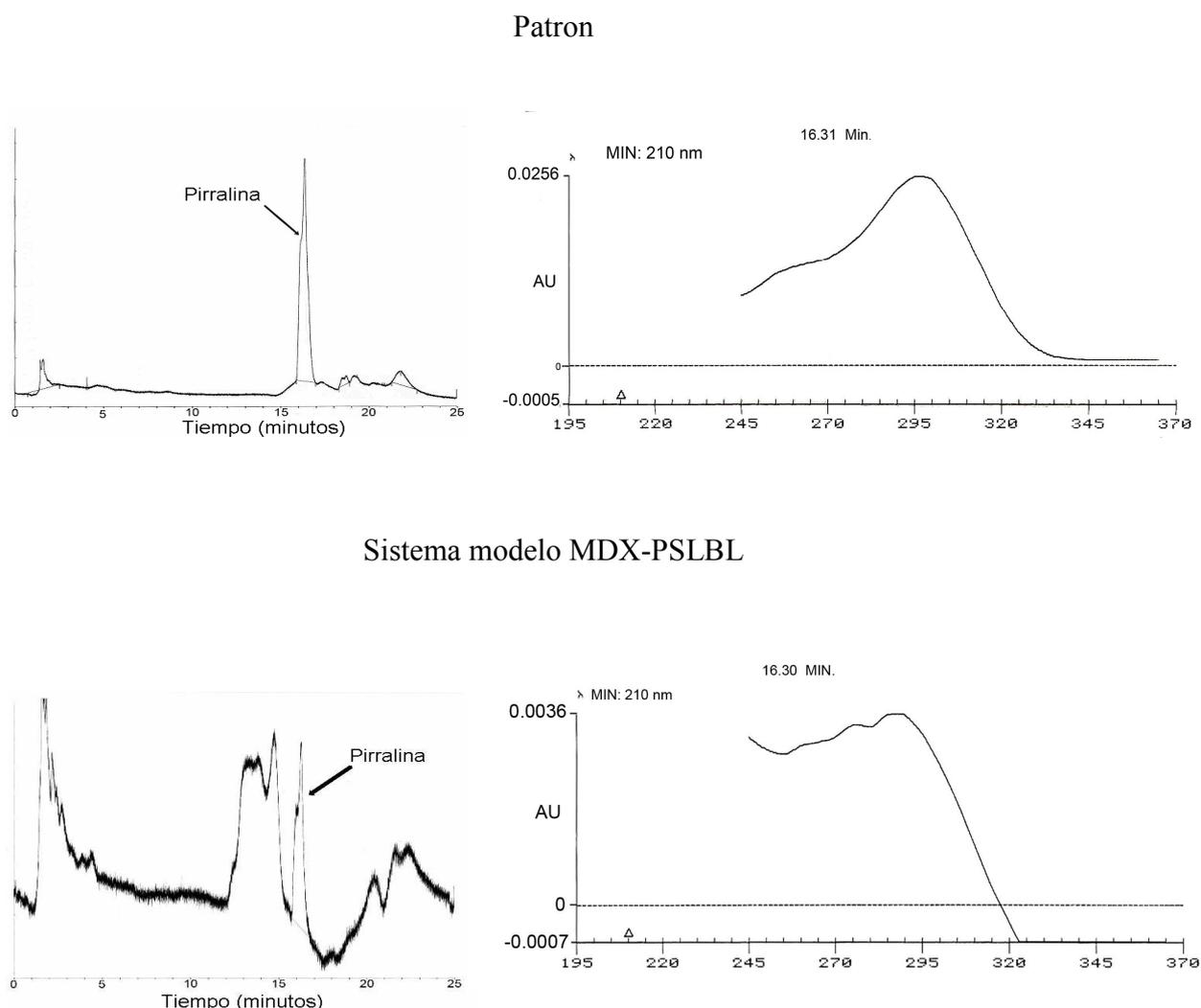
c) Conservación Aw 0,65

Pirralina solo fue cuantificada en la formula A planta industrial después de 4 semanas de conservación a 30°C con un valor de 6,73 mg/100 g de proteína.

III.4.1.3. Sistemas modelo

Tras el análisis de furosina y lisina útil, solo se estudió el contenido de pirralina en el sistema modelo MDX-PSLBL calentado a 100°C durante 10 minutos, por ser este el sistema que mostró los valores más altos de furosina; ya que presumiblemente ninguno de los otros poseerá cantidades detectables. Pirralina fue detectada y confirmada por diodo array, obteniendo un valor de 4 mg/100 g de proteína. La figura 14 muestra los cromatogramas del patrón pirralina y el sistema modelo MDX-PSLBL con sus respectivos espectros.

Figura 14: Espectro y cromatograma de pirralina patrón y sistema modelo MDX-PSLBL.



III.5. Determinación de CML

III.5.1. Estudios preliminares

Antes de analizar las fórmulas infantiles se realizó un estudio previo para poner a punto la técnica de análisis. Se analizaron 3 muestras de leche, partiendo de una cruda como punto inicial, y calentando las dos muestras restantes a 120°C hasta obtener una concentrada a la mitad y otra concentrada 4 veces su volumen inicial, obteniéndose leches claramente afectadas por el pardeamiento e ideales para nuestro estudio. Estas 3 muestras fueron analizadas por duplicado obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla III.5.1-1.

Tabla III.5.1-1: Contenido de CML en leche.

Leche	mg/g de muestra
Cruda	n.d.
Concentrado 1/2	2,40±0,08
Concentrado 1/4	3,15±0,12

n=2

n.d.= no detectado

Precisión

El estudio de precisión se realizó sobre la muestra B planta industrial conservada a 30°C durante 4 semanas a Aw 0,65. Los resultados obtenidos en 7 muestras se observan en la tabla III.5.1-2.

Tabla III.5.1-2: Precisión de la medida de CML.

Muestra	CML mg/100g prot
1	723
2	729
3	721
4	732
5	733
6	731
7	728

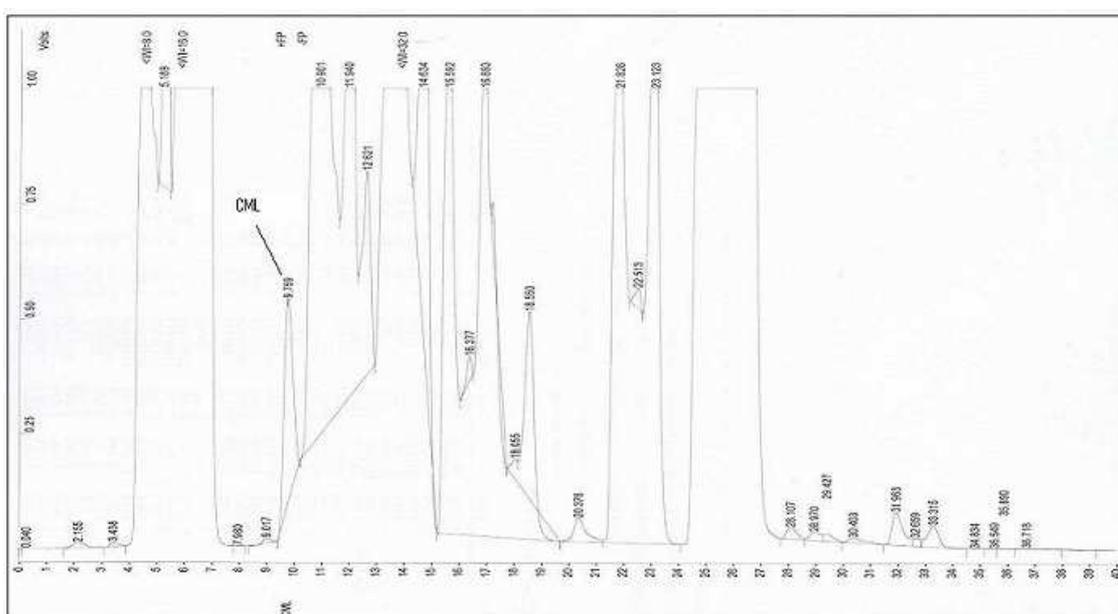
Media = 728

 $\sigma_{n-1} = 4,56$

CV (%) = 0,63

La figura 15 muestra el cromatograma de CML obtenido en la formula A conservada a 30°C durante 4 semanas a Aw 0,65.

Figura 15: Cromatograma de CML de la Formula A planta industrial conservada a 30° C/4 semanas/*A_w* 0,65.



III.5.2. Análisis de muestras

III.5.2.1. Ingredientes proteicos

La tabla III.5.2.1-1 recoge los valores de CML expresados en mg/g de muestra y mg/100 g de proteína.

Tabla III.5.2.1-1: Contenido de CML en ingredientes proteicos.

Ingredientes	CML mg/g de muestra	CML mg/100 g de proteína
PSLBL	0,85±0,01	112±0,77
PSL	1,04±0,11	163±17,0
CC 2	0,33±0,09	37,1±10,0
PSLBLPH	n.d.	n.d.

n=2

n.d.= no detectado

III.5.2.2. Fórmulas infantiles

a) Procesado

En la tabla III.5.2.2-1 se muestran los resultados obtenidos, y se expresan en mg/g de muestra y en mg/100g de proteína.

Tabla III.5.2.2-1: Contenido de CML durante el procesado de fórmulas infantiles.

Fórmulas	Planta Industrial	
	mg/g de muestra	mg/100g de proteína
A		
Mezcla de ingredientes	0,04±0,01	49,7±11,0
Producto final	0,38±0,01	336±6,11
B		
Mezcla de ingredientes	0,12±0,01	119±2,78
Producto final	0,40±0,01	334±1,88
C		
Mezcla de ingredientes	0,07±0,01	86,7±2,02
Producto final	0,19±0,01	142±5,72

n= 2

b) Conservación

En la tabla III.5.2.2-2 se muestran los resultados obtenidos, y se expresan en mg/g de muestra y en mg/100g de proteína.

Tabla III.5.2.2-2: Contenido de CML en conservación de fórmulas infantiles.

Fórmulas	Planta Industrial	
	mg/g de muestra	mg/100g de proteína
A		
Pto 0	0,38±0,01	336±6,11
30°C/15 meses	0,52±0,01	453±10,7
B		
Pto 0	0,40±0,01	334±1,88
30°C/15 meses	0,44±0,03	367±27,3
C		
Pto 0	0,19±0,01	142±5,72
30°C/15 meses	0,39±0,07	294±48,7

n= 2

c) Conservación Aw 0,65

En la tabla III.5.2.2-3 se muestran los resultados obtenidos, expresados en mg/g de muestra y en mg/100g de proteína.

Tabla III.5.2.2-3: Contenido de CML en conservación a Aw 0,65 de fórmulas infantiles.

Fórmulas	Planta Industrial	
	mg/g de muestra	mg/100g de proteína
A		
Pto 0	0,38±0,01	336±6,11
1semana/30°C	0,61±0,01	534±7,30
4semana/30°C	0,91±0,02	800±21,8
B		
Pto 0	0,40±0,01	334±1,88
1semana/30°C	0,58±0,04	489±38,8
4semana/30°C	0,87±0,01	726±4,61
C		
Pto 0	0,19±0,01	142±5,72
1semana/30°C	0,38±0,02	287±13,6
4semana/30°C	0,93±0,09	706±68,9

n=2

III.6. Determinación de fluorescencia

III.6.1. Estudios preliminares

Presición

El estudio de precisión se realizó en la fórmula A PI en el punto 0 de conservación (n=7). Los resultados obtenidos se observan en la tabla III.6.1-1.

Tabla III.6.1-1: Precisión de la medida de lisina útil.

Muestra	Intensidad de Fluorescencia/100 g de sólidos
1	21,8
2	21,8
3	21,9
4	22,0
5	21,1
6	21,8
7	21,8

Media = 21,74

$\sigma_{n-1} = 0,29$

CV (%) = 1,35

III.6.2. Análisis de muestras

III.6.2.1. Fórmulas infantiles

a) Procesado

El estudio de fluorescencia en las diferentes etapas del proceso de elaboración de fórmulas infantiles se muestra en la tabla III.6.2.1-1.

Tabla III.6.2.1-1: Intensidad de fluorescencia (datos expresados en extracto seco) durante el procesado de fórmulas infantiles.

Fórmulas	Intensidad de Fluorescencia/100 g de sólidos	
	IP	PP
A		
Mezcla de ingredientes	14,8±3,56	15,7±3,59
Adición de grasa	10,2±5,68	11,5±5,59
Secado (Producto final)	21,3±5,91	20,1±2,99
B		
Mezcla de ingredientes	31,3±0,00	36,6±1,50
Adición de grasa	26,3±4,05	30,4±0,00
Secado (Producto final)	41,5±0,00	41,1±0,00
C		
Mezcla de ingredientes	141±0,00	119±10,1
Adición de grasa	134±1,42	131±2,95
Secado	162±5,89	149±5,61
Producto final	175±0,00	146±5,89
D		
Mezcla de ingredientes	-	103±1,71
Adición de grasa	-	106±1,42
Secado	-	129±5,88
Producto final	-	135±2,93

n=4

b) Conservación

Los resultados en la conservación de fórmulas infantiles se pueden observar en las tablas III.6.2.1-2 y III.6.2.1-3.

Tabla III.6.2.1-2: Intensidad de fluorescencia (datos expresados en extracto seco) durante la conservación de las fórmulas con proteínas intactas (A y B).

Formula A						
Intensidad de Fluorescencia/100g de sólidos						
Tiempo (meses)	Planta Industrial			Planta Piloto		
	4°C	20°C	30°C	4°C	20°C	30°C
0	21,8±0,60			20,5±0,31		
3	-	24,0±0,00	23,7±0,61	-	-	-
6	22,9±0,30	22,5±0,60	23,5±0,60	-	-	-
12	22,1±0,00	21,8±0,61	23,7±0,61	-	-	-
15	22,4±0,00	22,4±0,30	23,5±0,18	-	-	24,5±0,61
24	22,2±0,00	22,1±0,00	25,3±0,00	20,6±0,00	23,7±0,00	25,7±0,00
Formula B						
Intensidad de Fluorescencia /100g de sólidos						
Tiempo (meses)	Planta Industrial			Planta Piloto		
	4°C	20°C	30°C	4°C	20°C	30°C
0	41,9±0,00			42,0±0,12		
3	-	42,5±0,12	42,9±0,17	-	-	-
6	43,4±0,12	43,0±0,12	43,1±0,12	-	-	-
12	41,3±0,60	42,4±0,12	44,1±0,00	-	-	-
15	41,8±0,60	43,5±0,12	43,4±0,12	-	-	39,4±0,90
24	43,1±0,00	42,5±0,00	43,5±0,00	41,3±0,00	41,2±0,00	41,9±0,00

n=4

Tabla III.6.2.1-3: Intensidad de fluorescencia (datos expresados en extracto seco) durante la conservación de las fórmulas con proteínas parcialmente hidrolizadas (C y D).

Formula C						
Intensidad de Fluorescencia /100g de sólidos						
Time (meses)	Planta Industrial			Planta Piloto		
	4°C	20°C	30°C	4°C	20°C	30°C
0	17,9±0,00			14,84±0,60		
3	-	18,0±0,00	18,1±0,00	-	-	-
6	17,6±0,60	17,5±0,61	18,4±0,00	-	-	-
12	18,0±0,30	19,3±0,00	18,8±0,91	-	-	-
15	21,1±0,30	20,1±0,61	21,5±0,00	-	-	19,4±0,30
24	22,2±0,00	23,9±0,00	34,1±0,00	18,7±0,00	21,8±0,00	31,8±0,00
Formula D						
Intensidad de Fluorescencia /100g de sólidos						
Time (meses)	Planta Industrial			Planta Piloto		
	4°C	20°C	30°C	4°C	20°C	30°C
0	-			13,7±0,29		
3	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	17,0±0,30
24	-	-	-	14,4±0,00	14,3±0,00	19,8±0,00

n=4

c) Conservación Aw 0,65

Las tablas III.6.2.1-4 y III.6.2.1-5 muestran los resultados de las fórmulas conservadas a 20 y 30°C a Aw 0,65 durante 4 semanas.

Tabla III.6.2.1-4: Intensidad de fluorescencia (datos expresados en extracto seco) a durante la conservación $A_w=0,65$ de las fórmulas infantiles con proteínas intactas (A y B).

Formula A				
Intensidad de fluorescencia /100g de sólidos				
Tiempo (semanas)	Planta Industrial		Planta Piloto	
	20°C	30°C	20°C	30°C
0	21,8±0,60		20,5±0,31	
1	45,0±0,00	71,8±0,00	41,8±1,78	56,2±1,84
2	44,0±1,77	61,7±0,00	42,7±0,00	57,5±0,00
3	44,2±3,67	58,7±1,84	44,3±0,00	55,6±0,00
4	46,9±1,78	67,2±1,86	43,8±0,00	62,4±1,83
Formula B				
Intensidad de fluorescencia /100g de sólidos				
Tiempo (semanas)	Planta Industrial		Planta Piloto	
	20°C	30°C	20°C	30°C
0	41,9±0,00		42,0±0,12	
1	81,5±1,82	104±1,81	75,5±1,74	90,6±1,81
2	73,0±1,82	87,2±0,00	73,3±0,00	82,8±0,00
3	72,6±0,00	88,4±1,80	78,0±1,81	92,5±1,79
4	76,3±1,77	97,3±0,00	75,7±1,82	100±3,68

n=4

Tabla III.6.2.1-5: Intensidad de fluorescencia (datos expresados en extracto seco) durante la conservación a $A_w=0,65$ de las fórmulas infantiles con proteínas parcialmente hidrolizadas (C y D).

Formula C				
Intensidad de fluorescencia /100g de sólidos				
Tiempo (semanas)	Planta Industrial		Planta Piloto	
	20°C	30°C	20°C	30°C
0	17,9±0,00		14,8±0,60	
1	153±1,84	203±0,00	128±1,76	216±29,9
2	153±5,58	281±7,59	123±7,40	340±0,00
3	142±20,6	387±18,9	136±10,9	455±67,1
4	159±5,40	427±18,9	153±3,60	523±19,0
Formula D				
Intensidad de fluorescencia /100g de sólidos				
Tiempo (semanas)	Planta Industrial		Planta Piloto	
	20°C	30°C	20°C	30°C
0	-		13,7±0,29	
1	-	-	109±15,6	390±36,8
2	-	-	108±7,44	607±74,7
3	-	-	131±10,9	689±55,1
4	-	-	322±18,2	984±92,8

n=4

III.6.2.2. Sistemas modelo

Las tablas III.6.2.2-1 a III.6.2.2-3 muestran los resultados del análisis.

Tabla III.6.2.2-1: Intensidad de fluorescencia en sistemas modelo con FOS y proteínas lácteas (expresada por 100 gramos de sólidos).

Sistemas Modelo	Tiempo (minutos)	Intensidad de fluorescencia /100g de sólidos		
		80°C	90°C	100°C
FOS-Hidroc caseína	0	47,1±0,00		
	3	47,1±0,00	52,6±0,00	56,8±1,96
	6	47,1±0,00	56,8±1,96	59,5±1,96
	10	47,1±0,00	58,1±0,00	62,3±0,00
FOS-PSLBL	0	17,1±0,77		
	3	13,9±0,63	12,1±0,56	12,7±0,57
	6	14,4±0,65	12,8±0,58	13,0±0,59
	10	14,3±0,65	13,2±0,60	13,2±0,60
FOS-CC 2	0	14,3±0,64		
	3	15,4±0,69	13,5±0,61	14,1±0,64
	6	13,8±0,62	13,7±0,62	13,8±0,62
	10	13,6±0,61	14,8±0,67	13,0±0,59
FOS-PSLBLPH	0	33,1±0,55		
	3	33,1±0,55	39,4±0,58	42,1±0,51
	6	34,2±0,55	43,2±0,62	47,3±0,63
	10	36,1±0,55	47,5±0,60	55,2±0,62

n=2

Tabla III.6.2.2-2: Intensidad de fluorescencia en sistemas modelo con maltodextrinas y proteínas lácteas (expresada por 100 gramos de sólidos).

Sistemas Modelo	Tiempo (minutos)	Intensidad de fluorescencia /100g de sólidos		
		80°C	90°C	100°C
MDX-PSLBL	0	22,1±1,00		
	3	22,5±1,02	21,3±0,96	21,7±0,98
	6	21,5±0,97	22,5±1,02	21,5±0,97
	10	22,5±1,02	26,4±1,19	25,8±1,16
MDX-CC 2	0	23,2±1,05		
	3	21,9±0,99	22,8±1,03	22,3±1,01
	6	23,2±1,05	22,1±1,00	22,1±1,00
	10	25,2±1,14	23,2±1,05	21,9±0,99
MDX-Hidroc caseína	0	87,6±0,00		
	3	93,1±1,55	96,4±0,00	125±3,10
	6	95,3±1,55	96,4±0,00	107±3,10
	10	122±1,55	105±0,00	123±0,00
MDX-PSLBLPH	0	29,6±0,00		
	3	32,2±0,00	33,6±0,00	39,0±0,00
	6	32,2±0,00	38,3±0,95	43,7±0,95
	10	33,6±0,00	42,3±0,95	50,4±0,95

n=2

Tabla III.6.2.2-3: Intensidad de fluorescencia en sistemas modelo con lactosa y proteínas lácteas (expresada por 100 gramos de sólidos).

Sistemas Modelo	Tiempo (minutos)	Intensidad de fluorescencia /100g de sólidos		
		80°C	90°C	100°C
LAC-PSL	0	18,2±0,82		
	3	16,3±0,74	18,5±0,83	18,3±0,83
	6	19,3±0,87	18,6±0,84	17,5±0,79
	10	18,0±0,81	18,0±0,81	19,6±0,88
LAC-CC 2	0	16,7±0,75		
	3	15,7±0,71	16,7±0,75	15,1±0,68
	6	15,2±0,68	17,1±0,77	16,4±0,74
	10	16,3±0,74	16,7±0,75	17,8±0,81
LAC-Hidrocaseína	0	67,4±0,00		
	3	83,5±0,10	75,8±0,00	110±0,00
	6	89,9±3,97	89,9±0,00	126±0,00
	10	98,3±0,00	98,3±0,00	150±1,99
LAC-PSLBLPH	0	27,0±0,00		
	3	28,4±0,00	34,5±0,95	37,9±0,00
	6	29,0±0,95	34,5±0,95	44,6±0,00
	10	32,4±0,95	41,2±0,95	56,9±1,66

n=2

III.7. Determinación de reflectancia

III.7.1. Estudios preliminares

Precisión

La precisión fue realizada para la medida y para el método. En la primera se hicieron 8 lecturas en diferentes campos de la misma muestra para cada formula infantil (A, B, C y D). Los resultados obtenidos se observan en la tabla III.7.1-1.

Tabla III.7.1-1: Precisión de la medida.

Formula	Parametro	Media	σ_{n-1}	CV (%)
A	L*	91,9	0,01	0,01
	b*	16,9	0,04	0,23
B	L*	95,4	0,04	0,04
	b*	14,95	0,04	0,26
C	L*	90,8	0,05	0,06
	b*	15,27	0,02	0,11
D	L*	90,4	0,15	0,17
	b*	13,01	0,09	0,69

n=8

El estudio de precisión del método se realizó en 12 muestras de una fórmula con proteínas intactas (fórmula B planta piloto 30°C/4 semanas/ A_w 0,65) y una con proteínas hidrolizadas (fórmula D planta piloto 30°C/4 semanas/ A_w 0,65). Los resultados obtenidos se observan en la tabla III.7.1-2.

Tabla III.7.1-2: Precisión del método.

Formula	Parametro	Media	σ_{n-1}	CV (%)
B	L*	92,6	0,22	0,24
	b*	17,8	0,18	1,01
D	L*	85,3	0,28	0,33
	b*	24,8	0,99	3,99

n=12

III.7.2. Análisis de muestras

III.7.2.1. Fórmulas infantiles

a) Conservación

Los resultados de los parámetros de reflectancia durante la conservación de las fórmulas infantiles a 4, 20 y 30°C durante 15 meses se encuentran recogidos en las tablas III.7.2.1-1 y III.7.2.1-2.

Tabla III.7.2.1-1: Reflectancia de las fórmulas infantiles con proteínas intactas (A y B) durante la conservación.

Formula A									
Tiempo (meses)	Planta Industrial								
	4°C			20°C			30°C		
	L	b	YI	L	b	YI	L	b	YI
0	91,9±0,01	16,9±0,04	26,1	91,9±0,01	16,9±0,04	26,1	91,9±0,01	16,9±0,04	26,1
3	-	-	-	92,3±0,07	16,4±0,14	25,4	92,2±0,07	17,1±0,16	26,5
6	92,4±0,16	16,7±0,13	25,9	91,9±0,40	16,1±0,46	24,7	92,3±0,12	16,8±0,17	25,9
12	92,0±0,12	16,5±0,26	25,4	92,3±0,19	16,2±0,22	25,2	92,3±0,07	15,8±0,21	24,5
15	92,4±0,07	16,7±0,19	25,8	92,1±0,26	17,4±0,81	27,1	92,5±0,01	15,1±0,23	23,2
Tiempo (meses)	Planta Piloto								
	4°C			20°C			30°C		
	L	b	YI	L	B	YI	L	b	YI
0	92,9±0,06	12,6±0,04	19,4	92,9±0,06	12,6±0,04	19,4	92,9±0,06	12,6±0,04	19,4
3				93,3±0,06	12,9±0,13	19,5	93,2±0,06	13,1±0,05	20,0
6	92,8±0,07	13,1±0,14	20,2	93,1±0,06	13,1±0,20	19,9	93,1±0,06	13,6±0,12	20,9
12	92,8±0,10	13,3±0,12	20,5	93,0±0,00	13,3±0,10	20,5	93,3±0,11	13,0±0,20	19,8
15	93,1±0,00	13,0±0,03	20,0	93,1±0,54	13,2±0,04	20,3	93,6±0,10	13,0±0,10	19,9
Formula B									
Tiempo (meses)	Planta Industrial								
	4°C			20°C			30°C		
	L	b	YI	L	B	YI	L	B	YI
0	94,2±0,07	18,4±0,08	28,0	94,2±0,07	18,4±0,08	28,0	94,2±0,07	18,4±0,08	28,0
3				95,0±0,12	17,9±0,44	27,1	94,9±0,06	17,9±0,17	27,0
6	94,7±0,10	18,2±0,17	27,3	94,6±0,00	18,1±0,12	27,3	94,6±0,07	18,2±0,15	26,5
12	94,4±0,10	17,9±0,16	27,1	94,5±0,07	17,8±0,19	26,8	94,4±0,09	17,5±0,15	27,6
15	95,0±0,07	17,9±0,21	26,9	94,9±0,05	17,6±0,13	26,5	94,5±0,00	16,9±0,23	25,5
Tiempo (meses)	Planta Piloto								
	4°C			20°C			30°C		
	L	b	YI	L	B	YI	L	b	YI
0	95,4±0,06	15,0±0,10	22,3	95,4±0,06	15,0±0,10	22,3	95,4±0,06	15,0±0,10	22,3
3				95,3±0,00	15,7±0,14	23,6	95,3±0,04	15,7±0,13	25,8
6	94,0±0,00	15,3±0,10	23,3	94,8±0,07	14,4±0,13	23,2	94,9±0,05	15,5±0,12	23,3
12	94,0±0,07	16,0±0,14	24,3	94,8±0,05	15,4±0,11	23,2	95,4±0,06	15,8±0,12	23,7
15	93,9±0,05	15,4±0,10	23,5	95,7±1,05	16,1±0,15	24,1	95,2±0,06	14,8±0,10	22,2

n=8

Tabla III.7.2.1-2: Reflectancia de las fórmulas infantiles con proteínas parcialmente hidrolizadas (C y D) durante la conservación.

Formula C									
Tiempo (meses)	Planta Industrial								
	4°C			20°C			30°C		
	L	b	YI	L	B	YI	L	b	YI
0	90,8±0,07	15,3±0,10	24,1	90,8±0,07	15,3±0,10	24,1	90,8±0,07	15,3±0,10	24,1
3				90,8±0,10	16,1±0,16	25,3	91,5±0,09	16,5±0,05	27,6
6	91,0±0,70	16,0±0,32	25,2	90,5±0,18	16,6±0,27	26,2	90,4±0,70	17,5±0,16	26,5
12	90,5±0,07	16,3±0,09	25,7	90,8±0,06	15,9±0,12	25,0	91,1±0,90	16,9±0,08	27,1
15	91,0±0,10	16,0±0,23	25,1	90,8±0,07	16,1±0,08	25,4	91,2±0,07	17,3±0,07	25,7
Tiempo (meses)	Planta Piloto								
	4°C			20°C			30°C		
	L	b	YI	L	B	YI	L	b	YI
0	93,2±0,00	11,1±0,02	24,1	93,2±0,00	11,1±0,02	24,1	93,2±0,00	11,1±0,02	24,1
3				94,2±0,06	11,9±0,03	25,3	93,1±0,00	11,5±0,06	25,7
6	93,4±0,06	11,1±0,09	25,2	94,4±0,06	12,2±0,01	26,2	93,5±0,00	11,8±0,02	27,6
12	93,9±0,06	11,6±0,04	25,7	93,7±0,10	11,9±0,08	25,0	93,6±0,07	11,8±0,70	26,5
15	93,6±0,05	11,6±0,05	25,1	93,5±0,05	11,7±0,04	25,4	93,4±0,06	12,2±0,04	27,1
Formula D									
Tiempo (meses)	Planta Piloto								
	4°C			20°C			30°C		
	L	b	YI	L	B	YI	L	b	YI
0	92,4±0,06	13,0±0,06	16,3	92,4±0,06	13,0±0,06	16,3	92,4±0,06	13,0±0,06	16,3
3				92,3±0,00	13,8±0,09	18,0	92,5±0,05	14,3±0,06	17,7
6	92,5±0,06	13,6±0,07	17,0	92,5±0,00	14,0±0,07	18,4	92,5±0,06	14,0±0,08	18,0
12	92,5±0,07	13,5±0,13	17,6	92,4±0,07	14,0±0,16	18,1	92,8±0,05	14,4±0,15	18,3
15	92,5±0,05	13,4±0,10	17,6	92,5±0,07	13,7±0,10	17,8	92,8±0,15	14,6±0,12	18,6

n=8

b) Conservación Aw 0,65

Las tablas III.7.2.1-3 y III.7.2.1-4 muestran los resultados de reflectancia de las fórmulas conservadas a 20 y 30°C a Aw 0,65 durante 4 semanas.

Tabla III.7.2.1-3: Reflectancia de las fórmulas infantiles con proteínas intactas conservadas a 20 y 30°C a Aw=0,65 durante 4 semanas.

Formula A												
Tiempo (semanas)	Planta Industrial						Planta Piloto					
	20°C			30°C			20°C			30°C		
	L	b	YI	L	b	YI	L	b	YI	L	b	YI
0	91,9±0,01	16,9±0,04	26,1	91,9±0,01	16,9±0,04	26,1	92,9±0,06	12,6±0,04	19,4	92,9±0,06	12,6±0,04	19,4
1	92,1±0,06	18,9±0,23	29,3	81,1±0,15	33,1±0,30	58,3	92,4±0,07	15,4±0,05	23,8	88,5±0,13	22,9±0,11	37,0
2	92,1±0,07	19,2±0,49	29,3	86,3±0,07	27,7±0,14	45,9	92,1±0,06	16,1±0,23	24,9	90,0±0,20	21,6±0,24	34,3
3	91,7±0,05	19,0±0,12	29,5	85,5±0,05	28,2±0,07	47,1	92,1±0,00	15,4±0,17	23,9	90,3±0,06	21,7±0,09	34,4
4	90,9±0,11	20,8±0,07	32,7	86,7±0,21	33,1±0,11	54,5	91,5±0,07	16,1±0,11	25,1	88,6±0,11	22,9±0,08	37,0
Formula B												
Tiempo (semanas)	Planta Industrial						Planta Piloto					
	20°C			30°C			20°C			30°C		
	L	b	YI	L	b	YI	L	b	YI	L	b	YI
0	94,2±0,07	18,4±0,08	28,0	94,2±0,07	18,4±0,08	28,0	95,4±0,06	15,0±0,10	22,3	95,4±0,06	15,0±0,10	22,3
1	94,5±0,07	19,0±0,14	28,7	91,9±0,10	18,8±0,04	29,3	93,9±0,09	16,6±0,15	25,2	93,6±0,07	18,5±0,06	28,2
2	89,4±0,06	19,7±0,14	31,5	92,5±0,10	18,6±0,08	28,8	92,2±0,00	18,5±0,11	28,7	92,0±0,12	18,7±0,05	29,2
3	93,2±0,07	19,9±0,06	30,5	92,0±0,00	18,1±0,11	28,1	93,3±0,05	18,8±0,15	28,7	92,0±0,07	18,0±0,09	27,9
4	92,7±0,06	20,0±0,12	30,9	90,7±0,13	21,5±0,17	33,8	93,0±0,06	18,2±0,04	27,9	91,1±0,10	19,4±0,21	30,4

n=8

Tabla III.7.2.1-4: Reflectancia de las fórmulas infantiles con proteínas parcialmente hidrolizadas conservadas a 20 y 30°C a Aw=0,65 durante 4 semanas.

Formula C												
Tiempo (semanas)	Planta Industrial						Planta Piloto					
	20°C			30°C			20°C			30°C		
	L	b	YI	L	b	YI	L	b	YI	L	b	YI
0	90,8±0,07	15,3±0,10	24,1	90,8±0,07	15,3±0,10	24,1	93,2±0,00	11,1±0,02	16,3	93,2±0,00	11,1±0,02	16,3
1	93,9±0,05	12,7±0,05	19,4	86,4±0,28	23,6±0,35	39,0	93,3±0,05	11,3±0,04	17,2	88,8±0,15	21,0±0,46	33,8
2	91,7±0,16	14,9±0,32	23,2	84,7±0,30	26,7±0,46	45,1	92,1±0,05	13,6±0,02	21,1	86,3±0,26	24,3±0,19	40,2
3	91,6±0,10	15,3±0,25	23,9	82,7±0,25	30,3±0,12	52,3	92,3±0,06	13,9±0,09	21,5	84,8±0,06	27,3±0,31	46,0
4	91,1±0,13	16,0±0,21	25,1	81,5±0,09	29,7±0,12	52,1	91,5±0,40	14,6±0,31	22,8	84,6±0,14	27,4±0,40	46,3
Formula D												
Tiempo (semanas)	Planta Industrial						Planta Piloto					
	20°C			30°C			20°C			30°C		
	L	b	YI	L	b	YI	L	b	YI	L	b	YI
0	-	-	-	-	-	-	92,39±0,06	13,01±0,06	19,91	92,39±0,06	13,01±0,06	19,91
1	-	-	-	-	-	-	90,32±0,00	15,41±0,02	24,34	86,06±0,00	23,64±0,03	39,24
2	-	-	-	-	-	-	87,42±0,00	24,61±0,04	39,82	84,02±0,00	31,02±0,03	53,02
3	-	-	-	-	-	-	89,18±0,00	19,27±0,03	30,90	79,16±0,00	32,77±0,03	59,39
4	-	-	-	-	-	-	92,12±0,00	16,21±0,00	25,25	74,15±0,00	42,06±0,01	80,69

n=8

III.8. Análisis complementarios

III.8.1. Determinación de extracto seco

El análisis se realizó en los ingredientes proteicos y en las fórmulas infantiles. Los resultados obtenidos se pueden observar en las tablas III.8.1-1 a III.8.1-4.

Tabla III.8.1-1: Contenido de humedad (%) de los ingredientes proteicos.

Ingredientes	%
Lactosuero 1	-
PSLBL	6,54
PSL	4,89
E-300	4,90
Lactosuero 2	4,50
Lactosuero 3	-
CC 1	-
CC 2	6,89
CC 3	5,45
CS	6,35
APS	5,54
P.Soja	5,61
Soja Austria	5,46
PSLBLPH	7,34
Hidrocasaína	5,51

n=2

Tabla III.8.1-2: Contenido de humedad (%) en las fórmulas infantiles.

Fórmulas	%
A (PI)	2,27
A (PP)	2,05
B (PI)	1,84
B (PP)	1,20
C (PI)	2,00
C (PP)	1,64
D (PP)	1,60

n=2

Tabla III.8.1-3: Contenido de humedad (%) en las fórmulas conservadas a 20°C/Aw 0,65 durante 4 semanas.

Fórmulas	Pto 0	1 Semana	2 Semana	3 Semana	4 Semana
A (PI)	2,27	5,52±0,23	5,25±0,30	5,66±0,10	4,15±0,05
A (PP)	2,05	4,24±0,06	4,62±0,09	4,52±0,03	4,34±0,01
B (PI)	1,84	3,71±0,34	2,51±0,57	2,54±0,25	4,47±0,10
B (PP)	1,20	2,31±0,04	2,09±0,06	2,71±0,02	3,22±0,08
C (PI)	2,00	5,03±0,01	5,36±0,20	5,61±0,21	5,60±0,01
C (PP)	1,64	5,02±0,00	6,38±0,38	5,45±0,05	5,57±0,13
D (PP)	1,60	5,26±0,01	5,14±0,23	3,98±0,68	4,10±0,18

n=2

Tabla III.8.1-4: Contenido de humedad (%) en las fórmulas conservadas a 30°C/Aw 0,65 durante 4 semanas.

Fórmulas	Pto 0	1 Semana	2 Semana	3 Semana	4 Semana
A (PI)	2,27	9,77±0,06	6,94±0,12	7,49±0,09	-
A (PP)	2,05	6,55±0,04	5,79±0,06	5,81±0,18	5,94±0,14
B (PI)	1,84	2,43±0,03	3,49±0,06	2,44±0,02	2,46±0,21
B (PP)	1,20	2,31±0,04	3,49±0,13	2,58±0,01	2,92±0,05
C (PI)	2,00	8,01±0,01	7,83±0,10	7,80±0,01	-
C (PP)	1,64	7,94±0,03	8,13±0,25	8,56±0,22	6,91±0,07
D (PP)	1,60	4,81±0,31	5,58±0,13	5,53±0,11	6,28±0,20

n=2

III.8.2. Determinación de proteínas

Las tablas III.8.2-1 a III.8.2-3 recogen los valores de proteínas, expresados en porcentaje (%), de los diferentes ingredientes proteicos estudiados, fórmulas infantiles y fórmulas comerciales.

Tabla III.8.2-1: Contenido en proteínas (%) de los ingredientes proteicos.

Ingredientes	%
Lactosuero 1	88
PSLBL	76
PSL	64
E-300	30
Lactosuero 2	16
Lactosuero 3	13
CC 1	100
CC 2	90
CC 3	90
CS	85
APS	90
P.Soja	90
Soja Austria	40
PSLBLPH	82
Hidrocasaína	90

n=2

Tabla III.8.2-2: Contenido en proteínas (%) en las fórmulas infantiles A, B, C y D.

Fórmulas	Contenido (%)	
	Planta Industrial	Planta Piloto
A	11,33	11,56
B	11,94	12,10
C	13,14	13,29
D	-	13,50

n=2

Tabla III.8.2-3: Contenido en proteínas (%) en fórmulas infantiles comerciales.

Formula	% Proteínas
1 ^a	9,5
2 ^b	14,5
3 ^b	12
4 ^a	12
5 ^a	10,4
6 ^b	11,6
7 ^b	12,5
8 ^a	12,0
9 ^b	14,6
10 ^{a*}	11,5
11 ^{a*}	11,5
12 ^{b*}	12,1
13 ^{a*}	12,4
14 ^a	14,2

n=2

^a = Fórmulas de Inicio^b = Fórmulas de Continuación

* = Fórmulas hidrolizadas

III.8.3. Determinación de azúcares

La tabla III.8.3-1 recoge los valores de azúcares, expresados en porcentaje (%), de los diferentes ingredientes proteicos estudiados. Maltosa, maltotriosa y sacarosa no fueron detectados en ninguna muestra.

Tabla III.8.3-1: Contenido de azúcares en ingredientes proteicos.

Ingredientes	Contenido de Azúcares (%)		
	Galactosa	Glucosa	Lactosa
Lactosuero 1	0,25±0,05	1,50±0,10	3,50±0,20
PSLBL	1,75±0,16	1,58±0,16	0,08±0,01
PSL	n.d.	n.d.	11,67±0,42
E-300	n.d.	n.d.	40,53±0,00
Lactosuero 2	n.d.	n.d.	75,1±1,74
Lactosuero 3	n.d.	n.d.	76,5±3,95
CC 1	n.d.	n.d.	n.d.
CC 2	n.d.	n.d.	0,17±0,00
CC 3	n.d.	n.d.	n.d.
CS	n.d.	n.d.	n.d.
APS	n.d.	n.d.	n.d.
P.Soja	n.d.	n.d.	n.d.
Soja Austria	n.d.	1,14±0,12	n.d.
PSLBLPH	n.d.	n.d.	0,095±0,02
Hidrocasaína	n.d.	n.d.	0,26±0,01

n=2

n.d.=no detectado

III.8.4. Determinación de ácidos grasos

En las tablas III.8.4-1 a III.8.4-3 se pueden observar los resultados obtenidos para las fórmulas A, B y C elaboradas en la planta industrial. El estudio se realizó en los puntos cero de conservación, en la conservación a 30°C durante 15 meses, y en las conservadas a Aw=0,65 durante 1 y 4 semanas a 30°C.

Tabla III.8.4-1: Contenido de ácidos grasos en la formula A durante la conservación (g/100 g de muestra).

	Pto 0	30°C/15 meses	30°C/1semana/Aw0,65	30°C/4semanas/Aw0,65
	g AG/100 g de muestra	g AG/100 g de muestra	g AG/100 g de muestra	g AG/100g de muestra
C8	0,63±0,00	0,62±0,01	0,64±0,05	0,64±0,09
C10	0,52±0,03	0,48±0,01	0,48±0,05	0,48±0,05
C12	3,22±0,06	3,22±0,05	3,20±0,51	3,23±0,17
C14	1,33±0,01	1,33±0,02	1,38±0,16	1,44±0,01
C16	1,86±0,01	1,75±0,01	1,75±0,06	1,84±0,06
C18	0,80±0,03	0,73±0,03	0,73±0,10	0,80±0,31
C18:1	9,73±0,02	8,98±0,32	8,99±0,12	9,86±0,40
C18:2	4,35±0,04	3,91±0,09	3,92±0,15	4,22±0,31
C18:3	0,43±0,02	0,37±0,01	0,42±0,03	0,43±0,03
C20	0,07±0,06	0,07±0,01	0,07±0,01	0,08±0,00
C22	0,15±0,03	0,14±0,02	0,13±0,03	0,16±0,02
Total	23,1±0,3	21,6±0,6	21,7±1,3	23,2±1,4

n=4

Tabla III.8.4-2: Contenido de ácidos grasos en la formula B durante la conservación (g/100 g de muestra).

	Pto 0	30°C/15 meses	30°C/1semana/Aw0,65	30°C/4semanas/Aw0,65
	g AG/100 g de muestra	g AG/100 g de muestra	g AG/100 g de muestra	g AG/100g de muestra
C8	0,47±0,02	0,43±0,07	0,57±0,01	0,58±0,10
C10	0,34±0,01	0,41±0,01	0,42±0,00	0,40±0,06
C12	2,62±0,03	2,91±0,16	2,94±0,01	2,91±0,33
C14	1,29±0,06	1,32±0,07	1,32±0,01	1,29±0,13
C16	1,84±0,07	1,90±0,02	1,80±0,05	1,76±0,08
C18	0,86±0,03	0,84±0,01	0,83±0,05	0,81±0,01
C18:1	9,40±0,64	10,3±0,07	9,50±0,52	9,27±0,15
C18:2	4,37±0,29	4,56±0,09	4,45±0,23	4,25±0,08
C18:3	0,46±0,02	0,43±0,02	0,44±0,03	0,44±0,01
C20	0,11±0,06	0,09±0,00	0,07±0,01	0,09±0,00
C22	0,19±0,01	0,19±0,00	0,18±0,02	0,17±0,01
Total	22,0±1,2	23,4±0,5	22,5±1,0	22,0±0,9

n=4

Tabla III.8.4-3: Contenido de ácidos grasos en la formula C durante la conservación (g/100 g de muestra).

	Pto 0	30°C/15 meses	30°C/1semana/Aw0,65	30°C/4semanas/Aw0,65
	g AG/100 g de muestra	g AG/100 g de muestra	g AG/100 g de muestra	g AG/100g de muestra
C8	2,01±0,07	2,26±0,10	2,43±0,25	2,41±0,21
C10	1,99±0,12	2,01±0,26	2,04±0,24	2,02±0,02
C12	1,85±0,21	2,18±0,17	2,18±0,30	2,20±0,01
C14	0,64±0,29	0,74±0,23	0,91±0,12	0,92±0,03
C16	1,21±0,09	1,41±0,08	1,38±0,02	1,42±0,13
C18	0,54±0,10	0,59±0,09	0,55±0,09	0,55±0,07
C18:1	5,87±0,36	6,60±0,19	6,04±0,37	6,21±0,56
C18:2	3,54±0,31	3,97±0,43	3,89±0,25	3,99±0,32
C18:3	0,37±0,02	0,41±0,06	0,42±0,02	0,43±0,03
C20	0,07±0,01	0,07±0,01	0,06±0,01	0,06±0,00
C22	0,11±0,10	0,12±0,03	0,11±0,01	0,09±0,00
Total	18,2±1,7	20,3±1,7	20,1±1,7	20,3±1,4

n=4

III.8.5. Determinación de peróxidos

La tabla III.8.5-1 muestra los resultados obtenidos para las fórmulas A, B y C en los puntos 0 de conservación, 20°C/15 meses, 30°C/6 meses, 30°C/12 meses, 30°C/15 meses, 30°C/1 semana/ A_w 0,65 y 30°C/4 semanas/ A_w 0,65 elaboradas en la planta industrial. Las muestras fueron conservadas en sus botes originales cerrados bajo atmósfera de N_2 . En el caso de las muestras conservadas a 30°C los botes fueron abiertos a los 6 meses por falta de muestras, se obtuvo la muestras correspondiente al tiempo de conservación, y se continuo la conservación de las fórmulas en sus botes originales cerrados con parafilm.

Tabla III.8.5-1: Índice de peróxidos (miliequivalentes de O₂/kg de grasa) en fórmulas infantiles elaboradas en planta industrial durante la conservación.

Fórmulas	Pto 0	20°C/15 meses	30°C/6 meses	30°C/12 meses	30°C/15 meses	30°C/1semana/Aw 0,65	30°C/4semana/Aw 0,65
A	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	8,67±0,20	12,1±0,1	0,00±0,00	4,89±0,10
B	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	5,96±0,10	10,6±0,2	0,00±0,00	4,23±0,30
C	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	6,38±0,30	2,57±0,10	0,00±0,00	0,00±0,00

n=2

III.8.6. Determinación de pH

Los resultados del análisis de pH en los sistemas modelo calentados a 80, 90 y 100°C durante 10 minutos se muestran en las tablas III.8.6-1 a III.8.6-3.

Tabla III.8.6-1: Evolución del pH tras tratamiento térmico en los sistemas modelo elaborados con FOS y proteínas lácteas.

Sistemas Modelo	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)		
		80°C	90°C	100°C
FOS-Hidrocaseína	0	6,92	-	-
	3	6,92	6,96	6,96
	6	6,93	6,97	6,97
	10	6,95	6,97	6,91
FOS-PSLBL	0	6,31	-	-
	3	6,40	6,46	6,50
	6	6,44	6,50	6,54
	10	6,45	6,52	6,54
FOS-CC 2	0	7,09	-	-
	3	7,17	7,10	7,10
	6	7,17	7,10	7,13
	10	7,17	7,10	7,13
FOS-PSLBLPH	0	6,47	-	-
	3	6,49	6,45	6,34
	6	6,48	6,45	6,42
	10	6,46	6,46	6,39

n=2

Tabla III.8.6-2: Evolución del pH tras tratamiento térmico en los sistemas modelo elaborados con maltodextrinas (MDX) y proteínas lácteas.

Sistemas Modelo	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)		
		80°C	90°C	100°C
MDX-PSLBL	0	6,32	-	-
	3	6,60	6,65	6,60
	6	6,52	6,55	6,52
	10	6,52	6,60	6,63
MDX-CC 2	0	6,80	-	-
	3	7,21	7,10	7,10
	6	7,15	7,20	7,16
	10	7,12	7,22	7,17
MDX-Hidroc caseína	0	6,98	-	-
	3	7,10	7,15	7,13
	6	7,12	7,17	7,16
	10	7,15	7,18	7,18
MDX-PSLBLPH	0	6,33	-	-
	3	6,30	6,30	6,28
	6	6,28	6,27	6,27
	10	6,28	6,27	6,26

n=2

Tabla III.8.6-3: Evolución del pH tras tratamiento térmico en los sistemas modelo elaborados con lactosa (LAC) y proteínas lácteas.

Sistemas Modelo	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)		
		80°C	90°C	100°C
LAC-PSL	0	6,38	-	-
	3	6,61	6,65	6,72
	6	6,75	6,74	6,67
	10	6,59	6,60	6,69
LAC-CC 2	0	6,95	-	-
	3	6,95	7,03	7,01
	6	6,95	7,04	7,00
	10	7,03	7,02	7,00
LAC-Hidroc caseína	0	6,67	-	-
	3	6,64	6,64	6,64
	6	6,62	6,60	6,61
	10	6,60	6,60	6,62
LAC-PSLBLPH	0	6,10	-	-
	3	6,10	6,13	6,15
	6	6,15	6,15	6,14
	10	6,14	6,13	6,10

n=2

IV. DISCUSIÓN

IV.1. Determinación de compuestos furánicos (HMF y furfural)

El HMF es un indicador clásico de las etapas intermedias de las reacciones de pardeamiento químico (Berg y Van Boekel, 1994), y es utilizado en numerosos alimentos como un indicador del estado de conservación y correcto procesado de los mismos: cereales infantiles y de desayuno (García-Villanova y col., 1993; Fernández-Artigas y col., 1999a; Guerra-Hernández y col., 1992; Rufián-Henares y col., 2006a y b), miel (Lo Coco y col., 1996; Martínez-Gómez y col., 1993; Serra y col., 2000), leche y derivados (Van Boekel y Zia-Ur-Rehman, 1987; Morales y col., 1992, 1995 y 1996a; Morales y Jimenez-Perez, 1999). En estos últimos el valor de este parámetro permite evaluar el daño producido por los diferentes tratamientos de higienización (esterilización, pasteurización, UHT, tratamiento con microondas...) y pone de manifiesto la correcta aplicación de dichos sistemas (Burton, 1984; Chonan, 1986; Van Boekel y Zia-Ur Rehman, 1987; Fernández-Márquez y col., 1992; Sahai y col., 1992; Berg y Boekel, 1994; Morales y col., 1995; Meissner y Erbersdobler, 1996; Albalá-Hurtado y col., 1997a). En estos alimentos pueden realizarse dos medidas de HMF: libre y potencial (Keney y Basset, 1959), este último permite predecir el daño inicial de la leche en sus primeras etapas (Morales y col., 1997a y b). El HMF también ha sido utilizado en fórmulas infantiles para evaluar el daño térmico en procesos de elaboración y conservación (Albalá-Hurtado y col., 1997a, 1999; Guerra-Hernández y col., 2002a y b; Ferrer y Col., 2002; 2005a). También se ha utilizado en el control del procesado y conservación de fórmulas enterales (Rufián-Henares y col., 2001a y b).

IV.1.1. Estudios de optimización

La técnica seguida en este trabajo fue desarrollada por este equipo de investigación y aplicada en fórmulas enterales. El promedio de recuperación fue de 99,2% para el HMF y 71,1% para el furfural, y los coeficientes de variación fueron de 2,42% para el HMF y 1,23% para el furfural (Rufián-Henares y col., 2001a). El límite de detección fue de $4,95 \times 10^{-3}$ mg/100g de proteína para ambos HMF y furfural (calculado como el triple del ruido de la señal). El límite de cuantificación fue de 0,017 mg/100g de proteína (calculado como 10 veces el ruido de la señal).

En este estudio no fue necesario purificar el extracto acuoso con solvente orgánico (triclorometano). Los valores de HMF obtenidos en el ingrediente proteico PSL sin purificar y purificado fueron 0,16 y 0,15 mg/100 g de proteína respectivamente. Los presentes resultados difieren de los obtenidos por Rufián-Henares y col. (2001a y b) en el análisis de fórmulas enterales con similares ingredientes, donde un paso de purificación fue necesario para evitar la interferencia de compuestos generados durante el procesado. Similares resultados fueron obtenidos cuando otro agente clarificante (ácido tricloroacético (ATC)) fue usado. Sin embargo solo el reactivo de carrez puede ser usado cuando un paso de purificación es incluido, ya que ATC forma una emulsión estable.

IV.1.2. Determinación de HMF y furfural en muestras

IV.1.2.1. Ingredientes proteicos

La tabla III.1.2.1-1 muestra los resultados obtenidos. Las concentraciones de HMF estuvieron entre 0,05 y 2,5 mg/100g de proteína. HMF no fue encontrado en caseínas, proteínas hidrolizadas y proteínas aisladas de soja. Furfural no fue detectado en ningún ingrediente.

El valor más alto de HMF en muestras de suero lácteo fue obtenido en la muestra E-300, lo cual puede ser el resultado del proceso de secado durante la manufactura o inadecuadas condiciones de almacenamiento, ya que los lactosueros 2 y 3 con un mayor contenido de azúcares (tabla III.8.3-1) presentaron valores muy inferiores. Comparando con la muestra E-300, la muestra PSLBL mostró un contenido de HMF 4 veces menor, y 10 veces menor en las muestras restantes. La ausencia de HMF en los caseinatos de calcio, proteínas de suero hidrolizado y proteínas aisladas de soja puede ser debido a sus bajos contenidos de azúcar y alto contenido en proteína (tablas III.8.3-1 y III.8.2-1 respectivamente).

Hay pocos datos publicados sobre contenido de HMF en ingredientes proteicos. Jayaprakasha y Yoon (2005) determinan HMF en concentrados de proteínas de suero lácteo con 70% y 80% de proteína, reportando valores similares a los encontrados en el presente estudio (1,6 y 0,8 mg/kg, respectivamente), con un incremento tras la hidrólisis de 4,3 y 2,3 mg/kg respectivamente. Sin embargo Dogan y col. (2005) encontraron valores de HMF considerablemente mayores, de 12,4–33,5 mg/kg en concentrados de proteínas de suero lácteo.

HMF podría ser usado solo como un indicador de daño térmico en proteínas del lactosuero, ya que estos fueron los ingredientes con mayor contenido de azúcares. El proceso de obtención y/o conservación parece influir mucho en los valores obtenidos para este parámetro.

IV.1.2.2. Fórmulas infantiles

HMF y furfural solo fueron analizados en la formula D por ser esta la única cuyos ingredientes no contenían compuestos furánicos. Las Maltodextrinas usadas en las demás fórmulas ya contienen HMF (1,51 mg/Kg), al igual que las proteínas del lactosuero. El contenido de HMF en los hidratos de carbono no permite comprobar la utilidad de este indicador en fórmulas elaboradas con ingredientes proteicos de diferentes daño térmico.

HMF no fue detectado en la mezcla de ingredientes durante el procesado, sin embargo si fue encontrada en el producto final (tabla III.1.1.2-1). Durante la conservación los incrementos fueron significativos ($p < 0,05$) hasta los 12 meses, tiempo a partir del cual los valores de estabilizan. En este caso el HMF permite controlar el daño térmico durante el procesado y conservación. Por el contrario furfural no fue detectado en ninguna de las muestras.

En fórmulas donde no se emplean Maltodextrinas como carbohidrato y proteínas del lactosuero, ingredientes que suelen contener compuestos furánicos (Rufian-Henares y col., 2001b; Contreras-Calderón y col., 2008) el HMF es un indicador útil del daño térmico producido por Maillard.

No existen datos en la bibliografía sobre compuestos furánicos durante el procesado y conservación de fórmulas infantiles hidrolizadas, sin embargo Ferrer y col. (2000) estudian el efecto del procesado térmico y conservación sobre el contenido de compuestos furánicos en fórmulas en polvo, adaptadas y de continuación, encontrando un valor medio de 0,06 mg HMF/Kg en el suero usado como ingrediente y 0,14 mg HMF/Kg en la mezcla de ingredientes de la fórmula adaptada tras la esterilización. Tras el secado obtienen valores medios de 0,34 y 1,84 mg HMF/Kg para la fórmula adaptada y de continuación respectivamente. Furfural solo fue detectado en la fórmula de continuación tras el procesado. Estos valores de HMF son 2 y 11,5 veces superiores a los encontrados en la fórmula D tras el procesado. Estos mismos autores (Ferrer y col., 2000) encuentran valores de 0,77 y 2,62 mg HMF/Kg tras 6 meses de conservación a 37°C para la fórmula adaptada y de continuación respectivamente. Tras 6 meses de conservación furfural fue encontrado en ambas fórmulas. Los valores de HMF obtenidos en la fórmula adaptada coinciden con los obtenidos en la fórmula D tras 24 meses de conservación a 30°C. Durante la conservación de fórmulas infantiles otros autores (Albala-Hurtado y col., 1998; Guerra-Hernández y col., 2002b) encuentran concentraciones superiores a las encontradas en la fórmula D analizada en este trabajo.

IV.1.2.3. Fórmulas infantiles comerciales

El estudio con fórmulas infantiles comerciales se ha realizado por solicitud e interés de la industria de productos dietéticos que proporciono las fórmulas (A, B, C y D) para el presente trabajo, con el fin de comparar sus fórmulas con las demás fórmulas del comercio.

Se han analizado 8 fórmulas de inicio y 6 de continuación elaboradas con proteínas lácteas, proteínas del lactosuero parcialmente hidrolizadas y proteínas de soja (tabla II.1.3-1).

Los valores de HMF (III.1.1.3-1) variaron entre no detectado para las FI 1, 3 y 10, y 14,2 mg/kg de la FI 12. Furfural tampoco fue detectado en las FI 1, 3 y 10, siendo el valor más alto de 0,62 para la FI 12. Se puede observar claramente que la FI 12 presenta un daño térmico bastante superior al resto de las fórmulas. Debido a que la composición es similar a las otras fórmulas, este valor tan alto en compuestos furánicos puede ser debido a un tratamiento térmico puntualmente alto o a que se han usado ingredientes térmicamente dañados. El valor de HMF fue superior (expresado en mg/100 g de proteína) al obtenido en el estudio de ingredientes proteicos.

Las fórmulas 1, 3 y 10 donde no se encontraron compuestos furánicos, se deben haber utilizado ingredientes de buena calidad (bajo daño térmico) y los tratamientos térmicos en la elaboración de las fórmulas no deben haber sido muy drásticos.

En las demás fórmulas al no conocer exactamente la formulación (tipos de proteínas lácteas, relación caseína/lactosuero) y tratamientos térmicos aplicados no se puede afirmar en qué estado se encuentra la reacción de Maillard. El furfural al no haberse obtenido en los ingredientes podría indicar el tratamiento térmico.

Entre HMF y furfural se observó una correlación inversa ($r^2=0,495$), a mayor HMF menor contenido de furfural, lo cual es inesperado ya que es considerado que la formación de ambos es afectada por los mismos factores, por lo que creemos que la baja correlación puede ser debida a la presencia de HMF en los azúcares de partida. Similares resultados fueron reportados por Albalá-Hurtado y col. (1999) en fórmulas infantiles líquidas al no encontrar correlación entre la formación de HMF y furfural a partir de sus precursores.

Comparando los resultados obtenidos con los reportados por otros autores, se observa que en general las fórmulas de este estudio presentan valores superiores de compuestos furánicos, así Albalá-Hurtado y col. (1998) conserva fórmulas infantiles en polvo durante 9 meses a 20, 30 y 37°C, encontrando valores de HMF y furfural libre entre 10,3 y 23,5 $\mu\text{mol/L}$ (0,84 y 1,91 mg/100g de proteína), y 1,1 y 5,3 $\mu\text{mol/L}$ (0,089 y 0,43 mg/100g de proteína) respectivamente. Ferrer y col. (2000) en fórmulas en polvo, adaptadas y de continuación, encuentran valores en el punto 0 de conservación de 0,34 mg HMF/100 g de proteína (0,039 mg HMF/Kg), no detectando furfural en fórmulas adaptadas; mientras que en las fórmulas de continuación los valores fueron 1,84 mg HMF/100 g de proteína (0,29 mg HMF/Kg) y 0,08 mg furfural/100 g de proteína (0,0128 mg furfural/Kg). Durante la conservación de fórmulas infantiles en polvo Guerra-Hernández y col. (2002b), encuentran valores iniciales de HMF libre de 2,1 mg /Kg. HMF y furfural libre fueron evaluados durante la conservación en fórmulas infantiles en polvo encontrando valores iniciales de 0,85 mg HMF/Kg y 0,0119 mg furfural/Kg en fórmulas no suplementadas con ácidos grasos poli insaturados de cadena larga, y 0,58 mg HMF/Kg, en fórmulas suplementadas, donde no se detectó furfural (Chávez-Servín y col., 2006).

IV.2. Determinación de furosina

La furosina es un indicador de las primeras etapas de la reacción de Maillard y se forma durante la hidrólisis ácida de los compuestos de Amadori (fructosil-lisina, lactulosil-lisina y maltulosil-lisina) producidos por reacción entre el grupo ϵ -amino de la lisina y los azúcares glucosa, lactosa o maltosa (Erbersdobler y Hupe, 1991).

El control del tratamiento térmico de leche y productos lácteos se puede realizar mediante la determinación de furosina. Resmini y Pellegrino (1991), López Fandiño y col. (1993), Corzo y col. (1994a y b), Villamiel y col. (2004), Baptista y Carvalho (2004), Vallejo-Cordoba y col. (2004) y Fenaille y col. (2006) aplican este indicador en leches con alta y baja pasteurización, leches de tratamiento UHT directo e indirecto, esterilizadas y conservadas. La furosina también mide de forma indirecta, la pérdida de lisina en leches procesadas y fórmulas infantiles (Erbersdobler y Hupe, 1991; Evangelisti y col., 1994; Evangelisti y col., 1999).

En fórmulas infantiles, elaboradas con ingredientes lácteos, la furosina ha sido útil en el control de elaboración (Evangelisti y col., 1994; Morales y col., 2004; Baptista y Carvalho, 2004; Fenaille y col., 2006; Penndorf y col., 2007; Martysiak-Zurowska y Stolyhwo, 2007) y conservación (Ferrer, 2001; Ferrer y col., 2003; Guerra-Hernández y col., 2002a y b).

IV.2.1. Estudios preliminares

La furosina se determinó en ingredientes proteicos, fórmulas infantiles y sistemas modelo siguiendo la técnica desarrollada en leche por Resmini y col. (1990).

A fin de elegir la cantidad óptima de muestra de partida se analizaron concentraciones de proteína comprendidas entre 0,28 y 6,37 mg/ml de HCl de hidrolisis para las fórmulas A y B, y entre 0,33 y 6,24 mg/ml de HCl de hidrolisis para las fórmulas con hidrolizados de proteína (C y D). En la fórmula A la máxima conversión a furosina (figura 9) se obtiene para concentraciones entre 0,28 a 1,42 mg de proteína/ml de HCl. En la fórmula B la conversión (figura 10) fue máxima entre 0,28 y 2,83 mg de proteína/ml de HCl. En el caso de las fórmulas hidrolizadas la conversión (figura 11) fue similar en las tres concentraciones estudiadas (0,33-6,24 mg de proteína/ml de HCl). La técnica original de Resmini y col. (1990) para la leche indica que la muestra de partida debe contener entre 5 y 6,5 mg de proteína por ml de HCl. En las fórmulas A y B concentraciones de proteína elevadas producían agregados que podrían estar sin hidrolizar, ya que estudios de furosina en periodos de conservación no mostraron valores congruentes. Las cantidades de muestra para el análisis fueron aproximadamente 0,05 g para todas las fórmulas.

El estudio de precisión incluyendo la hidrolisis ácida, preparación de las muestras y análisis por HPLC, fue evaluado en una fórmula infantil comercial de continuación (n=8), obteniendo un coeficiente de variación de 3,4%, con un valor medio de furosina de 1221 mg/100 g de proteína. El límite de detección (calculado como el triple del ruido de la señal) fue 0,105 mg/100 g de proteína. El límite de cuantificación (calculado como 10 veces el ruido de la señal) fue 0,35 mg/100 g of proteína.

La recta de calibrado se construyó adicionando cantidades crecientes de furosina patrón a una muestra de leche cruda y siguiendo el mismo método de formación y extracción que para las fórmulas infantiles. Las fórmulas contenían cantidades apreciables de furosina y la elección de la leche se basó en la similitud de los componentes proteicos de este alimento con las fórmulas. Además, en la leche cruda no se detectó furosina.

El tiempo de análisis cromatográfico fue de 32 minutos y se obtuvo un pico de furosina bien resuelto aproximadamente a los 24 minutos (figura 12).

IV.2.2. Determinación de furosina en muestras

Los resultados se expresan en mg/g de muestra con objeto de conocer el contenido potencial de este indicador en el producto y en mg/100g de proteína, que permite comparar el daño térmico de unos productos con otros.

IV.2.2.1. Ingredientes proteicos

Los contenidos de furosina obtenidos en el estudio de ingredientes se muestran en la tabla III.2.2.1-1. Los valores de furosina están comprendidos entre 1,36 y 1435 mg/100g de proteínas. Las concentraciones más bajas corresponden a los hidrolizados de proteína (1,36-20,3 mg/100g de proteína), seguidas por la soja y aislados (5,85 y 33,8 mg/100g de proteína) y caseínas (22,8-60,5 mg/100g de proteína). Las proteínas del lactosuero mostraron los valores más altos, entre 354 y 1435 mg/100 g de proteína. El contenido de azúcares (lactosa) en los lactosueros fue siempre superior al resto de ingredientes (Tabla III.8.3-1) lo que explicaría la mayor reactividad. Por otra parte ingredientes con contenido similar de azúcares y proteínas (lactosueros 2 y 3) mostraron valores muy diferentes de furosina (354 y 644 mg/100g de proteína respectivamente) lo que podría indicar un tratamiento térmico diferente y mas drástico para el lactosuero 3.

La correlación (r^2) entre furosina y HMF en proteínas del suero fue 0,1669. Cuando se mide la absorbancia a 420 nm en la misma disolución acuosa empleada en la determinación de HMF solo se obtiene absorbancia en la muestra E-300 lo que indicaría que la reacción de Maillard en esta muestra está más avanzada y furosina podría estar disminuyendo (mayor degradación que generación). Si se omite este valor (muestra E-300) la correlación lineal directa obtenida en las proteínas del suero es casi perfecta ($r^2=0,9746$).

Furosina no puede ser usado como un indicador de daño térmico en el presente estudio debido a la falta de información sobre el tratamiento térmico, de los ingredientes y a los diferentes contenidos de azúcares en las muestras.

Morales y Jiménez-Pérez, (2000) estudian 4 sistemas modelo de caseinato de sodio-lactosa calentados a 110-150°C durante más de 30 min. Los valores obtenidos en la mezcla de ingredientes (33 mg/100 g de proteína) indican que el daño térmico fue menor al obtenido en el caseinato de sodio analizado en el presente trabajo (60,5 mg/100 g de proteína). Rufián-Henares y col. (2004a) analizan el contenido de furosina en sistemas modelo azúcares-proteína calentados a diferentes tiempos y temperaturas, encontrando valores en el punto 0 de 60 mg/100 g de proteína para el sistema elaborado con caseína, 50 mg/100 g de proteína para el sistema elaborado con lactosuero de laboratorio y cerca de 1300 mg/100 g de proteína para el sistema elaborado con lactosuero comercial. Estos datos concuerdan con los obtenidos en este estudio para la caseína y el lactosuero comercial, pero no para el lactosuero de laboratorio que evidentemente posee un contenido de furosina mucho menor ya que según indican los autores no sufrió apenas tratamiento térmico durante su obtención. Penndorf y col. (2007) determinan furosina en proteínas de suero lácteo, encontrando un valor medio de 65,7 mmol/100 g (16,72 mg/100 g de proteína).

La medida de HMF y absorbancia a 420 nm en proteínas del suero puede ser útil para establecer el estado de la reacción de Maillard (inicial o intermedio) y para determinar si la furosina está incrementado o decreciendo, y por tanto utilizar uno u otro indicador para el control del daño térmico en fórmulas elaboradas con estos ingredientes.

IV.2.2.2. Fórmulas infantiles

a) Procesado

Los contenidos de furosina en las diferentes etapas del proceso de elaboración de las fórmulas infantiles elaboradas en planta industrial y piloto se observan en la tabla III.2.2.2-1.

Fórmula A

Los valores de furosina obtenidos en los puntos inicial y final de la planta industrial fueron 620 y 1937 mg/100 g de proteína respectivamente, encontrándose incrementos estadísticamente significativos ($p < 0,05$) entre las etapas estudiadas. En la planta piloto los valores fueron de 802 a 1033 mg/100 g de proteína, y en este caso los incrementos fueron significativos ($p < 0,05$) solo entre punto inicial y final.

Fórmula B

En estas fórmulas los valores de furosina incrementaron desde 360 a 800 mg/100 g de proteína para la planta industrial y 593 a 812 mg/100 g de proteína para la planta piloto. En todas las etapas los incrementos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Fórmula C y D

En las fórmulas parcialmente hidrolizadas se observaron incrementos significativos ($p < 0,05$) en todas las etapas estudiadas, tanto en planta industrial como piloto, excepto entre los pasos 3 y producto final, lo que es lógico ya que en entre estas etapas no hay tratamiento térmico sino una adición de aminoácidos en seco.

El contenido de furosina en el primer paso (mezcla de ingredientes) proviene del presente ya en los ingredientes y del tratamiento térmico ($< 60^\circ \text{C}/3\text{h}$). Esto se demuestra por los datos obtenidos en planta piloto, en el cual la contribución de furosina por parte de los ingredientes de acuerdo a la composición de las fórmulas (tabla II.1.2-2) y el contenido de furosina en los ingredientes (tabla III.2.2.1-1) fue de 694 mg/100g de proteína en la fórmula A, 235 mg/100g de proteína en la fórmula B, y 20,3 mg/100g de proteína en las fórmulas C y D. Cuando el carbohidrato usado fue lactosa, altos incrementos fueron observados durante la mezcla (fórmulas B y D). En general, el incremento de furosina fue mayor entre los pasos 2 (adición de aceite) y 3 (secado) que entre los pasos 1 (mezcla de ingredientes) y 2, lo que se explica por el tratamiento térmico más drástico durante el secado ($215\text{-}230^\circ \text{C}$) que durante la adición de aceite ($90\text{-}95^\circ \text{C}$).

El alto contenido de furosina en el producto final de la formula A planta industrial no fue observado en la planta piloto, lo que indica que incluso cuando los tratamientos térmicos y formulación son los mismos, si los lotes de ingredientes son diferentes, diferentes niveles de daño térmico serán producidos de acuerdo al daño térmico inicial de los ingredientes de partida.

Comparando entre las fórmulas preparadas con proteínas parcialmente hidrolizadas (C y D planta piloto, con el mismo ingrediente) se observa una mayor reactividad en la formula preparada con lactosa (contenido final de furosina 511 mg/100 g de proteína) que en la formula preparada con maltodextrina (dextrosa equivalente = 17) (contenido final de furosina 217 mg/100g de proteína) (tabla III.2.2.2-1).

Fórmulas elaboradas con proteínas bajas en lactosa y maltodextrina como azúcar reductor (formula A) mostraron similar daño térmico que las fórmulas elaboradas con otros ingredientes proteicos y lactosa como azúcar reductor (formula B).

No hay datos publicados sobre el contenido de furosina durante la manufactura de fórmulas infantiles, pero hay información sobre el comportamiento de furosina durante la conservación. Guerra-Hernández y col. (2002b) estudian el efecto de la conservación (a 20 y 55°C durante 90 días en atmosfera de nitrógeno y oxígeno) sobre el pardeamiento químico en fórmulas infantiles en polvo, obteniendo valores de 701 mg de furosina/100g de proteína en fórmulas antes de su conservación, similares a los obtenidos para la formula B en el presente estudio. Sin embargo en un estudio de conservación en fórmulas infantiles a base leche (20 y 37°C durante 24 meses), Ferrer y col. (2003) encontraron valores iniciales bajos, de 141-161,5 mg/100g de proteína. Morales y col. (2004) analizan 6 fórmulas infantiles comerciales en polvo preparadas con proteínas lácteas y lactosa o maltodextrinas y 3 preparadas con proteínas de suero parcialmente hidrolizadas y lactosa o maltodextrina, reportando valores de furosina entre 550-1050 mg/100g de proteína, similares a los resultados obtenidos en las fórmulas A y B pero más altos que los encontrados en las fórmulas parcialmente hidrolizadas (C y D). Baptista y Carvalho, (2004) encuentran valores de furosina sorprendentemente bajos (21-81 mg/100g de proteína) en 13 fórmulas infantiles a base de proteínas lácteas, incluso más bajos que los observados por ellos en leche.

En el tratamiento térmico entre los pasos 1 y 2 se obtuvieron incrementos superiores de furosina que los observados por Resmini y col. (1990) después de la pasteurización en leche. El paso 3 implica secado por atomización del producto, el cual produce mayores incrementos de furosina que los observados después de la adición de aceite (tratamiento térmico indirecto).

Los valores de furosina obtenidos fueron muy altos y variables. Esta variabilidad es debido a los ingredientes usados, ya que la preparación de estas fórmulas fue similar.

Fórmulas con el mismo tipo de proteína (parcialmente hidrolizadas, planta piloto) mostraron mayor reactividad cuando el carbohidrato usado fue lactosa que cuando se uso maltodextrina. Fórmulas con diferentes proteínas mostraron similar reactividad, independientemente del azúcar usado (maltodextrina o lactosa). Aunque los ingredientes originales contenían furosina, esta incrementó durante su tratamiento, lo

que hace que la furosina sea un indicador útil para monitorizar el avance de la reacción de Maillard durante la elaboración de estos productos.

b) Conservación

Los contenidos de furosina en las fórmulas infantiles tras 24 meses de conservación a 4, 20 y 30°C se observa en las tablas III.2.2.2-2 a III.2.2.2-5.

Fórmula A

La figura 16 muestra el comportamiento de la furosina durante la conservación. La conservación de las fórmulas elaboradas en la planta industrial mostró incrementos significativos ($p < 0,05$) a partir del tercer mes, solo a 30°C (tabla III.2.2.2-2). A partir del sexto mes los incrementos fueron significativos ($p < 0,05$) para todas las temperaturas estudiadas y esta tendencia continuó hasta los 12 meses a 4 y 30°C, y hasta los 15 meses a 20°C. A los 15 meses los valores de furosina permanecían estables o descendían ligeramente a 4 y 30°C. A los 24 meses de conservación se observaron descensos de furosina en las tres temperaturas estudiadas. Cuando se compara el mismo mes los cambios también fueron significativos ($p < 0,05$) entre las diferentes temperaturas, excepto a los 12 meses entre 4 y 20°C. La tabla IV.2.2.2-1 muestra la correlación lineal obtenida entre los valores de furosina y tiempo de conservación en las diferentes temperaturas estudiadas. Una correlación muy alta fue obtenida durante el primer año (0,917-0,988) de conservación pero no durante el segundo. El mayor incremento de furosina fue obtenido tras 12 meses de conservación a 30°C en fórmulas preparadas en planta industrial (incremento de 980 mg/100 g de proteína). Después de los 12 meses, los valores de furosina no reflejan el daño térmico.

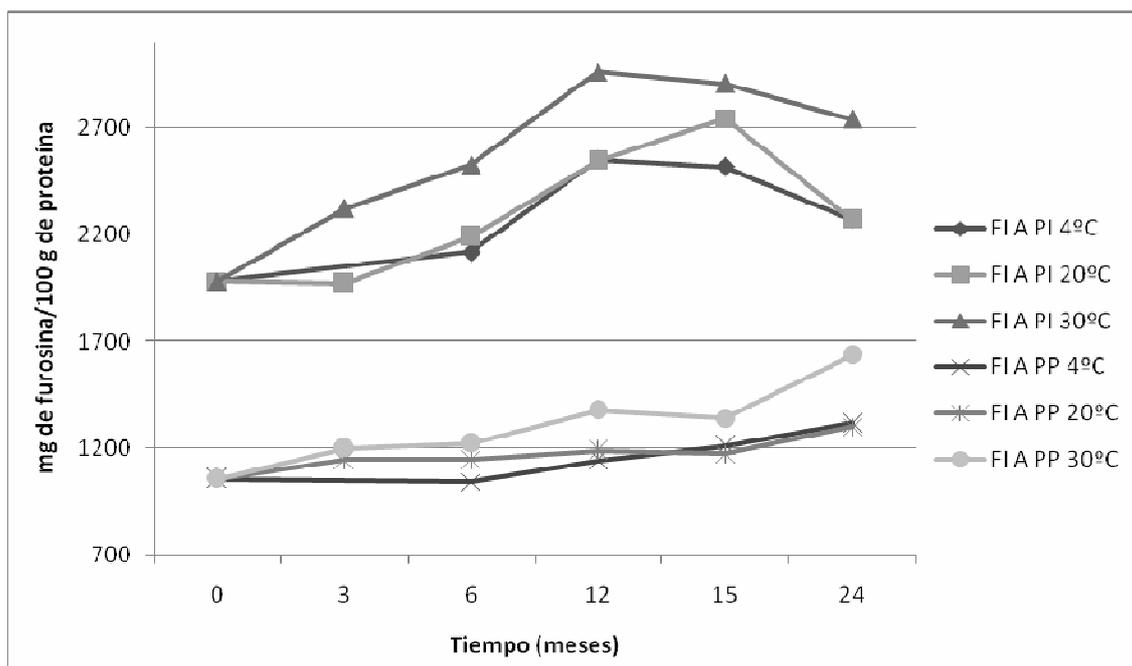
Tabla IV.2.2.2-1. Correlación entre tiempo de conservación y contenido de furosina en las diferentes fórmulas estudiadas.

T ^a (°C)	Tiempo (meses)	Fórmulas							
		A		B		C		D	
		PI	PP	PI	PP	PI	PP	PP	
4	12 ¹	0,917	0,642	0,822	0,996*	0,934	0,365	0,615	
	24 ³	0,331	0,917*	0,400	0,952*	0,094	0,617	0,890*	
20	12 ²	0,933*	0,779	0,949*	0,855	0,966*	0,896	0,777	
	24 ⁴	0,361	0,879*	0,922*	0,923*	0,195	0,733*	0,919*	
30	12 ²	0,988*	0,950*	0,730	0,592	0,956*	0,858	0,929*	
	24 ⁴	0,583	0,949*	0,929*	0,818*	0,861*	0,922*	0,946*	

* Nivel de significación (P < 0,05)

¹: n=3; ²: n=4; ³: n=5; ⁴: n=6

Figura 16: Comportamiento de la furosina durante la conservación de la fórmula infantil A planta industrial (PI) y piloto (PP).



La conservación de las fórmulas elaboradas en planta piloto no mostró un comportamiento similar al de la planta industrial. Los incrementos fueron significativos ($p < 0,05$) tras 3 meses a 20 y 30°C. A 30°C fueron necesarios 12 meses de conservación para observar incrementos nuevamente, no observándose cambios a 15 meses y volviendo a incrementar a los 24 meses. A 20°C, se observaron incrementos significativos ($p < 0,05$) tras 24 meses de conservación. A 4°C el primer incremento significativo se produjo a los 12 meses de conservación y continuó hasta los 24 meses. A 30°C, una alta correlación fue obtenida entre tiempo de conservación y furosina (tabla IV.2.2.2-1) a 24 y 12 meses, obteniéndose los mayores incrementos (581 mg/100 g de proteína) tras 24 meses de conservación. La reactividad fue mucho mayor en las fórmulas elaboradas en planta industrial que en la planta piloto, lo cual puede ser debido principalmente al uso de ingredientes de diferentes lotes. Cuando el daño térmico es alto, como en las fórmulas de la planta industrial, furosina solo es útil como indicador durante el primer año de conservación.

Fórmula B

Las figuras 17 y 18 respectivamente muestran el comportamiento de la furosina durante la conservación. En la fórmula elaborada en planta industrial los incrementos de furosina durante la conservación fueron significativos ($P < 0,05$) a partir del tercer mes a 20 y 30°C siendo más notables a los 24 meses (tabla III.2.2.2-3). Entre temperaturas para el mismo tiempo de conservación se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) tras 3, 6, 15 (solo entre 20 y 30°C) y 24 meses de conservación. A 12 meses no se observaron diferencias significativas entre temperaturas. Tras 24 meses de conservación, los valores de furosina con respecto a los 15 meses incrementaron a 20 y 30°C pero no a 4°C. Estos incrementos fueron mayores a 30°C. Altas correlaciones fueron obtenidas entre tiempo de conservación y contenido de furosina tras 24 meses de

conservación a 20 y 30°C (tabla IV.2.2.2-1). En la formula elaborada en planta piloto se encontraron incrementos significativos ($p < 0,05$) en todas las temperaturas estudiadas en el tercer mes y de nuevo a los 12 meses, seguida por una estabilización de los valores de furosina, hasta que de nuevo incrementa a los 24 meses (tabla III.2.2.2-3). La correlación entre furosina y tiempo de conservación fue alta para las tres temperaturas estudiadas tras 24 meses de conservación (tabla IV.2.2.2-1). Cuando los valores iniciales de furosina no son elevados, este es un indicador útil de daño térmico durante 24 meses de conservación.

Figura 17: Comportamiento de la furosina durante la conservación de la formula infantil B planta industrial (PI).

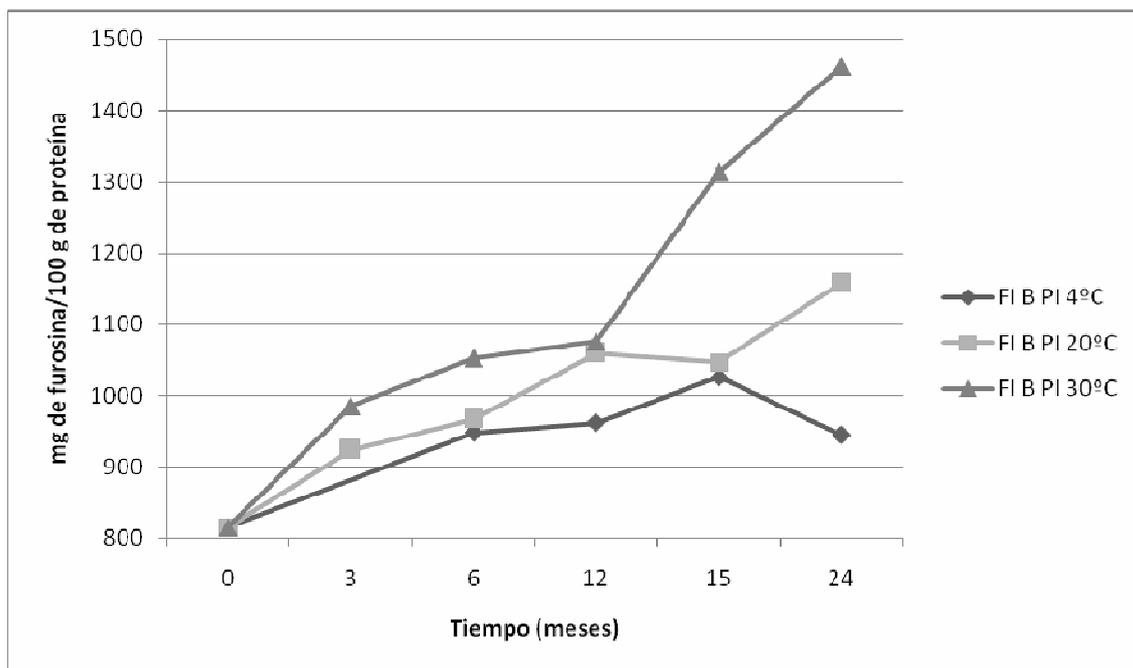
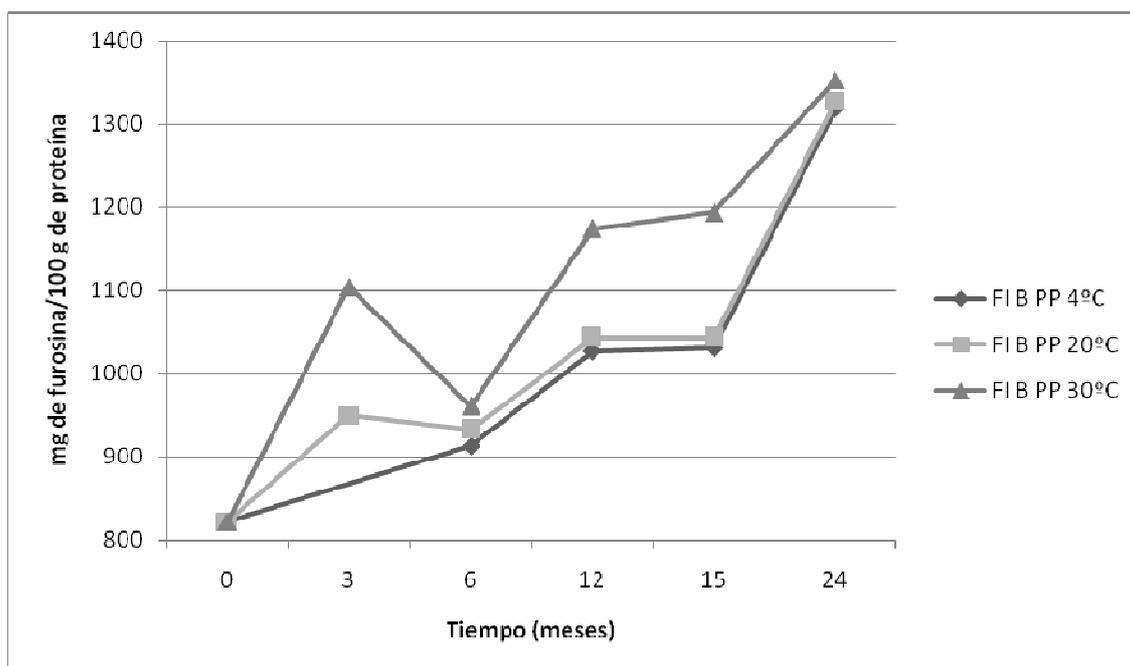


Figura 18: Comportamiento de la furosina durante la conservación de la fórmula infantil B planta industrial (PI).



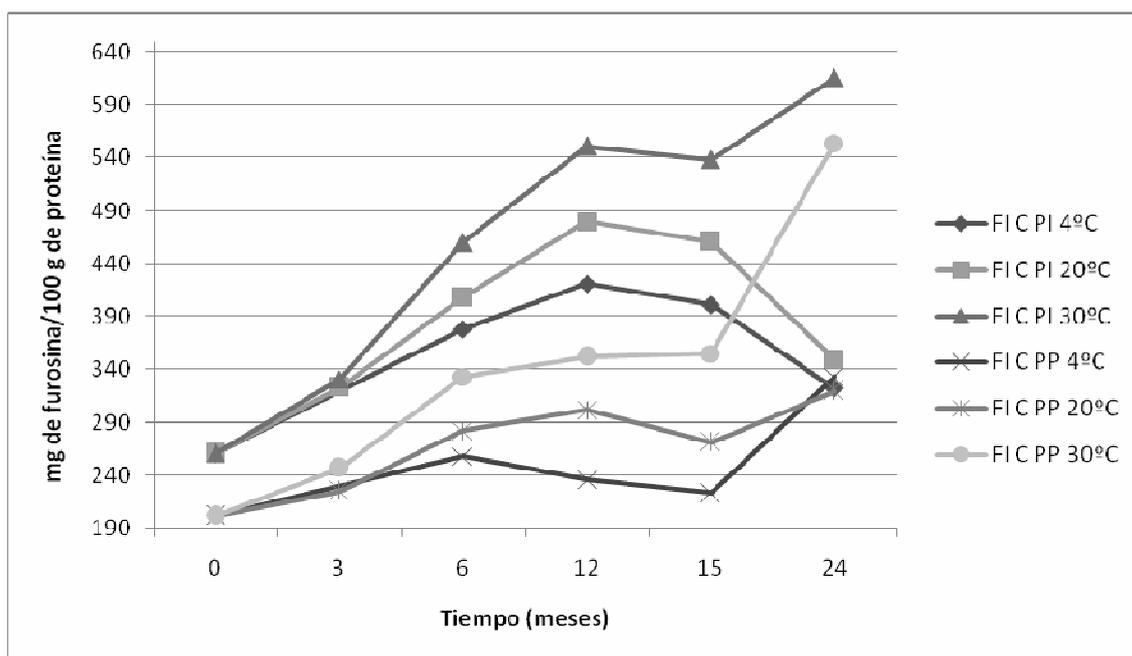
Comparando las fórmulas A y B (con proteínas intactas) tras la conservación durante 24 meses, el mayor incremento de furosina fue observado en la fórmula A elaborada en planta industrial, mientras que la fórmula A planta piloto y fórmula B de ambas plantas mostraron un menor y similar incremento. La fórmula A tiene un 30% de maltodextrinas como carbohidrato mientras que la fórmula B tiene un 50% de lactosa, lo que indica que el comportamiento de la furosina depende más del daño térmico inicial de las proteínas usadas que del tipo y concentración de azúcares usados. Diferencias tan grandes en reactividad y concentración de azúcares (maltodextrina y lactosa) pueden verse compensadas por la diferente reactividad de las proteínas utilizadas, por lo que no se pueden comparar fórmulas con diferentes ingredientes (FI A y B). En ambas fórmulas se observaron incrementos de furosina en todas las temperaturas estudiadas. Los valores obtenidos a 4°C fueron ligeramente más bajos que los obtenidos a 20°C y en general mucho más bajos que los obtenidos a 30°C. Por lo tanto se recomienda conservar entre 4 y 20°C.

Fórmula C

La figura 19 muestra el comportamiento de la furosina durante la conservación. En las muestras elaboradas en planta industrial los incrementos fueron significativos ($p < 0,05$) desde el tercer mes para todas las temperaturas y continuo con esta tendencia hasta los 12 meses, tiempo a partir del cual los valores de furosina empezaron a descender, excepto a 30°C/24 meses, donde un incremento significativo ($p < 0,05$) fue observado (tabla III.2.2.2-4). Entre temperaturas para los mismos tiempos de conservación los incrementos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en todos los casos. Una alta correlación lineal fue obtenida entre furosina y tiempo de conservación durante el primer año en todas las temperaturas estudiadas (tabla IV.2.2.2-

1). En las muestras de la planta piloto, los incrementos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) desde los 3 meses de conservación y continuo hasta los 6 meses (tabla III.2.2.2-4), tiempo a partir del cual los valores se estabilizan, produciéndose nuevamente un alto incremento tras 24 meses a 30°C. La correlación lineal obtenida entre furosina y tiempo de conservación fue 0,8961 y 0,8584 para el primer año de conservación a 20 y 30 °C, respectivamente, y 0,922 tras 2 años a 30 °C (tabla IV.2.2.2-1).

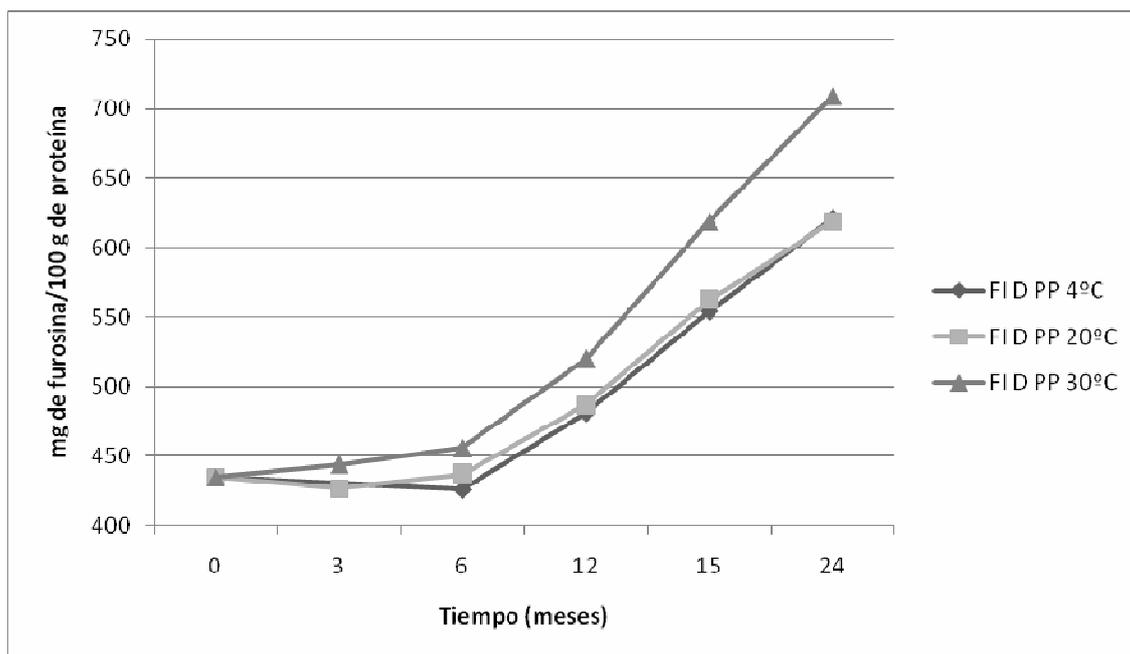
Figura 19: Comportamiento de la furosina durante la conservación de la formula infantil C planta industrial (PI) y piloto (PP).



Fórmula D

La figura 20 muestra el comportamiento de la furosina durante la conservación. Durante los primeros 6 meses de conservación los valores de furosina permanecen estables en las tres temperaturas estudiadas, tiempo a partir del cual los valores incrementan significativamente ($p < 0,05$) en todas las temperaturas hasta los 24 meses (tabla III.2.2.2-5). El valor más alto de furosina se observó tras 24 meses/30°C. No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la conservación a 4 y 20°C. Tras 24 meses a 30°C el incremento de furosina en esta fórmula (proteína parcialmente hidrolizada y lactosa) fue próximo al de la formula C planta piloto, preparada con la misma proteína y maltodextrina. Sin embargo durante el procesado la formula D elaborada con lactosa mostró mayor reactividad (expresada en furosina) que la fórmula C elaborada con la misma proteína y maltodextrina como carbohidrato. Altas correlaciones entre tiempo de conservación y furosina fueron obtenidas tras 24 meses de conservación a 20 y 30°C tras 12 y 24 meses (tabla IV.2.2.2-1).

Figura 20: Comportamiento de la furosina durante la conservación de la fórmula infantil D planta industrial (PI) y piloto (PP).



Como en el caso de las fórmulas elaboradas con proteínas intactas, las fórmulas con proteínas parcialmente hidrolizadas también mostraron valores más bajos de furosina a 4°C, y las diferencias entre 4 y 20°C fueron mucho más bajas que las obtenidas entre 20 y 30°C. Por lo tanto proponemos conservar las fórmulas con proteínas parcialmente hidrolizadas por debajo de 20°C. Las fórmulas con proteínas intactas (A y B) mostraron incrementos muy similares de furosina, y mayores que los obtenidos en las fórmulas con proteínas parcialmente hidrolizadas (C y D). El comportamiento obtenido durante la conservación a 30°C/24 meses de fórmulas con ingredientes y procesos similares pero elaboradas en distinta plantas fue también similar, excepto en la fórmula A, donde el daño térmico de partida fue mayor.

Ferrer y col. (2003) estudian la conservación de fórmulas adaptadas y de continuación durante 24 meses a 20 y 37°C. Los valores iniciales de furosina fueron 161 y 141 mg/100g de proteína respectivamente, obteniendo los valores más altos a 20°C tras 15 meses de almacenamiento (689 y 634 mg/100 g de proteína respectivamente para la fórmula adaptada y de continuación). A 37°C los valores más altos se obtuvieron tras 21 y 12 meses de conservación respectivamente para la fórmula adaptada y de continuación (971 y 856 mg/100 g de proteína respectivamente). Estos valores son más bajos que los obtenidos en nuestras fórmulas A y B, donde los valores iniciales ya son muy altos; sin embargo los incrementos fueron mayores probablemente debido al uso de ingredientes térmicamente dañados. Guerra y col. (2002b) estudian los cambios químicos en fórmulas infantiles en polvo durante la conservación a 20 y 55°C durante 90 días, bajo atmósfera de oxígeno y nitrógeno, obteniendo un contenido inicial de furosina de 701 mg/100 g de proteína y un contenido máximo de 5484 mg/100 g de proteína tras 30 días a 55°C bajo atmósfera de nitrógeno. A 20°C y bajo atmósfera de nitrógeno, hubo un incremento en furosina tras 15 días y una disminución tras 90 días.

c) Conservación Aw 0,65

A fin de confirmar los hallazgos de la conservación a Aw propia del producto, las fórmulas se conservaron a valores de actividad de agua que favorecen la reacción de Maillard. Los contenidos de humedad alcanzaron en algunas muestras valores próximos al 9% en la primera semana.

Fórmula A

La figura 21 muestra el comportamiento de la furosina durante la conservación. Los incrementos de furosina observados en planta industrial y piloto fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en todos los tiempos y temperaturas excepto a 20°C en la tercera y cuarta semana de la planta industrial (tabla III.2.2.2-6).

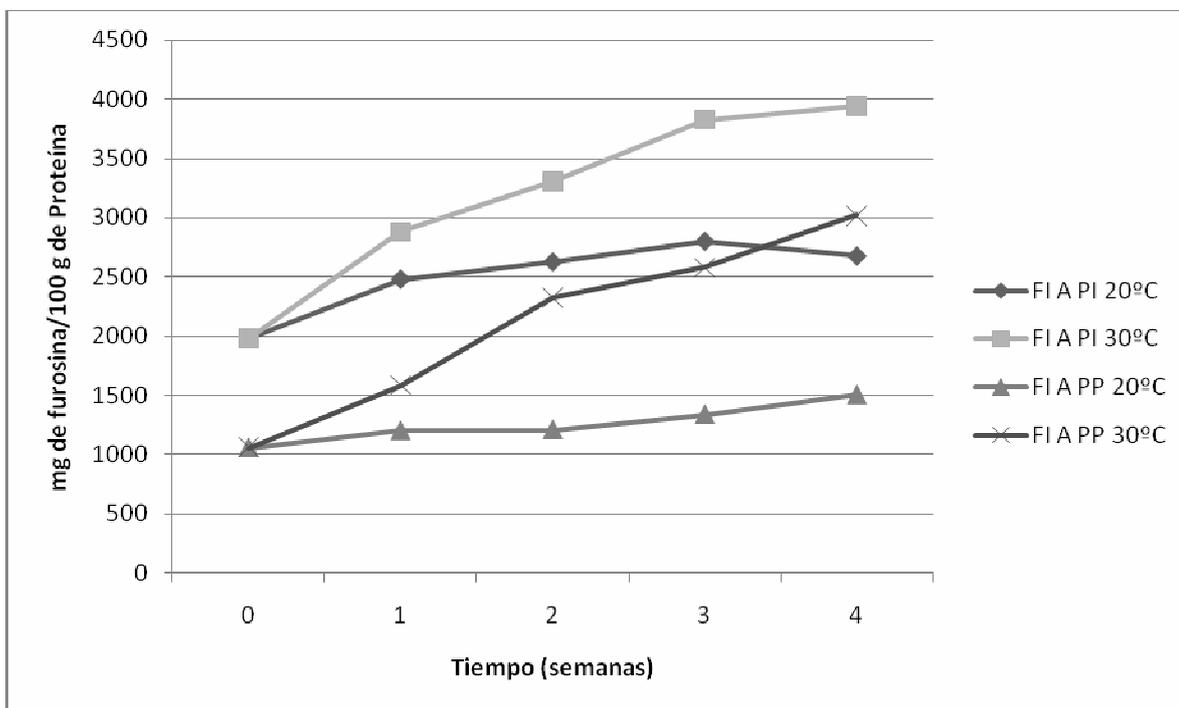
El incremento de furosina con respecto al punto cero tras cuatro semanas de conservación a 20°C fue de 692 mg/100 g de proteína en la planta industrial y 447 mg/100 g de proteína en planta piloto. A 30°C los incrementos con respecto al punto cero fueron de 1966 y 1964 mg/100 g de proteína para la planta piloto y planta industrial respectivamente.

Tras cuatro semanas de conservación a 20°C se obtienen casi los mismos valores de furosina que los obtenidos a 30°C en la primera semana, tanto en planta industrial como piloto.

A 30°C y Aw 0,65 se necesitaron entre 1 y 2 semanas para alcanzar los valores de furosina obtenidos tras 15 y 24 meses de conservación a actividad de agua propia del producto.

Una alta correlación lineal fue obtenida entre furosina y tiempo de conservación en planta industrial a 20 y 30°C tras 3 semanas (0,9091 y 0,9714, respectivamente), la cual disminuyó en la 4 semana (0,7198 y 0,9325, respectivamente) (tabla IV.2.2.2-2). En la planta piloto se observó una alta correlación a 20 y 30°C tras 3 (0,9187 y 0,9694, respectivamente) y 4 (0,9435 y 0,9761, respectivamente) semanas de conservación. Este comportamiento es similar al observado cuando las fórmulas fueron conservadas a Aw propia del producto durante 24 meses, donde se obtuvo una alta correlación furosina y tiempo de conservación a 20 y 30°C durante el primer y segundo año en las fórmulas de la planta piloto, mientras que esta correlación solo fue obtenida en planta industrial durante el primer año de conservación (tabla IV.2.2.2-1).

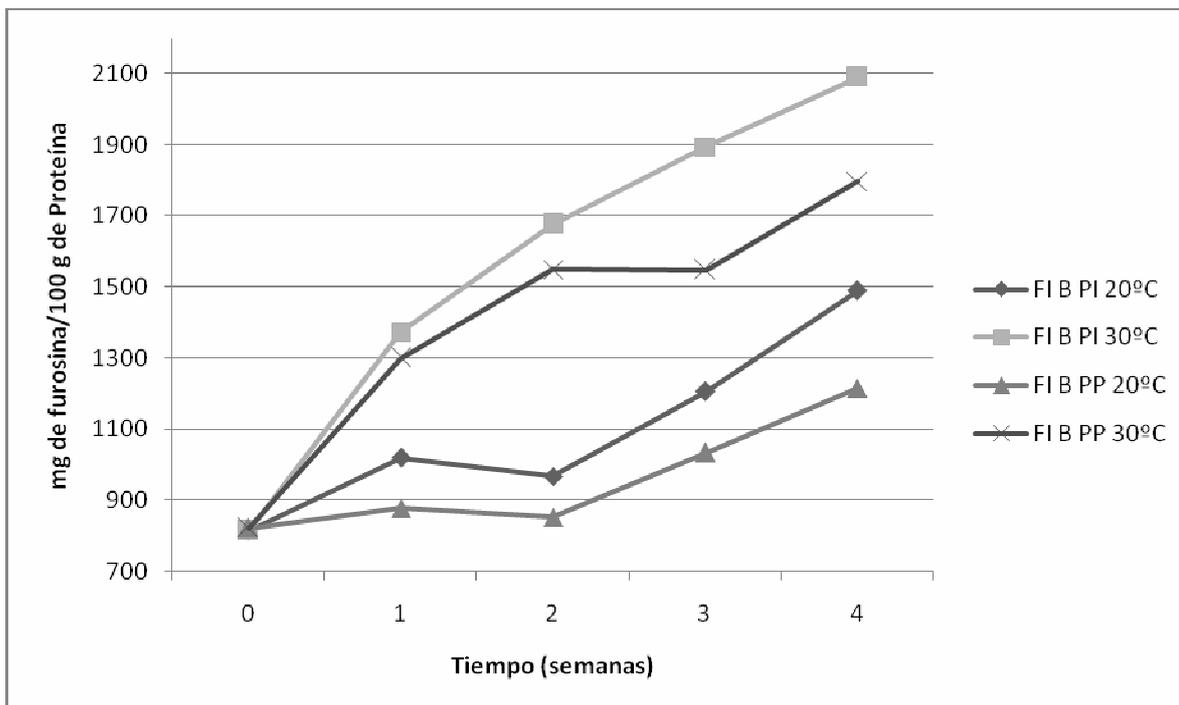
Figura 21: Comportamiento de la furosina durante la conservación a Aw 0,65 de la formula infantil A planta industrial (PI) y piloto (PP).



Fórmula B

La figura 22 muestra el comportamiento de la furosina durante la conservación. Los incrementos de furosina obtenidos tras la conservación a 20 y 30°C en las fórmulas elaboradas en planta industrial y piloto fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en todos los tiempos y temperaturas ensayados (tabla III.2.2.2-7). Los incrementos de furosina obtenidos fueron mayores para las muestras de planta industrial. Así a 20°C el incremento con respecto al punto 0 en planta piloto fue de 393 mg/100 g de proteína frente a los 675 mg/100 g de proteína de la planta industrial. A 30°C el incremento con respecto al punto inicial en la planta piloto fue de 975 mg/100 g de proteína y en la planta industrial de 1275 mg/100 g de proteína. A 30°C y Aw 0,65 se necesitan menos de 2 semanas para alcanzar los valores de furosina obtenidos tras 2 años de conservación a la Aw propia del producto. La correlación entre furosina y tiempo de almacenamiento en las diferentes temperaturas ensayadas se muestran en la tabla IV.2.2.2-2. Las correlaciones más altas fueron obtenidas tras 4 semanas de conservación tanto a 20°C como a 30°C. A Aw propia del producto también se obtuvo una alta correlación cuando la conservación se realizó a tiempos más largos (24 meses).

Figura 22: Comportamiento de la furosina durante la conservación A_w 0,65 de la formula infantil B planta industrial (PI) y piloto (PP).



Fórmulas C y D

La figura 23 muestra el comportamiento de la furosina durante la conservación. A 20°C no se obtuvieron incrementos significativos ($p < 0,05$) para las fórmulas elaboradas con proteínas parcialmente hidrolizadas, salvo el pequeño incremento obtenido en las fórmulas C y D elaboradas en planta piloto, entre el punto inicial y la primera semana, y entre el punto inicial, primera y segunda semana para las formula C de planta industrial. Sin embargo a 30°C los incrementos fueron significativos ($p < 0,05$) en todos los tiempos (tablas III.2.2.2-8 y III.2.2.2-9). La correlación entre valores de furosina y tiempo de almacenamiento en las diferentes temperaturas ensayadas para las fórmulas C and D se muestran en la tabla IV.2.2.2-2. La formula C elaborada en planta industrial mostró alta correlación lineal a 20 y 30°C tras 3 y 4 semanas de conservación, mientras que en formula C planta piloto solo se observó una alta correlación tras conservación a 30°C (tabla IV.2.2.2-2). Resultados similares se obtuvieron en la formula C elaborada en planta piloto conservada a 30°C a actividad de agua propia del producto. Altas correlaciones entre tiempo de conservación y furosina se obtuvieron en la formula D cuando se conservó a 30°C y A_w 0,65 (tabla IV.2.2.2-2). A A_w propia del producto, altas correlaciones también fueron obtenidas en la formula D tras largos periodos de conservación (30°C/24 meses). En la formula C los incrementos de furosina tras 4 semanas de conservación a 30°C fueron similares entre planta industrial y piloto (1100 y 917 mg/100 g de proteína, respectivamente) (tabla III.2.2.2-8).

Ge pan y Melton (2007) calientan una mezcla seca de caseinato sódico y lactosa a 60°C durante 96 horas a diferentes humedades relativas (HR), encontrando los mayores niveles de formación de furosina a HR=67% tras 12 y 24 horas, y HR=50% tras 96 horas.

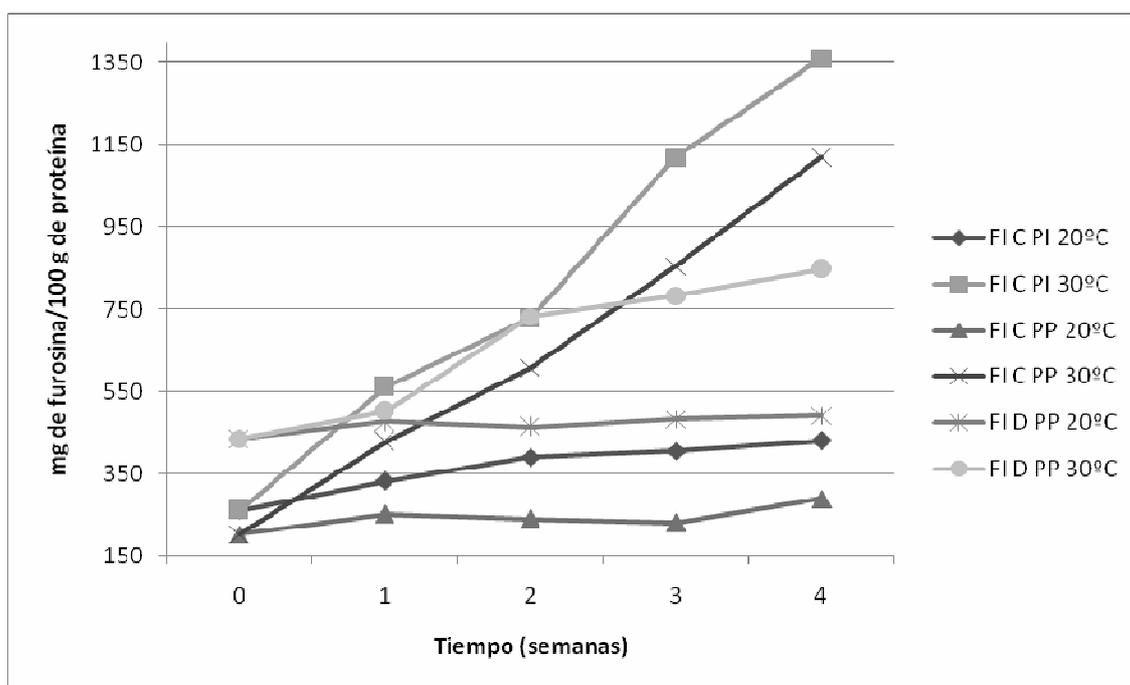
Tabla IV.2.2.2-2: Correlación (r^2) entre tiempo de conservación a Aw 0,65 y contenido de furosina.

T ^a (°C)	Tiempo (semanas)	Furosina								
		A		B		C		D		
		PI	PP	PI	PP	PI	PP	PP		
20	3	0,909*	0,919*	0,805	0,694	0,934*	0,215	0,637		
	4	0,720	0,944*	0,879*	0,821*	0,920*	0,590	0,746		
30	3	0,971*	0,970*	0,954*	0,837	0,978*	0,997*	0,931*		
	4	0,932*	0,976*	0,947*	0,885*	0,989*	0,996*	0,932*		

* Nivel de significancia (P<0,05)

n=5

Figura 23: Comportamiento de la furosina durante la conservación Aw 0,65 de las fórmulas infantiles C y D planta industrial (PI) y piloto (PP).



IV.2.2.3. Fórmulas infantiles comerciales

Los valores de furosina presentan un intervalo amplio, entre 379 mg/100g de proteína para la fórmula 14 a base de proteínas aisladas de soja y 1459 mg/100g de proteína para la fórmula 10 elaborada con proteínas séricas hidrolizadas (tabla III.2.2.3-1).

El valor medio de furosina obtenido en las 9 fórmulas elaboradas con proteínas lácteas intactas fue de 952 mg/100 g de proteína, similar al obtenido en las 4 fórmulas elaboradas con proteínas lácteas parcialmente hidrolizadas (945 mg/100 g de proteína). El valor medio obtenido en las fórmulas A y B elaboradas con proteínas intactas fue de

1146 mg/100 de proteína, sin embargo si no se tiene en cuenta el valor tan alto de la formula A planta industrial se obtiene un valor medio de 852 mg/100 g de proteína, similar a lo obtenido en las fórmulas comerciales. Sin embargo la media de furosina de las fórmulas C y D elaboradas con proteínas parcialmente hidrolizadas fue de 299 mg/100 g de proteína, muy inferior a la obtenida en las fórmulas del comercio con proteínas del mismo tipo.

Esta diferencia en los valores de furosina es también encontrada por otros autores; así en fórmulas elaboradas con proteínas intactas se han encontrado valores entre 141 y 1551 mg/100 g de proteína (Guerra-Hernandez y col., 2002b; Ferrer y col., 2003; Morales y col., 2004; Fenaille y col., 2006; Penndorf y col., 2007; Martysiak-Zurowska y Stolyhwo., 2007), y entre 130 y 900 mg/100 g de proteína en fórmulas elaboradas con hidrolizados de proteína (Morales y col., 2004; Fenaille y col., 2006; Penndorf y col., 2007). Excepcionalmente Baptista y Carvalho (2004) encuentran valores muy bajos en fórmulas infantiles, entre 21,4 y 81,5 mg/100 g de proteína para una formula sin lactosa y con proteína de suero parcialmente hidrolizada respectivamente.

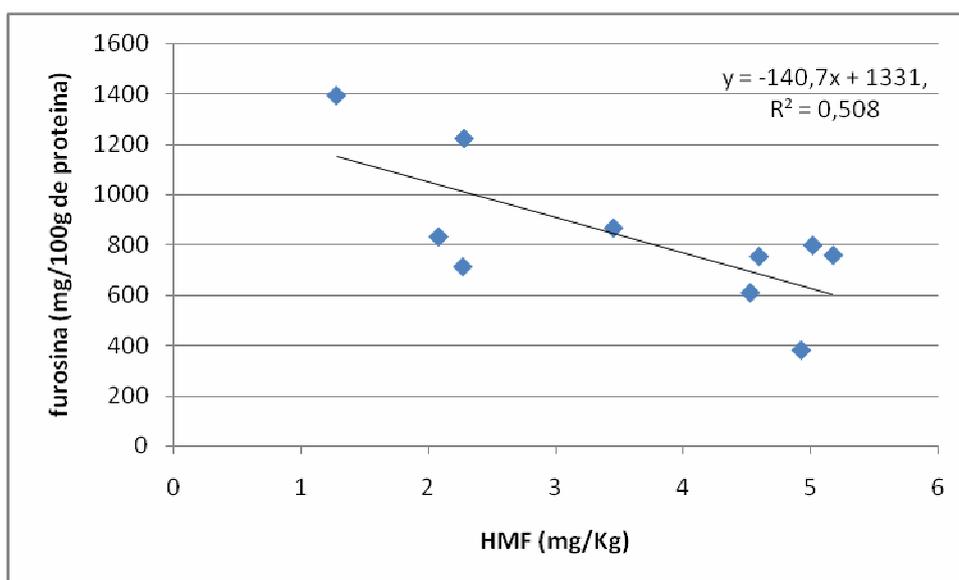
Los pocos datos encontrados en la bibliografía sobre el análisis de fórmulas elaboradas con proteínas de soja (Morales y col., 2004) coinciden con los obtenidos en este trabajo.

La diferente formulación, el distinto daño térmico de los ingredientes y el diferente procesado hacen que este indicador, a diferencia de lo que ocurre en la leche, solo pueda utilizarse para el control del proceso de elaboración y conservación de la misma fórmula.

Haciendo una correlación global entre HMF/furosina y furfural/furosina y excluyendo las fórmulas 1, 3 y 10 en las que no se detectaron compuestos furánicos y la muestra 12 que mostró valores muy altos (figuras 24 y 25) obtenemos una correlación inversa en el primer caso y directa en el segundo caso.

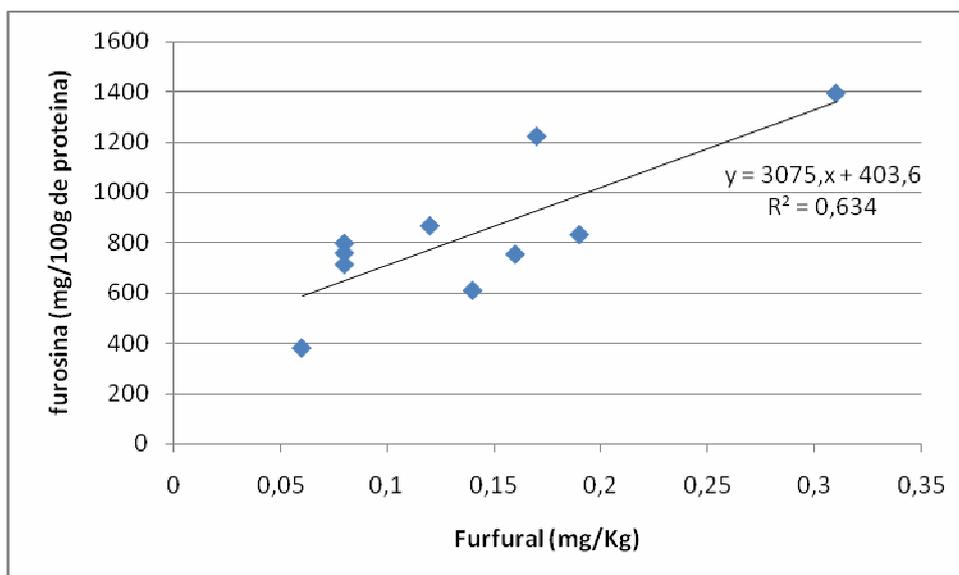
La correlación inversa entre HMF y furosina (figura 24) sugiere un avance de la reacción de Maillard por degradación de compuestos de Amadori (indicador de primeras etapas; medido como furosina) y formación de HMF (indicador de etapas intermedias). Sin embargo es la fórmula 14 con proteína aislada de soja la que presenta el menor contenido de furosina y mayor en HMF. En la tabla III.1.2.1-1 se observa que las proteínas de soja analizadas en este trabajo no contienen compuestos furánicos y los valores de furosina son bajos, por lo que pensamos que los altos valores de HMF pueden proceder de las Maltodextrinas (Rufián-Henares y col 2001b) presentes en la formulación y no a la reacción de Maillard durante el procesado. En el caso de esta formula (FI 14) la furosina sería el indicador de daño térmico ya que la reacción de Maillard se encuentra en etapas iniciales.

Figura 24: Correlación entre HMF y furosina.



En el caso del furfural se observa todo lo contrario, una correlación directa con furosina (figura 25). Furfural no fue detectado en ninguno de los ingredientes analizados en este trabajo (tabla III.1.2.1-1) por lo que previsiblemente tampoco lo contengan los de las fórmulas comerciales y este sea el indicador de Maillard útil durante el procesado.

Figura 25: Correlación entre furfural y furosina.



IV.2.2.4. Sistemas modelo

Los sistemas modelo se realizaron con el propósito de evaluar la reactividad por separado de los diferentes ingredientes proteicos e hidrocarbonados utilizados por la industria en la elaboración de las fórmulas objeto de este trabajo. Es de gran importancia conocer la reactividad que presentan estos ingredientes ya que esto permite hacer recomendaciones a la industria que puedan contribuir a mejorar los procesos y obtener productos con mayor valor nutricional, que en definitiva es el objetivo primordial de estos alimentos.

Las concentraciones de lactosa (LAC), maltodextrina (MDX) y proteína (tabla II.1.3-1) usadas en la elaboración de los sistemas modelo son las usadas normalmente en la elaboración de fórmulas de continuación, adaptadas sin lactosa y parcialmente hidrolizadas. La concentración de FOS seleccionada para elaborar los sistemas modelo fue la misma que la usada en el sistema modelo LAC-PSLBLPH (tabla II.1.3-1) por ser este el sistema con mayor contenido de carbohidratos.

Los resultados obtenidos se pueden observar en las tablas III.2.2.4-1 a III.2.2.4-3.

Sistemas modelo FOS

La reactividad mostrada por los sistemas con FOS fue muy baja (tabla III.2.2.4-1), y solo se obtuvieron incrementos significativos ($p < 0,05$) en el sistema FOS-Hidrocasaína, a partir de 10 minutos a 100°C, y en el sistema FOS-PSLBLPH a los 6 y 10 minutos a 120°C, obteniéndose para este último sistema una correlación lineal de 0,980 entre tiempo y temperatura (tabla IV.2.2.4-1). En el caso del sistema modelo FOS-Hidrocasaína el incremento con respecto al punto 0 tras 10 min/120°C fue de casi el doble, y la correlación tiempo y temperatura fue mayor a medida que la temperatura aumento, obteniéndose un r^2 de 0,969 a 120°C (tabla IV.2.2.4-1). En el sistema modelo FOS-PSLBL se registró un descenso de los valores de furosina, y en el sistema modelo FOS-CC 2 no se observaron cambios significativos.

Tabla IV.2.2.4-1: Correlación entre tiempo y temperatura para el indicador furosina.

Sistemas Modelo	80°C	90°C	100°C	120°C
FOS-Hidrocaseína ¹	0,319	0,917*	0,920*	0,969*
FOS-PSLBLPH ²	-	-	-	0,980
MDX-CC 2 ¹	0,929*	0,999*	0,973*	-
MDX-Hidrocaseína ¹	0,854	0,945*	0,837	-
MDX-PSLBLPH ¹	0,942*	0,926*	0,966*	-
LAC-PSL ¹	0,013	0,728	0,708	-
LAC-CC 2 ¹	0,948*	0,991*	0,946*	-
LAC-Hidrocaseína ¹	0,974*	0,822	0,892	-
LAC-PSLBLPH ¹	0,907*	0,982*	0,994*	-

* Nivel de significancia (P<0,05)

¹: n=4; ²: n=3

Para entender mejor el comportamiento de los sistemas modelo con FOS, se elaboro un sistema modelo con CC 2 (8,05%)-Fructosa (27,18 %), se calentó a 120°C durante 10 min y se analizo furosina, HMF, absorbancia a 284nm y 420 nm, y también se determino la cantidad de fructosa en los FOS (tabla IV.2.2.4-2). No se observaron incrementos significativos (p<0,05) de furosina, HMF ni absorbancia a 420 nm. Solo se observó incremento en la absorbancia a 284 nm lo que nos demuestra la reactividad de la fructosa. De esta manera comprobamos que la fructosa presente en este caso en los FOS no es precursor de furosina, sin embargo no se explica de donde se genera furosina en los FOS-Hidrocaseína y FOS-PSLBLPH, por lo que se deduce que es debido al pequeño contenido de lactosa en los ingredientes proteicos, ya que la hidrocaseína contiene 261 mg/100g y la PSLBLPH 94,76 mg/100g (tabla III.8.3-1), por lo que serían estos carbohidratos los precursores de furosina en estos sistemas modelo. También se determinó la absorbancia a 284 y 420 nm en todos los sistemas modelo FOS (tabla IV.2.2.4-3), obteniendo incrementos significativos (p<0,05) solo en el FOS-PSLBL a partir 6 min/100°C especialmente a 284 nm, lo cual se puede explicar por el mayor contenido de azúcares en el ingrediente de partida, que contiene lactosa (80 mg/100 g), galactosa (1750 mg/100 g) y glucosa (1580 mg/100 g) (tabla III.8.3-1), y por tanto su mayor reactividad. Esto confirma que aunque en el FOS- PSLBL la furosina descienda la reacción de Maillard sigue avanzando.

Furosina no puede ser utilizado como indicador de daño térmico por Maillard en sistemas modelo elaborados con fructo-oligosacaridos.

Tabla IV.2.2.4-2: Contenido de furosina, HMF, absorbancia a 284 y 420 nm en el sistema modelo CC 2-fructosa, y contenido de fructosa en los FOS.

	Furosina mg/100g prot	HMF mg/kg	Absorbancia 284 nm	Absorbancia a 420 nm	Fructosa en los FOS mg/100 g
Pto 0	23,6±1,47	0,76±0,12	0,124±0,008	0,005±0,001	550±16,5
120°C/10 min	26,76±1,57	0,70±0,04	0,171±0,011	0,006±0,001	

n=2

Tabla IV.2.2.4-3: Absorbancia a 284 y 420 nm en los sistemas modelo FOS.

Sistema Modelo	284 nm	420 nm
FOS-Hidrocaseína		
Pto 0	1,060±0,018	0,004±0,001
80°C/10 min	1,006±0,005	-
90°C/10 min	1,064±0,013	-
100°C/10 min	1,071±0,018	0,005±0,001
FOS-PSLBL		
Pto 0	0,058±0,003	0,004±0,001
80°C/10 min	0,051±0,001	-
90°C/10 min	0,056±0,004	-
100°C/3 min	0,054±0,006	0,007±0,003
100°C/6 min	0,077±0,004	0,007±0,001
100°C/10 min	0,113±0,001	0,009±0,001
FOS-CC 2		
Pto 0	0,018±0,000	0,000
100°C/10 min	0,019±0,002	0,000
FOS-PSLBLPH		
Pto 0	0,373±0,010	0,003±0,002
120°C/10 min	0,380±0,017	0,002±0,001

n=2

Braekman y col. (2001) estudian el efecto del tipo de carbohidrato usado sobre la extensión de la reacción Maillard en productos lácteos endulzados y en un sistema modelo libre de lactosa en el cual se modificó el contenido de carbohidratos y se sometió a pasteurización. Estos autores observan un fuerte incremento del color pardo cuando usan glucosa y fructosa. Tras 10 horas de calentamiento el contenido de furosina reflejó la extensión de la reacción de Maillard, con excepción de los sistemas que contenían mezclas de fructosa y oligofructosa, en los cuales se detectaron concentraciones muy bajas de furosina. Esto es debido probablemente al hecho de que con fructosa como azúcar reductor no se forman precursores de furosina, o que estos se degradan rápidamente de nuevo después de la formación (Van Boeckel y Brands, 1998). Esto resultados concuerda con los obtenidos en el presente trabajo.

Sistemas modelo con Maltodextrinas

En el sistema modelo MDX-PSLBL solo se ha estudiado el calentamiento realizado a 100°C/10 min, observándose un ligero descenso en el valor de furosina con respecto al punto 0 (Tabla III.2.2.4-2). No se realizó el estudio a otras temperaturas ya que al decrecer el indicador carece de utilidad. El sistema modelo MDX-CC 2 mostró incrementos significativos ($p < 0,05$) a partir de los calentamientos realizados a 90°C. A partir de esta temperatura la tendencia es siempre creciente para todos los tiempos. El incremento máximo con respecto al punto inicial fue de 39 mg/100 g de proteína a 100°C/10 minutos, obteniéndose correlaciones lineales entre tiempo y temperatura superiores a 0,90 para todas las temperaturas (tabla IV.2.2.4-1). El sistema modelo MDX-Hidrocaseína mostró incrementos significativos ($p < 0,05$) desde los 3 minutos de calentamiento a 80°C, y fue más notable cuando el tratamiento fue más drástico. Al igual que el sistema anterior el incremento máximo alcanzado es pequeño (32 mg/100g de proteína) sin embargo el valor con respecto al punto inicial es de 7,3 veces superior, con una correlación lineal tiempo y temperatura mayor de 0,83 para las tres temperaturas ensayadas (tabla IV.2.2.4-1). En el sistema modelo MDX-PSLBLPH los cambios fueron significativos ($p < 0,05$) en todos los tiempos y temperaturas ensayadas excepto a 80 y 90°C entre 6 y 10 minutos. El incremento máximo obtenido con respecto al punto inicial fue de 126 mg/100g de proteína tras 10 minutos a 100°C, lo que representa 7 veces el contenido inicial, con correlaciones lineales tiempo y temperatura superiores a 0,92 (tabla IV.2.2.4-1) para todas las temperaturas ensayadas. En los sistemas con maltodextrina el valor de furosina incremento 7 veces en los sistemas elaborados con hidrolizados de proteínas y sólo 2 veces en los sistemas con proteínas intactas. Al igual que en los sistemas modelo con FOS los valores de furosina descendieron tras el tratamiento cuando la proteína utilizada fue PSLBL. El alto contenido inicial de furosina en la PSLBL (tabla III.2.2.1-1) limita la utilidad de este indicador durante la conservación ya que este es propio de etapas iniciales.

En sistemas modelo elaborados con la misma proteína pero usando FOS y MDX como carbohidrato se observa mayor reactividad en estos últimos, lo que es lógico ya que los FOS no son reductores y las MDX sí.

Sistemas modelo con Lactosa

El sistema modelo LAC-PSL es poco reactivo ya que solo se obtuvieron incrementos significativos ($p < 0,05$) cuando se calentó a 100°C durante 10 min, mostrando un incremento máximo con respecto al punto inicial de 137 mg/100g de proteína. La correlación entre tiempo y temperatura obtenida a 80°C fue muy baja ($r^2 = 0,013$) y mayor de 0,7 a 90 y 100°C (tabla IV.2.2.4-1). Al igual que en el sistema modelo MDX-PSLBL el alto contenido inicial de furosina en el sistema modelo LAC-PSL limita la utilidad de este indicador. El sistema modelo LAC-CC 2 mostró incrementos significativos ($p < 0,05$) en todos los tiempos y temperaturas, siendo más notables a medida que el tratamiento térmico fue más intenso, con un incremento final de 316 mg/100g de proteína (10 veces más que el contenido inicial), con correlaciones lineales entre tiempo y temperatura superiores a 0,94 (tabla IV.2.2.4-1). En el sistema modelo LAC-Hidrocaseína el comportamiento a través de los de los diferentes tratamientos térmicos fue muy similar al del sistema modelo LAC-CC 2, aunque con un incremento menor (189mg/100g de proteína), sin embargo el valor de furosina con respecto al punto inicial fue 22 veces superior. Las correlaciones entre tiempo y

temperatura fueron superiores a 0,82 para todas las temperaturas ensayadas (tabla IV.2.2.4-1). El incremento obtenido entre el punto inicial y final en el sistema modelo LAC-PSLBLPH fue de 252 mg/100g de proteína lo que representa 16 veces el contenido inicial, donde las correlaciones entre tiempo y temperatura fueron superiores a 0,90 (tabla IV.2.2.4-1). Comparando con el mismo sistema elaborado con MDX donde se emplearon concentraciones similares de azúcar, se observa mayor reactividad cuando se empleo lactosa (casi 2 veces más).

Los sistemas modelo elaborados con proteínas hidrolizadas presentaron mayor reactividad que los elaborados con proteínas intactas. Los mayores incrementos de furosina con respecto al punto de partida, tras el tratamiento térmico a 100°C durante 10 minutos, fueron los obtenidos en los sistemas modelo LAC-CC 2, LAC-PSLBLPH, y LAC-Hidrocaseína. Los sistemas modelo con PSLBL mostraron descensos con respecto a los valores iniciales de furosina, lo cual puede ser debido a que parten con valores muy altos y por tanto la reacción de Maillard podría estar en etapas avanzadas donde este indicador carecería de utilidad. En el sistema modelo LAC-PSL donde también se observaron valores iniciales de furosina altos se necesitaron tratamientos más drásticos para observar reactividad.

Si comparamos los datos obtenidos en los sistemas modelo con los obtenidos en el procesado de las fórmulas infantiles elaboradas en planta piloto, donde se utilizan los mismos ingredientes y similares concentraciones, observamos que en la formula A el valor de furosina no indica la extensión de la reacción de Maillard ya que la proteína PSLBL está en etapas más avanzadas. Para la formula B las dos proteínas, caseinato cálcico y PSL contribuyen a la formación de compuestos de Amadori, además en la mezcla de ingredientes ya se produce daño térmico. Los valores de furosina obtenidos en las dos primera etapas del procesado (calentamiento de líquidos) son también obtenidos en los sistemas modelos por lo que estos podrían utilizarse para monitorizar en un tiempo más corto el comportamiento de los ingredientes utilizados en la elaboración de la fórmulas.

En las fórmulas C y D también se produjo un pequeño daño térmico en el mezclado de los ingredientes y al igual que en la formula anterior estos sistemas modelo pueden utilizarse para monitorizar el comportamiento de los ingredientes durante las dos primeras etapas de la elaboración de las mismas.

En la bibliografía existen referencias que recogen estudios en sistemas modelo con ingredientes similares y que también utilizan furosina como indicador, aunque las proporciones de los ingredientes y los tratamientos térmicos aplicados son diferentes y por tanto la comparación con los sistemas modelo elaborados en este trabajo solo se pueden hacer en términos de tendencia y no de valores absolutos. Así, Pizzano y col. (1998) calientan muestras de caseína de leche cruda entre 60 y 100°C durante 1, 10, y 30 minutos, obteniendo valores entre 5-100 mg/100 g de proteína; Morales y Jiménez, (2000) estudian sistemas modelo de caseinato de sodio (3%)-lactosa (5%) calentados entre 110-150°C a tiempos superiores a 30 min, encontrando valores de furosina de 10 mg/L (35,5 mg/100g de proteína) en el punto inicial, 15 mg/L (53,2 mg/100g de proteína) tras 110°C/10 min, y el máximo valor (390 mg/100g de proteína) tras 150°C/10 min; Rufian-Henares y col. (2004a) también encuentran incrementos tras el calentamiento de sistemas modelo caseína-lactosa calentados durante 10 minutos a 100°C (60,3-114 mg/100 g de proteína). Los incrementos obtenidos en el presente

trabajo para el sistema LAC-CC 2 fueron superiores a los de estos autores, sin embargo también lo fue la concentración de ingredientes utilizados.

La tendencia obtenida por Rufián-Henares y col. (2004a) para los sistemas modelo elaborados con maltodextrinas-caseína, maltodextrinas-proteínas del lactosuero y lactosa-proteínas del lactosuero fue similar a la obtenida en los sistemas modelo de este trabajo, incluso se observan descensos en los valores de furosina tras 10 minutos de calentamiento a 100°C cuando parten de proteínas con valores muy altos de este indicador.

También existen estudios en sistemas modelo sólidos, así Fenaille y col. (2003) estudian la glicación de B-lactoglobulina en estado seco, con lactosa, galactosa y glucosa tras conservación a 23°C/7 días a A_w 0,44 y posterior calentamiento a 60°C a diferentes tiempos. Tras 2h 15 min de calentamiento los resultados obtenidos en términos de furosina fueron 2,6 y 3,9 veces más altos para la glucosa y galactosa respectivamente que para la lactosa; Casal y col. (2005) estudian la glicación de caseinamacropeptido (CMP) durante la conservación con lactosa a 40 y 50°C y A_w entre 0,33–0,65. A pH 8,0 y A_w 0,44 obtienen niveles máximos de furosina, superiores a 1,9 mg/100 mg de CMP tras 5 días a 50°C, mientras que estos valores no los obtienen a 40°C tras 13 días de conservación. Incrementando el pH por encima de 11 obtienen aumentos considerables de furosina, obteniendo el máximo valor tras de 9 horas a 50°C. La tasa de formación de furosina fue también mayor cuando la A_w fue superior a 0,65; la máxima cantidad de furosina (1,6 mg/100 mg CMP) se logró tras 2h de incubación a A_w 0,65. Por último Ge pan y Melton (2007) calientan una mezcla de caseinato sódico y lactosa a 60°C durante 96 horas a diferentes A_w , encontrando los mayores niveles de formación de furosina a $A_w=67\%$ tras 12 y 24 horas, y $A_w=50\%$ tras 96 horas.

También en los sistemas sólidos se obtuvieron incrementos en los valores de furosina cuando se calientan proteínas lácteas y azúcares, y los valores obtenidos dependen de la temperatura, A_w , tipo y concentración de azúcares y proteínas utilizadas.

IV.3. Determinación de lisina útil

La determinación de lisina es realizada mediante la separación por HPLC del derivado dinitrofenil-lisina (DNP-lisina), formado al reaccionar el grupo ϵ -amino libre de la lisina con 1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno (FDNB) y obtenido tras hidrólisis ácida. Este derivado presenta una fuerte absorbancia UV/Vis, lo que permite su cuantificación.

El método utilizado se basa en el método de Carpenter y Booth (1973), que modificaron el de Carpenter (1960) con objeto de utilizarlo en muestras con azúcares reductores. Otros métodos eliminan estos azúcares. Así, Tomarelli y col. (1985) determinan lisina útil en leche y fórmulas para lactantes previa eliminación de la lactosa mediante diálisis. Cuando se quiere relacionar pérdida de lisina y daño térmico en un mismo producto sometido a diferentes tratamientos, puede evitarse la eliminación de los azúcares al estar sometidas las muestras al mismo error. Así, Albalá-Hurtado y col. (1997b), Ferrer y col. (2003), Guerra-Hernández y col. (2002b) determinan la pérdida

de lisina tras el almacenamiento de fórmulas para lactantes; Fernández-Artigas y col. (1999b) durante el procesado de cereales infantiles y Rufián-Henares y col. (2006c) en sistemas modelo que simulan fórmulas infantiles y enterales.

IV.3.1. Estudios preliminares

El método utilizado para la determinación de lisina útil por HPLC, fue el propuesto por Ramirez-Jimenez y col. (2004c) en cereales infantiles.

La precisión del método fue realizada en una formula infantil comercial de continuación. La desviación estándar fue 4,6% con una media de lisina útil de 3,69 g/100g de proteína. El límite de detección (tres veces la señal del ruido) para la formula de continuación fue $7,25 \times 10^{-4}$ g/100 g de proteína. El límite de cuantificación (diez veces la señal del ruido) fue $2,42 \times 10^{-3}$ g/100 g de proteína.

IV.3.2. Determinación de lisina útil en muestras

Los resultados se expresan en mg/g de muestra con objeto de conocer el contenido real de lisina en el producto y en g/100g de proteína para conocer la riqueza de las distintas proteínas.

IV.3.2.1. Ingredientes proteicos

La tabla III.3.2.1-1 muestra el contenido de lisina útil de los ingredientes analizados. Los valores están comprendidos entre 1,85 g/100 g de proteína de la hidroc caseína y 7,87 g/100 g de proteína del caseinato sódico. Existe una gran variabilidad para el mismo tipo de proteínas, así para las proteínas de soja el contenido de lisina útil oscila entre 3,73 y 5,15 g/100g de proteínas, entre 4,33 y 7,45 g/100 g de proteína para las proteínas del lactosuero, entre 5,61 y 7,91 g/100g de proteína para las caseínas y en las proteínas hidrolizadas 1,85 g/100 g de proteína para la hidroc caseína y 4,87 g/100g de proteína en la proteína de suero lácteo parcialmente hidrolizada.

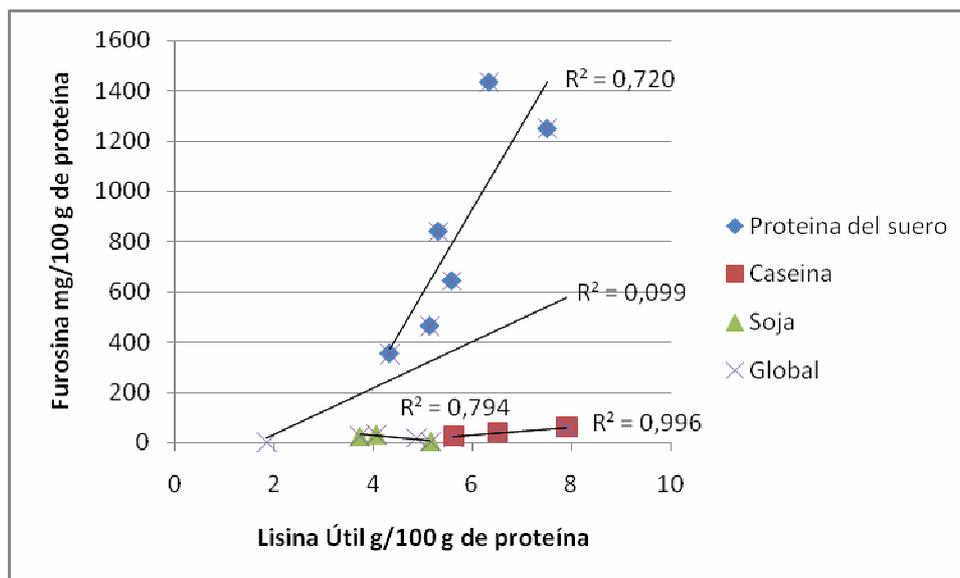
La figura 26 muestra la correlación obtenida entre lisina útil y furosina para cada tipo de ingredientes así como la correlación global. De forma global no se encontraron correlaciones entre lisina útil y furosina ($r^2= 0,099$). Sin embargo por tipo de ingredientes un alto contenido en lisina se asoció con un mayor contenido de furosina, principalmente en muestras de caseína ($r^2=0,996$). Una menor correlación fue obtenida en las proteínas de suero lácteo y de soja, lo que puede explicarse por la diferente concentración de azúcares de las mismas.

Lactosueros con el mismo contenido en lisina (E-300 y PSL) mostraron diferentes valores en furosina, los cuales fueron más altos cuando el contenido de azúcares (lactosa) fue mayor. Los lactosueros 1 y PSLBL con contenidos similares de proteína pero diferente en azúcares mostraron los contenidos más altos de furosina, siendo mayores cuanto mayor fue el contenido de azúcares (lactosa), sin embargo también presentaron los contenidos de lisina más altos. Lactosueros 2 y 3 con contenido

similar de azúcares y proteínas mostraron valores muy diferentes de furosina, siendo mayor en este último, lo que podría indicar un tratamiento térmico diferente y más drástico, o ser debido al mayor contenido de lisina del lactosuero 3.

En general a mayor contenido de lisina mayor cantidad de furosina, sin ser esto indicativo de menor valor nutricional, ya que aunque parte de la lisina este bloqueada la cantidad de lisina útil que permanece es muy elevada.

Figura 26: Correlación entre lisina útil y furosina.



El contenido de furosina de las muestras es utilizado habitualmente para estimar el porcentaje de lisina bloqueada, siguiendo la fórmula de Finot y col. (1981) adaptada por Evangelisti y col. (1999) para muestras similares a las del presente estudio (% bloqueado = $(3,1 \times \text{furosina} \times 100) \times 0,8 / (\text{lisina por cromatografía} + 1,86 \times \text{furosina})$). Aplicando la fórmula en las muestras de este trabajo se obtienen porcentajes de lisina bloqueada de 1,0, 1,9, 17 y 39 para el CC 2, CC 1, lactosuero 1 y PSLBL respectivamente. Esta fórmula es útil cuando la reacción de Maillard no está avanzada, caso de los caseínatos, pero puede no serlo en proteínas del lactosuero ya que los altos valores de furosina pueden indicar no solo generación sino degradación; en este caso la cantidad de lisina bloqueada será superior.

El porcentaje de lisina bloqueada en el Lactosuero 1 y PSLBL fue aproximadamente 17% y 39%, respectivamente. Esto no es útil en muestras con altos niveles de furosina cuando la reacción de Maillard está avanzada (presencia de pirralina), ya que habría más lisina bloqueada que la estimada por la fórmula. Los porcentajes de lisina bloqueada en las muestras CC 1 y CC 2 fueron aproximadamente 1,9% y 1,0%, respectivamente, por lo que furosina puede ser usada como un indicador de lisina bloqueada en este tipo de muestras.

Morgan y col. (2005) estudian las etapas iniciales de reacción de Maillard en un sistema modelo lactosa-proteína del suero encontrando un porcentaje inicial de lisina

bloqueada de aproximadamente 4%. Rufián-Henares y col. (2006c) encuentran similares contenidos de lisina útil a los del presente trabajo en sistemas modelo preparados con caseína, proteína del suero obtenida en laboratorio y proteína de suero comercial.

IV.3.2.2. Fórmulas infantiles

a) Procesado

Los contenidos de lisina útil durante la elaboración de las fórmulas infantiles de la planta industrial y piloto se observan en la tabla III.3.2.2-1.

Fórmula A

En la planta industrial se observaron pérdidas estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el punto inicial y final, con valores de 6,32 y 4,88 g/100g de proteína respectivamente. En la planta piloto las pérdidas también fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con un contenido inicial y final de 6,8 a 5,8 g/100 g de proteína respectivamente. La pérdida de valor nutricional durante el procesado fue del 15% y del 23% para las fórmulas elaboradas en planta piloto e industrial respectivamente.

Fórmula B

El comportamiento de la lisina útil en estas fórmulas fue similar al obtenido en la fórmula A, aunque las pérdidas fueron ligeramente inferiores (21% y 10% para la planta industrial y piloto respectivamente).

Fórmulas C y D

Las pérdidas obtenidas entre los puntos inicial (mezcla de ingredientes) y final (atomización) en la fórmula C (con maltodextrina) fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) y similares para las plantas industrial y piloto (próximas al 16%). Las pérdidas obtenidas en la fórmula D (con lactosa), también fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) y próximas al 15%.

Las pérdidas de lisina en fórmulas preparadas con proteínas intactas (A y B) fueron más altas en la planta industrial que en la planta piloto, mientras que en las fórmulas con proteínas parcialmente hidrolizadas (C y D) no se observaron diferencias entre plantas.

Las pérdidas de lisina fueron inversamente proporcionales a los incrementos en furosina con correlaciones altas, siendo significativas ($p < 0,05$) solo en las fórmulas B y D elaboradas en planta piloto (tabla IV.3.2.2-1). Sin embargo, debido a que la furosina es más sensible a los cambios, comparada con la lisina útil, furosina sería el indicador que permitiría a la industria controlar cambios sutiles producidos por los diferentes tratamientos térmicos.

Tabla IV.3.2.2-1: Correlación entre lisina útil y furosina durante las diferentes etapas del procesado.

Formula-Planta	A-PI	A-PP	B-PI	B-PP	C-PI	C-PP	D-PP
r^2	0,9518	0,9483	0,9577	0,9949*	0,7619	0,7383	0,9992*

* Nivel de significancia ($P < 0,05$)

n=3

En la bibliografía se han encontrado pérdidas similares de lisina útil en fórmulas infantiles, así Rossi y Pompei (1991) encuentran pérdidas de lisina útil entre 18,4 y 26,3% en fórmulas infantiles líquidas tras diferentes tratamientos térmicos (pasteurización, UHT, y esterilización). Anantharaman y Finot (1993) indican pérdidas entre 5 y 10% durante el secado por atomización, siendo del 14% las halladas por El y Kavas (1997). Ferrer y col. (2000) hallan pérdidas significativas ($p < 0,05$) alrededor del 20% en fórmulas de inicio y continuación (de 8,36 g/100g de proteína en la leche cruda a 6,67 y 6,61 g/100g de proteína en la fórmula elaborada). Sin embargo Puig y col. (2003) no observaron diferencias significativas en los niveles de lisina útil entre los diferentes tratamientos térmicos (secado por atomización, esterilización convencional en botella y UHT) en fórmulas infantiles preparadas con leche de vaca.

b) Conservación

Los contenidos de lisina útil de las fórmulas elaboradas en planta industrial y piloto conservadas durante 24 meses se observan en las tablas III.3.2.2-2 a III.3.2.2-5.

Fórmula A

Las fórmulas elaboradas en planta industrial mostraron descensos significativos de lisina desde el tercer mes, solo a 30°C. Desde el sexto mes, los descensos también fueron significativos ($p < 0,05$) a 20°C, necesitándose 15 meses para observarlos a 4°C. Tras 15 meses de conservación las pérdidas fueron de 14% a 4 y 20°C y 19% a 30°C. Las pérdidas de lisina tras 24 meses a 30°C fueron de 49%.

Cuando comparamos el mismo mes las pérdidas también fueron significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes temperaturas, excepto a 15 meses entre 4 y 20°C.

Durante la conservación de las fórmulas elaboradas en planta piloto se observaron pérdidas significativas de lisina ($p < 0,05$) desde los 3 meses a 20 y 30°C. Entre 3 y 6 meses de conservación las pérdidas fueron muy pequeñas (tabla III.3.1.2-2). Sin embargo tras 15 meses de conservación se observaron pérdidas significativas ($p < 0,05$) las cuales estuvieron entre 17% y 29% para las tres temperaturas estudiadas, siendo superiores a las obtenidas en la planta industrial. Las pérdidas de lisina útil tras 24 meses de conservación a 30°C fueron de 52%.

Las correlaciones inversas obtenidas entre tiempo de conservación y lisina útil en las diferentes temperaturas estudiadas fueron superiores a 0,93 (r^2) y estadísticamente significativas ($p < 0,05$) a 30°C tanto en planta industrial como piloto (tabla IV.3.2.2-2).

Tabla IV.3.2.2-2: Correlación inversa entre tiempo de conservación y lisina útil.

T ^a (°C)	Tiempo (meses)	Fórmulas						
		A		B		C		D
		PI	PP	PI	PP	PI	PP	PP
4 ¹	15	0,973	0,764	0,891	0,924	0,899	0,606	0,730
20 ²	15	0,734	0,614	0,732	0,929*	0,927*	0,670	0,867
30 ³	24	0,934*	0,949*	0,859*	0,939*	0,998*	0,895*	0,756

* Nivel de significancia (P<0,05)

¹: n=3; ²: n=4; ³: n=5

Fórmula B

Para las fórmulas elaboradas en planta industrial las pérdidas de lisina fueron significativos (p<0,05) desde los 3 meses de conservación (tabla III.3.2.2-3). Entre temperaturas los perdidas fueron significativos para todos los tiempos excepto a 6 meses en las 3 temperaturas estudiadas y tras 15 meses entre 4 y 20°C. Tras 15 meses las pérdidas fueron próximas al 25% a 4 y 20°C, y 31% a 30°C. Las pérdidas de lisina útil tras 24 meses de conservación a 30°C fueron de 42%.

En las fórmulas elaboradas en planta piloto las pérdidas fueron significativas (p<0,05) desde los 6 meses de conservación (tabla III.3.2.2-3). Entre temperaturas se obtuvieron pérdidas significativas (p<0,05) a los 15 meses de conservación. Tras 15 meses las perdidas estuvieron entre 22%, 27% y 32% a 4, 20 y 30°C respectivamente; similar a lo obtenido en la planta industrial (tabla III.3.2.2-3). Las pérdidas de lisina útil tras 24 meses a 30°C fueron de 46% (tabla III.3.2.2-3).

Para la planta piloto la correlación inversa obtenida entre tiempo de conservación y lisina útil fue superior a 0,92 (r²) para las tres temperaturas estudiadas (tabla IV.3.2.2-2). Las correlaciones fueron estadísticamente significativas (p<0,05) a 30°C en la planta industrial y piloto, y a 20°C solo en la planta piloto.

En las fórmulas A y B elaboradas con proteínas intactas las pérdidas son similares tras 2 años de conservación a 30°C. Estas fórmulas son elaboradas con diferentes tipos de carbohidratos (maltodextrinas y lactosa), y con diferentes tipos de proteínas del suero. Este comportamiento se corresponde con el observado durante el proceso de elaboración en planta industrial y piloto, donde las perdidas en ambas fórmulas fue similar.

Aunque siempre se producen perdidas de lisina durante la conservación en las temperaturas estudiadas, estas pérdidas son pequeñas a 4°C, por lo que sería conveniente mantener las fórmulas a temperatura de refrigeración. Cuando la conservación se realiza por largos periodos (15 meses) las perdidas obtenidas son bastante similares a 4 y 20°C. En ningún caso se debe exceder esta temperatura ya que las pérdidas se hacen notables a 30°C.

Los requerimientos nutricionales de lisina para los niños de 0 a 6 meses de edad son de 107 mg/kg/día (DRIs. 2002). Un niño de 1 a 2 semanas con un peso aproximado de 3,30 kg requiere 353,1 mg de lisina por día, siendo el consumo diario de fórmula para el mismo periodo de 77,4 gramos. Para un niño de 3 meses con un peso medio de 5 kg las necesidades de lisina son de aproximadamente 535 mg/día. La fórmula infantil A donde el consumo de fórmula asciende a 150 g/día y el contenido inicial de lisina útil es de 5000 y 5870 mg/100g de proteína para la planta industrial y piloto respectivamente cubren las necesidades del niño ya que al menos es necesario proporcionarles 3200 mg/100 g proteína aproximadamente. Como podemos observar, las necesidades del niño son cubiertas en todos los tiempos y temperaturas ensayadas, excepto en las fórmulas conservadas durante 24 meses a 30°C (tabla III.3.2.2-2). En niños de 7 a 12 meses los requerimientos nutricionales de lisina son de 89 mg/kg/día (DRIs. 2002). Tomando como referencia un niño de 12 meses con un peso aproximado de 9 kg, el requerimiento de lisina sería de 801 mg/día. En el caso de la fórmula B (de continuación) donde los contenidos iniciales de lisina útil son de 6440 y 5950 mg/g de proteína para la planta industrial y piloto respectivamente, y donde el consumo de fórmula asciende a 125 mg/día, los requerimientos del niño son cubiertos satisfactoriamente, ya que como mínimo es necesario proporcionarles 5300 mg/100 g de proteína aproximadamente. Las necesidades del niño son cubiertas únicamente durante los tres primeros meses de conservación en todas las temperaturas estudiadas para ambas plantas (tabla III.3.2.2-3).

Fórmulas C y D

Las pérdidas en lisina útil de la fórmula C planta industrial solo fueron significativas ($p < 0,05$) desde los 15 meses de conservación a 4 y 20°C y desde el sexto mes a 30°C (tabla III.3.2.2-4). Tras 15 meses las pérdidas en lisina útil para las 3 temperaturas estudiadas fueron próximas al 25%. Entre temperaturas para los mismos tiempos de conservación solo se observaron descensos significativos ($p < 0,05$) a 30°C, excepto tras 15 meses entre 20 y 30°C.

La fórmula C elaborada en planta piloto mostró pérdidas de lisina útil estadísticamente significativas ($p < 0,05$) desde el tercer mes (pérdidas próximas al 15%) y continuo hasta los 6 meses de conservación (próximas al 25%). Tras 15 meses de conservación solo se observaron descensos significativos a 30°C, los cuales fueron más notables a los 24 meses.

Las pérdidas de lisina útil obtenidas en las fórmulas elaboradas en planta industrial durante los primeros meses de conservación son más bajas que las obtenidas en planta piloto, aunque tras 15 meses son similares, alcanzando pérdidas de 40% tras 24 meses a 30°C. Las correlaciones inversas obtenidas entre pérdidas de lisina útil y tiempo de conservación fueron altas y significativa ($p < 0,05$) para la planta industrial a 20 y 30°C y para la planta piloto solo a 30°C (tabla IV.3.2.2-2).

En la fórmula infantil D solo se observaron descensos significativos ($p < 0,05$) tras 24 meses de conservación a 30°C, alcanzando unas pérdidas de lisina útil próximas al 37% (tabla III.3.2.2-5). Las correlaciones obtenidas entre pérdidas de lisina y tiempo de conservación fueron buenas ($r^2 > 0,73$) aunque en ningún caso fueron significativas (tabla IV.3.2.2-2).

Las pérdidas de lisina útil obtenidas en la formula D planta piloto elaborada con lactosa fueron más bajas que las obtenidas en la formula C planta piloto elaborada con maltodextrinas. Este comportamiento es diferente al observado durante el procesado, donde la mayores pérdidas se obtuvieron en la formula D.

Las fórmulas infantiles elaboradas con proteínas hidrolizadas (C y D) tuvieron pérdidas de lisina ligeramente menores tras 2 años de conservación a 30 °C, que las obtenidas en las fórmulas A y B elaboradas con proteínas intactas.

Las pérdidas de lisina obtenidas a largo plazo fueron bastante similares para las fórmulas infantiles almacenadas a 4 y 20°C, por lo que solo se tendría una pequeña mejora con la refrigeración.

Se obtuvo una alta correlación inversa entre lisina útil y furosina durante la conservación a 30°C para todas las fórmulas en ambas plantas (tabla IV.3.2.2-3), excepto en la formula A planta industrial donde se observaron descensos de furosina tras largos periodos de conservación; sin embargo si se omiten los valores tras 24 meses de conservación la correlación es de 0,999.

Table IV.3.2.2-3: Correlación entre lisina útil y furosina durante la conservación a 4, 20 y 30°C.

T ^a (°C)	Fórmulas						
	A		B		C		D
	PI	PP	PI	PP	PI	PP	PP
4 ¹	1,000*	0,306	0,995*	0,944	0,478	0,656	0,275
20 ²	0,622	0,979*	0,946*	0,878	0,649	0,920*	0,962*
30 ³	0,476	0,990*	0,931*	0,793*	0,902*	0,913*	0,727

* Nivel de significancia (P<0,05)

¹: n=3; ²: n=4; ³: n=5

En la bibliografía se encuentran perdidas muy variables dependiendo del tipo de formula, temperatura y tiempo de conservación, así Guerra-Hernandez y col. (2002b) encuentran perdidas de lisina útil de hasta 8,9% en fórmulas infantiles conservadas durante 90 días a 20°C y de hasta 88,3% cuando las fórmulas infantiles fueron conservadas a 55°C durante 90 días en atmosfera de nitrógeno. En las fórmulas infantiles conservadas a 20°C las pérdidas son similares a las obtenidas en este estudio para la misma temperatura y tiempo de conservación. Ferrer y col. (2003) encuentran pérdidas de entre 20 y 49% para fórmulas adaptadas y de continuación cuando se conservan a 20 y 37°C durante 24 meses, valores también próximos a los hallados en el presente trabajo.

c) Conservación Aw 0,65

Los contenidos de lisina útil durante la conservación de las fórmulas a Aw 0,65 a 20 y 30°C se observa en las tablas III.3.2.2-6 a III.3.2.2-9.

Fórmula A

Las pérdidas de lisina útil obtenidas (tabla III.3.2.2-6) en ambas plantas (industrial y piloto) entre el punto inicial, primera y cuarta semana de conservación fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las 2 temperaturas ensayadas (20 y 30 °C).

Las pérdidas de lisina útil obtenidas en las fórmulas de la planta industrial fueron ligeramente superiores a las obtenidas en las fórmulas de la planta piloto, siendo de 62 y 57% tras 4 semanas de conservación a 30°C respectivamente.

A 30°C y A_w 0,65 se necesita más de 1 semana y menos de 4 para alcanzar las mismas pérdidas obtenidas tras 24 meses de conservación a actividad de agua propia del producto. La correlación inversa obtenida entre lisina útil y tiempo de conservación estuvo entre 0,664-0,910 (r^2). No se obtuvieron cambios estadísticamente significativos ($p < 0,05$), probablemente debido al bajo número de puntos analizados (punto 0, 1 y 4 semanas) (tabla IV.3.2.2-4).

Tabla IV.3.2.2-4: Correlaciones (r^2) entre tiempo de conservación a A_w 0,65 y lisina útil.

T(°C)	Tiempo (semanas)	Fórmulas						
		A		B		C		D
		IP	PP	IP	PP	IP	PP	PP
20 ¹	4	0,664	0,910	0,624	0,815	0,853	0,958	0,874
30 ¹	4	0,698	0,857	0,694	0,509	0,656	0,594	0,481

¹: n=3

No hay ninguna significación

Fórmula B

Las pérdidas de lisina útil obtenidas (tabla III.3.2.2-7) en ambas plantas (industrial y piloto) entre el punto inicial, primera y cuarta semana de conservación fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las 2 temperaturas ensayadas (20 y 30°C). Las pérdidas de lisina útil obtenidas tras la primera semana de conservación a 20 y 30°C fueron similares en las dos plantas (PI y PP). Tras cuatro semanas las pérdidas a 20°C fueron mayores en la planta piloto y a 30°C fueron superiores en la planta industrial.

Tras 4 semanas de conservación a 20°C se obtienen al menos las mismas pérdidas de lisina alcanzadas a 30°C en la primera semana para ambas plantas (industrial y piloto). Esto mismo se observó en la fórmula A.

A 30°C y A_w 0,65 se necesitan 4 semanas para alcanzar las mismas pérdidas de lisina útil obtenidas tras 24 meses de conservación a A_w propia del producto. La correlación inversa obtenida entre lisina útil y tiempo de conservación estuvo

comprendida entre 0,509-0,815 y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (tabla IV.3.2.2-4).

Fórmula C y D

A 20 y 30°C se obtuvieron pérdidas significativas ($p < 0,05$) en ambas fórmulas infantiles (PI y PP) entre el punto inicial, primera y cuarta semana, excepto a 30°C para la fórmula D entre la primera y cuarta semana (tablas III.3.2.2-8 y III.3.2.2-9).

Las pérdidas de lisina útil en la fórmula C planta industrial fueron ligeramente más altas que las obtenidas en la planta piloto. Tras 4 semanas a 30°C las pérdidas estuvieron entre 34 y 42% para la planta piloto e industrial respectivamente, siendo más bajas que las obtenidas en las fórmulas elaboradas con proteínas intactas.

Tras 4 semanas de conservación a 20°C se obtuvieron casi las mismas pérdidas de lisina útil que las alcanzadas en la primera semana a 30°C en ambas plantas (industrial y piloto) para las dos fórmulas hidrolizadas (C y D), aunque desde esta semana los cambios no fueron muy altos en las fórmulas C y D de la planta piloto. A 30°C y A_w 0,65 se necesitaron entre 1 y 4 semanas para alcanzar las mismas pérdidas de lisina útil que las obtenidas tras 24 meses de conservación a A_w propia del producto para todas las fórmulas hidrolizadas.

Si comparamos las fórmulas C y D, elaboradas en planta piloto con la misma proteína pero con diferentes carbohidratos (maltodextrinas y lactosa respectivamente) observamos que tienen un contenido inicial de lisina similar; de igual manera las pérdidas son similares aunque ligeramente más altas para la fórmula D.

Tras 4 semanas a A_w 0,65 y 30°C, las fórmulas infantiles que perdieron un mayor porcentaje de lisina útil fueron la fórmula A en ambas plantas, seguida por las fórmulas B y C planta industrial, y B y C planta piloto. A A_w propia del producto las fórmulas que perdieron más lisina fueron las elaboradas con proteínas intactas y las que menos las elaboradas con proteínas parcialmente hidrolizadas. Probablemente en las fórmulas hidrolizadas al existir más aminoácidos libres la lisina sea menos reactiva.

Malec y col. (2002) también encuentran pérdidas altas y próximas al 60% en sistemas modelo lactosa-caseína conservadas a 37°C durante 800 horas aproximadamente (4,76 semanas), a A_w 0,69; estas pérdidas son muy altas y similares a las obtenidas en nuestra fórmula A tras 4 semanas de conservación a 30°C y A_w 0,65. Ge pan y Melton (2007) encuentran las mayores pérdidas de lisina (próximas al 4 %) tras calentar una mezcla seca de caseinato sódico-lactosa durante 96 h a 60°C y HR entre 67 y 75 %.

Los resultados obtenidos durante la conservación bajo condiciones aceleradas confirman los obtenidos durante la conservación normal, mayor pérdida de lisina en fórmulas elaboradas con proteínas intactas. Además las pérdidas obtenidas entre la 1 y 4 semanas de conservación son similares a las obtenidas tras 24 meses a 30°C, lo que puede ser de gran utilidad a la industria como control nutricional y tiempo de caducidad.

IV.3.2.3. Fórmulas infantiles comerciales

Los valores de lisina útil estuvieron entre 2,28 y 4,44 g/100 g de proteína (tabla III.3.2.3-1) para la formula infantil 13 elaborada con proteínas séricas hidrolizadas y la formula infantil 8 elaborada con leche desnatada. La mayoría de las fórmulas (64%) presentan valores superiores a 4,00 g/100 g de proteína, siendo principalmente las fórmulas con proteínas parcialmente hidrolizadas y con proteína aislada de soja las que mostraron valores inferiores. Todas las fórmulas comerciales presentaron valores de lisina útil inferiores a las fórmulas A, B, C y D.

Los requerimientos nutricionales de lisina para los niños de 0 a 6 meses de edad son de 107 mg/kg/día (DRIs. 2002). Para un niño de 3 meses el consumo de formula asciende a 150 g/día y en este caso las necesidades de lisina serian aproximadamente 535 mg/día. Todas las fórmulas de inicio analizadas excepto la formula 13 (344 mg de lisina/día) con proteínas parcialmente hidrolizadas cubren con creces las necesidades del niño ya que proporcionan entre 604 y 751 mg de lisina/día para la fórmulas 10 y 8 respectivamente, preparadas según indica la etiqueta, para un niño de 3 meses. Los requerimientos para los niños de 7 a 12 meses son de 89 mg/kg/día (DRIs. 2002). Tomando como referencia un niño de 12 meses con un peso medio de 9 kg, el requerimiento de lisina seria de 801 mg/día. En el caso de las fórmulas de continuación solo las IFs 2 y 3 cubren los requerimientos para un niño de 12 meses (975 y 922 mg de lisina/día respectivamente). En las demás fórmulas de continuación preparadas según indica la etiqueta los aportes de lisina/día están entre 501 y 658 mg para las fórmulas 6 y 9 respectivamente. Hay que indicar que para un niño de 12 meses las fórmulas infantiles no son el único alimento.

Los datos encontrados en la bibliografía son muy variables, así Ferrer y col. (2000) en fórmulas adaptadas y de continuación encuentran valores de 6,67 y 6,61 g/100 g de proteína respectivamente. Pereyra-Gonzales y col. (2003) en diferentes fórmulas infantiles comerciales en polvo, elaboradas con proteínas aisladas de soja, caseína, leche, leches enriquecidas con suero y leche de vaca, hallan valores entre 3,3-5,2; 4,13-7,0; 6,2-8,11; 5,4-7,8 y 8,04 g/100 g de proteína respectivamente. Por último Ferrer y col. (2003) analizan fórmulas de inicio y continuación elaboradas con proteínas lácteas, encontrando valores de lisina útil entre 8,43 y 7,9 g/100 g de proteína respectivamente, valores muy superiores a los obtenidos por nosotros.

IV.3.2.4. Sistemas modelo

El contenido de lisina útil fue determinado después del análisis de furosina, por lo que solo fueron analizados los sistemas modelo que presentaron mayores incrementos de este indicador: FOS-Hidroc caseína, MDX-CC 2, MDX- Hidroc caseína, LAC-PSL, LAC-CC 2, LAC- Hidroc caseína, MDX-PSLBLPH y LAC-PSLBLPH en el punto inicial y tras calentamiento a 100°C/10 min (tabla III.3.2.4-1).

Sistemas modelo FOS

El sistema modelo FOS-Hidroc caseína presentó un 3,2% de pérdida de lisina con respecto al punto 0 tras 10 minutos de calentamiento a 100°C, lo que no se corresponde con los incrementos tan pequeños de furosina (4 mg/100 g de proteína). Como se ha

comentado anteriormente (apartado IV.2.2.4.) la fructosa presente en los FOS no es precursor de furosina, la cual es generada por las pequeñas cantidades de lactosa presente en los ingredientes. La absorbancia a 284 nm (tabla IV.2.2.4-3) muestra la reactividad de la fructosa y por tanto este azúcar puede ser el responsable de las pérdidas de lisina observadas.

Sistemas modelo con maltodextrinas

En el sistema modelo MDX-CC 2 las pérdidas de lisina tras 10 minutos de calentamiento a 100°C fueron del 5% para un incremento en furosina de 39 mg/100 g de proteína. El sistema modelo MDX-Hidrocaseína mostró una pérdida de lisina similar al anterior sistema, próxima al 6%, con un incremento en furosina de 32 mg/100g de proteína. Comparando con el sistema modelo FOS-Hidrocaseína se observa que las pérdidas son aproximadamente el doble cuando se emplea maltodextrina, lo cual es lógico debido al mayor poder reductor de esta. La pérdida de lisina en el sistema modelo MDX-PSLBLPH fue del 8,4%. En este sistema y para el mismo tiempo y temperatura (100°C/10 min) el incremento obtenido de furosina con respecto al punto inicial fue de 126 mg/100g de proteína.

Sistemas modelo con lactosa

Las pérdidas de lisina en el sistema modelo LAC-PSL fueron pequeñas (1,75%). El comportamiento de la furosina fue similar ya que sólo a esta temperatura y tiempo (100°C/10 min) fue cuando se obtuvieron cambios significativos con respecto al punto inicial. En el sistema modelo LAC-CC 2 a diferencia de lo observado en el sistema anterior, la pérdida de lisina fue muy superior (18,6 %) al igual que los incrementos en furosina (10 veces) tras 100°C/10 min. Si se compara con el sistema modelo MDX -CC 2, se observa claramente la mayor pérdida de lisina cuando el carbohidrato utilizado es la lactosa ya que aunque la concentración de lactosa sea el doble que la de maltodextrina las pérdidas fueron casi 4 veces menores en este último sistema. En el sistema modelo LAC-Hidrocaseína las pérdidas fueron del 7 %, ligeramente superiores a las del sistema modelo MDX -Hidrocaseína y aproximadamente el doble de las obtenidas en el sistema modelo FOS-Hidrocaseína. Los resultados obtenidos en los sistemas LAC-CC 2 y LAC-Hidrocaseína se corresponden con los de furosina ya que es en estos sistemas modelo donde se obtuvieron los mayores incrementos. La mayor reactividad del CC 2 con respecto a la hidrocaseína se puede explicar por el mayor contenido en lisina útil en este ingrediente (tabla III.3.1.1-1). En el sistema modelo LAC-PSLBLPH se obtuvo una pérdida del 8,7%. Para el mismo tiempo y temperatura el incremento obtenido de furosina tras 100°C/10 min con respecto al punto inicial fue de 252 mg/100g de proteína. Las pérdidas de lisina son ligeramente superiores en este sistema que las obtenidas en el sistema MDX-PSLBLPH, lo que es lógico pues el sistema elaborado con lactosa también presentó mayor incremento en furosina.

Aunque se observa descenso de lisina útil en todos los sistemas estudiados, este indicador no presenta la misma sensibilidad que la furosina, por lo que este último sería el indicador de elección.

Los datos recogidos en la bibliografía muestran pérdidas en lisina útil muy variables dependiendo del ingrediente, concentración y temperaturas utilizadas, así Morales y Jiménez (2000) en sistemas modelo de caseinato sódico-lactosa calentados a

110-150°C por tiempos superiores a 30 min, encuentran pérdidas de aproximadamente 1% tras 10 min/110°C y 18% tras 10 min/150°C. Rufián y col. (2006c) en sistemas modelo que simulan fórmulas infantiles, elaborados con caseína, suero lácteo, lactosa o maltodextrinas, calentados a 100, 120 y 140°C durante 30 minutos, hallan mayores pérdidas, entre 0,5 y 8,6 % para un sistema elaborado con lactosuero obtenido en laboratorio-maltodextrina y un sistema con lactosuero comercial-lactosa respectivamente. Estos autores encuentran mayores pérdidas en los sistemas modelo que contenían lactosa.

IV.4. Determinación de pirralina

La determinación de pirralina, denominada también como ϵ -pirrol-lisina, lisilpirralina o lisilpirrolaldehído, ha sido propuesta para evaluar la extensión de la reacción en alimentos tratados a alta temperatura y/o en alimentos de larga conservación. Este compuesto puede determinarse de forma libre o unida a proteínas. El contenido de pirralina encontrado en los alimentos es muy bajo y por ello su utilización es aún escasa.

IV.4.1. Estudios preliminares

La pirralina fue determinada siguiendo el método propuesto por Morales y Van Boekel (1996) y cuantifica la pirralina unida a proteínas. Cuando este método se aplicó a fórmulas enterales, muestras con ingredientes proteicos similares a los empleados en las fórmulas infantiles, la desviación estándar fue de 3,33% y el límite de detección fue 0,9 mg/100g de proteína determinado como dos veces la señal del ruido (Rufián-Henares y col. 2004b).

IV.4.2. Determinación de pirralina en muestras

La pirralina analizada en muestras corresponde a la que se encuentra unida a proteínas.

IV.4.2.1. Ingredientes proteicos

La pirralina es un indicador de las últimas etapas de la reacción de Maillard, y solo fue detectada en el lactosuero 1 ($41,4 \pm 0,41$ mg/100g de proteína) (Contreras-Calderón y col., 2008). Este lactosuero presentó valores de furosina superiores a 1000 mg/100 g de proteína. Rufián-Henares y col. (2004b) estudian el contenido de pirralina en sistemas modelo de caseína y proteína del suero, detectando pirralina solo en el sistema con proteína del suero, el cual también presentó valores de furosina superiores a

1000 mg/100g de proteína. Hegele y col. (2008) encuentran valores de pirralina unida a proteína entre 0,59 y 0,80 mg/100 g de proteína en leche de vaca cruda.

IV.4.2.2. Fórmulas infantiles

a) Procesado

No se detectó pirralina en ninguna de las fórmulas; sin embargo previamente nuestro grupo de investigación encontró pirralina en proteínas del suero y fórmulas enterales preparadas con ingredientes similares a los usados en fórmulas infantiles (Rufián-Henares y col., 2004b).

La ausencia de pirralina indica que la reacción de Maillard no está en etapas avanzadas. Por lo tanto, furosina puede ser usada como medida única de daño térmico, sin necesidad de otros indicadores.

Hegele y col. (2008) estudian el avance de la reacción de Maillard durante el procesado de leche de vaca, encontrando valores de pirralina de 0,64, 0,58 y 0,77 mg/100 g de proteína en leche pasteurizada, desnatada y UHT respectivamente. Estos mismos autores también determinan pirralina unida a proteína en leche condensada y leche semidescremada encontrando valores de 13,4 y 0,75 mg/100 g de proteína respectivamente.

b) Conservación

Pirralina solo fue detectada (y confirmada por diodo array) en la formula A planta industrial conservada a 30°C tras 12 y 24 meses en cantidades muy bajas (6,46 y 6,50 mg/100 g de proteína respectivamente).

c) Conservación Aw 0,65

Pirralina solo fue detectada (y confirmada por diodo array) en la formula A planta industrial conservada a 30°C durante 4 semanas, con valores similares (6,73 mg/100 g de proteína) a los obtenidos en la conservación a Aw propia del producto tras 24 meses de conservación a 30°C. En esta fórmulas el valor de furosina descendió, luego la presencia de pirralina indica el avanzado estado de la reacción de Maillard, por lo que furosina carece de utilidad.

Son escasos los datos de pirralina en la conservación de alimentos, así Rufián-Henares y col. (2004b) conservan 2 fórmulas enterales líquidas preparadas con proteínas de suero y lactosa o maltodextrina a 30 y 56°C durante 36 semanas, encontrando valores iniciales de pirralina de 49,5 y 34,4mg/100 g de proteína respectivamente y obteniendo valores máximos de 78,4 mg/100 g de proteína tras 12 semanas a 55°C para la formula con lactosa y 49,6 mg/100 g de proteína tras 36 semanas a 30°C en la formula con maltodextrina.

IV.4.2.3. Sistemas modelo

Tras el análisis de furosina solo se estudió el contenido de pirralina en el sistema MDX-PSLBL calentado a 100°C durante 10 minutos. Pirralina fue detectada y confirmada por diodo array, obteniendo un valor próximo a 4 mg/100 g de proteína.

Morales y Van Boeckel, (1996) estudian pirralina en sistemas modelo líquidos de caseinato de sodio con glucosa y lactosa calentados a 110 y 150 °C durante 30 min, encontrando valores de 57,1 $\mu\text{mol/l}$ (14,52 mg/l) y 31,6 $\mu\text{mol/l}$ (8,04 mg/l) respectivamente. Rufián-Henares y col. (2004b) encuentran valores iniciales de pirralina de 41 mg/100 g de proteína en dos SM que simulan fórmulas enterales elaborados con proteínas del suero, lactosa o maltodextrinas, alcanzando valores de 60 y 62 mg/100 g de proteína respectivamente para los dos sistemas calentados a 120°C durante 10 min. Estos valores son muy superiores al obtenido por nosotros y puede ser debido a que parten de ingredientes muy dañados en donde ya hay presencia de pirralina.

En anteriores trabajos (Rufián-Henares y col. 2004b) nuestro grupo de investigación ha estudiado la generación de pirralina comparando sistemas modelo elaborados con diferentes ingredientes proteicos (caseinatos, lactosueros con bajo y alto daño térmico (más de 1000 mg de furosina/100 g de proteína)) obteniéndose sólo pirralina en el lactosuero de alto daño térmico. En este estudio se corrobora que sólo ingredientes de alto daño térmico, que son utilizados por la industria elaboradora de fórmulas infantiles, son capaces de generar pirralina en condiciones de procesado drásticas. Bajo estas condiciones la reacción de Maillard no puede ser seguida mediante un indicador tan sensible como la furosina, ya que en estos momentos su concentración decrece.

El valor nutricional medido como lisina útil fue igual en la formula A que en la B que no tenía pirralina.

La medida de pirralina es tediosa, bastante costosa y requiere de un detector de diodo array para confirmar su presencia por lo que se propone que sólo se realice si los valores de furosina son superiores a 1000 mg/100 g de proteína.

IV.5. Síntesis y determinación de N^ε-carboximetilisina (CML)

CML puede ser formada por oxidación de la fructosillisina (Ahed y col., 1986), o por reacción entre ascorbato y proteínas bajo condiciones de auto oxidación (Dunn y col., 1990). También puede ser formada del metilglioxal, un producto de la peroxidación lipídica (Fu y col., 1996), así como del glyoxal, un producto de la autooxidación de los azúcares (Wolff y Dean, 1987; Wells-Knecht y col., 1995).

CML también es formada *in vivo*; esto ha sido observado al acumularse con la edad en las proteínas del cristalino humano y en el colágeno de la piel (Dunn y col., 1991; Dunn y col., 1989; Dyer y col., 1993), y ha sido implicado en la fisiopatología de

varias enfermedades degenerativas (Vlassara y col., 1994; Vlassara, 1997; Vlassara y col., 2002; Sell y col., 2000; Makita y col., 1991).

Actualmente la CML se encuentra disponible en el comercio con una pureza del 99%, sin embargo al momento del inicio del presente trabajo no era comercializada por lo que fue necesaria su síntesis. La síntesis del compuesto se realizó siguiendo el método de Liardon (1987). La identidad del mismo fue confirmada por RMN de protones (figura 5), carbonos (figura 6) y por espectrometría de masas de alta resolución empleando la técnica de ionización FAB⁺ (figura 7). La pureza (5%) fue confirmada por comparación con un patrón (99%) cedido por el Instituto del Frio (CSIC) de Madrid.

La determinación de CML es realizada mediante la separación por HPLC y determinación fluorimétrica del derivado o-ftaldialdehído-CML (OPA-CML). La obtención de CML en muestras se realiza previa reducción con borohidruro sódico y posterior hidrólisis ácida de las proteínas.

El método utilizado se basa en el método de Drusch y col. (1999) con algunas modificaciones.

IV.5.1. Estudios preliminares

Se han realizado estudios previos para comprobar si el método utilizado es adecuado para observar los posibles cambios que se producen en el tratamiento térmico de ingredientes proteicos. Para ello se partió de una leche cruda en la que no se detectó CML y posteriormente se concentró hasta la mitad y 4 veces su volumen inicial. Se observaron incrementos bastante notables, mostrando concentraciones de 2,40 y 3,15 mg/g de muestra respectivamente (tabla III.5.1-1), valores que fueron superiores a los que se obtuvieron en las fórmulas infantiles del presente estudio.

Además se comprobó que la resolución era adecuada, no solapándose con los aminoácidos de las muestras, siendo el espectro fluorimétrico obtenido similar al de la CML patrón sintetizado en este trabajo.

La precisión del método fue ensayada en la formula B planta industrial conservada a 30°C durante 4 semanas a Aw 0,65 (tabla III.5.1-2). El coeficiente de variación fue de 0,63% en un ensayo con 7 muestras y para un valor medio de 728 mg/100 g de proteína. La precisión obtenida nos permitirá determinar la variación de CML que se produzca durante el procesado y conservación de fórmulas infantiles.

IV.5.2. Determinación de CML en muestras

Los resultados se expresan en mg/g de muestra con objeto de conocer el contenido real de CML en el producto y en mg/100g de proteína, lo que permite comparar el daño térmico de unos productos con otros.

IV.5.2.1 Ingredientes proteicos

La tabla III.5.2.1-1 muestra el contenido de CML de los 4 ingredientes analizados. Los valores están comprendidos entre 37,1 mg/100 g de proteína obtenido para el CC 2 y 163 mg/100 g de proteína para la PSL. En la proteína hidrolizada del lactosuero (PSLBLPH) no se detectó este compuesto. Los contenidos más altos de CML se encontraron en las proteínas del lactosuero, indicando claramente un mayor daño térmico, lo que coincide con los valores de furosina más elevados encontrados para estos mismos ingredientes y coincidiendo también con los valores de HMF encontrados sólo en proteínas intactas y no en proteínas parcialmente hidrolizadas. Hegele y col. (2008) encuentran concentraciones medias de CML en leche cruda de 0,16 mg/100 g de proteína.

IV.5.2.2 Fórmulas infantiles

a) Procesado

El contenido de CML durante el procesado de las fórmulas infantiles elaboradas en planta industrial se observa en la tabla III.5.2.2-1.

Fórmula A

En los puntos inicial y final los valores obtenidos fueron 50 y 336 mg/100g de proteína respectivamente, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). El incremento fue de 286 mg/100 g de proteína, 6,7 veces con respecto al punto inicial. Este incremento tan elevado indica que ha sufrido un daño térmico alto. Ingredientes de partida similares presentan CML, por lo que pensamos que el valor inicial se debe a los ingredientes y no al pequeño tratamiento térmico que se produce durante el mezclado de los ingredientes.

Fórmula B

Esta fórmula presenta un incremento de 215 mg/100 g de proteína, 2,8 veces desde el punto inicial hasta el producto final, con valores de 119 y 334 mg/100g de proteína respectivamente, cambios que fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Fórmula C

En esta fórmula sorprende la presencia de CML desde la etapa inicial del procesado ya que en un ingrediente proteico similar (el utilizado en planta piloto) no se encontró este compuesto. Los cambios obtenidos son significativos ($p < 0,05$), con valores de 87 y 142 mg/100g de proteína en el punto inicial y final del procesado, representando un incremento de 1,6 veces.

La reactividad, medida por el incremento en CML obtenido tras el procesado, es mayor en la fórmula A, seguido de la B y C. Estos resultados son similares a los obtenidos en la determinación de furosina, sin embargo no hubo correlación entre ellos, lo que concuerda con lo obtenido por Fenaille y col. (2006) en el estudio de indicadores de Maillard en fórmulas infantiles al ser indicadores de etapas diferentes de la RM.

Durante el procesado de leche Hegele y col. (2008) encuentran concentraciones de 0,18, 0,46, 0,88, 20,5 y 0,24 mg CML/100 g de proteína en leche pasteurizada, desnatada, UHT, condensada y semidesnatada respectivamente.

b) Conservación

El contenido de CML de las fórmulas elaboradas en planta industrial conservadas durante 15 meses a 30°C se observa en la tabla III.5.2.2-2.

Fórmula A

Los cambios observados son significativos ($p < 0,05$), con valores comprendidos entre 336 y 453 mg/100 g de proteína para el punto cero y 15 meses de conservación a 30°C respectivamente, lo que representa un incremento de 117 mg/100 g de proteína, 1,35 veces el valor inicial.

Fórmula B

En esta fórmula se observa un leve incremento de 33 mg/100 g de proteína (1,1 veces) con respecto al punto inicial de conservación donde se obtuvo un valor de 334 mg/100 g de proteína.

Fórmula C

El incremento obtenido fue de 152 mg/100 g de proteína, 2,1 veces el valor inicial que fue de 142 mg/100 g de proteína. Los cambios fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Comparando las tres fórmulas se observa claramente que la formula C elaborada con hidrolizado de proteína ha sido la más reactiva, seguida de la formula A y B respectivamente. El comportamiento es diferente al observado durante el procesado de las fórmulas.

El comportamiento de la furosina también fue diferente ya que la mayor reactividad se observó en la fórmula A, seguida de la B y C respectivamente. Pirralina solo fue detectado en la fórmula A cuando se conserva a 30°C durante más de 12 meses, también esta fórmula fue la que presentó mayor valor absoluto de CML.

c) Conservación A_w 0,65

El contenido de CML de las fórmulas elaboradas en planta industrial conservadas durante 4 semanas a 30°C se observa en la tabla III.5.2.2-3.

Fórmula A

Los cambios observados son significativos ($p < 0,05$), desde la primera semana, alcanzando un incremento en la cuarta semana de 2,4 veces con respecto al punto 0. El daño sufrido bajo estas condiciones es bastante considerable, ya que parte con un contenido inicial de 336 mg/100 g de proteína, y alcanza a la cuarta semana un contenido de 800 mg/100 g de proteína. Aunque este incremento es bastante alto, no lo llega a ser tanto como en la furosina para las mismas condiciones de conservación.

Fórmula B

Se observa un incremento de 2,2 veces desde el punto 0 hasta la cuarta semana, con valores de 334 y 726 mg/100 g de proteína respectivamente, cambios que fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) desde la primera semana de conservación. En este caso el incremento en CML fue bastante menor al de furosina para el mismo tiempo de conservación.

Fórmula C

El comportamiento es prácticamente el mismo al seguido por la furosina bajo las mismas condiciones de conservación, con un incremento de 5 veces y valores de 142 y 706 mg/100 g de proteína para el punto 0 y final de conservación. Los cambios fueron estadísticamente significativos desde la primera semana ($p < 0,05$).

Los valores de CML obtenidos en las fórmulas son elevados y más altos que los encontrados en leche, hay que indicar que las fórmulas analizadas estaban enriquecidas en hierro y vitamina C, sustancias que favorecen la formación de CML, además el tipo de grasa es más insaturada que la de la leche. En fórmulas infantiles en polvo, Birlouez y col., (2004) encuentran valores 2,5 veces más altos que los obtenidos en leche en polvo, de forma semejante Fenaille y col., (2006) para los mismos tipos de muestra encuentra valores próximos al doble en fórmulas infantiles.

El comportamiento durante el procesado fue diferente al obtenido en la conservación. Durante el primero puede verse favorecida la generación de CML debido a la mayor facilidad de oxidación de la grasa durante la etapa de deshidratación. Durante la conservación, al estar las fórmulas protegidas por una atmósfera de nitrógeno la influencia de los productos de oxidación lipídica será menor. Sin embargo a $A_w = 0,65$ la generación de CML vía oxidación puede verse favorecida de nuevo, lo que concuerda con los datos obtenidos.

Durante la conservación la fórmula más reactiva fue la que se elabora con proteínas parcialmente hidrolizadas. Este mismo comportamiento fue observado por Birlouez-Aragon y col. (2004) y Dittrich y col. (2006) que encuentran valores de hasta 50 veces superiores en fórmulas en polvo hipoalérgicas frente a fórmulas normales. Fenaille y col. (2006) encuentran niveles de CML 3,5 veces más altos en fórmulas en polvo parcialmente hidrolizadas que en fórmulas normales, estos autores lo relacionan con la mayor susceptibilidad a las modificaciones oxidativas de los péptidos.

A una temperatura de conservación de 30°C y actividad de agua alta (0,65) se produjo una corrección lineal entre furosina y CML ($r^2 = 0,999$). En condiciones drásticas de almacenamiento en las que se favorece la reacción de Maillard pueden estar formándose productos primarios y secundarios. A la actividad de agua propia del producto no se obtuvo una correlación tan alta entre furosina y CML lo que también fue observado por Fenaille y col. (2006) en el estudio de indicadores de Maillard en fórmulas infantiles.

La correlación de CML con los valores de lisina (r^2) a $A_w = 0,65$ es de 0,858, 0,828 y 0,662 para las fórmulas A, B y C respectivamente. La menor correlación

obtenida puede deberse a la menor sensibilidad y mayor coeficiente de variación de la medida de lisina útil frente a la de furosina.

Para las tres fórmulas se alcanzan e incluso se superan los valores de CML obtenidos tras 15 meses de conservación a 30°C en la primera semana de conservación a A_w 0,65 a la misma temperatura, lo que es de gran relevancia para realizar estudios futuros en menor tiempo.

No existen estudios bibliográficos sobre los cambios producidos en las diferentes etapas del procesado de fórmulas infantiles, ni durante la conservación de los mismos. Los datos puntuales obtenidos por los diferentes autores como Birlouez-Aragon y col. (2004) (entre 1,0 y 1,3 $\mu\text{g/g}$ de proteína), Dittrich y col. (2006) (entre 514 para fórmulas normales y 11372 ng/ml para fórmulas hidrolizadas), Fenaille y col. (2006) (entre 60 para fórmulas normales y 212 ng/mg en fórmulas hidrolizadas) y Charissou y col. (2007) (entre 5 y 40 ng/mg de proteína) son muy variables y en todos los casos más bajos a los encontrados por nosotros, sin embargo todos coinciden en la mayor reactividad de las fórmulas hidrolizadas, similar a los resultados obtenidos en este estudio.

IV.6. Intensidad de Fluorescencia

La aparición de compuestos fluorescentes es una característica de la reacción de Maillard.

La acumulación de compuestos fluorescentes libres ha sido relacionada con el tiempo y temperatura de procesado en sistemas modelo (Nakayama y col., 1980; Baisier y Labuza, 1992; Morales y col., 1996b; Morales y Jiménez-Pérez, 2001; Leclère y col., 2001), productos lácteos como leche (Morales y col., 1997b; Birlouez-Aragon y col., 1998; Siegl y col. 2000) y fórmulas infantiles (Birlouez-Aragon y col., 1999; Ferrer y col., 2005b).

La medida fluorimétrica se determina en el sobrenadante obtenido tras precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (Morales y col., 1996b) o mediante ajuste del pH para la precipitación de caseínas (Birlouez-Aragon y col., 1998).

IV.6.1. Estudios preliminares

El estudio de precisión fue realizado en 7 muestras no conservadas de la formula A (planta industrial). El bajo coeficiente de variación obtenido (1,33%) permite que este método pueda ser usado para evaluar el grado de pardeamiento de las muestras en los tratamientos empleados en este estudio.

IV.6.2. Determinación de fluorescencia en muestras

IV.6.2.1. Fórmulas infantiles

a) Procesado

La tabla III.6.2.1-1 muestra los resultados obtenidos en las diferentes etapas del procesado de fórmulas infantiles. Entre los pasos 1 y 2, se observó un descenso en la intensidad de fluorescencia (%) en las fórmulas A y B (con proteínas intactas) elaboradas en planta industrial y piloto. Por el contrario en las fórmulas C y D (con proteínas parcialmente hidrolizadas) elaboradas en planta piloto se observó un ligero incremento. En esta etapa, se adiciona la grasa y la fórmula se somete nuevamente a calentamiento, por lo que el descenso puede ser debido a la presencia del aceite, ya que los resultados son expresados en 100 g de sólidos (furosin y lisina útil son expresados en relación al contenido de proteína, el cual es el mismo en ambos pasos). El incremento producido en las fórmulas parcialmente hidrolizadas (C y D) puede reflejar mayor sensibilidad de este indicador en este tipo de fórmulas.

Entre los pasos 2 y 3 (secado-atomizado), las fórmulas infantiles de ambas plantas (industrial y piloto) mostraron un incremento en la intensidad de fluorescencia, siendo más bajo el incremento en las fórmulas elaboradas con proteínas intactas (fórmula A: 11,1 y 8,6 para planta industrial y piloto, respectivamente; fórmula B: 15,2 y 10,7 para planta industrial y piloto, respectivamente) que las fórmulas con proteínas parcialmente hidrolizadas (fórmula C: 28 y 18 para planta industrial y piloto, respectivamente; fórmula D: 23 en planta piloto). Estos datos confirman la mayor sensibilidad de este indicador para monitorizar el daño térmico durante la elaboración de fórmulas con proteínas parcialmente hidrolizadas.

No hay datos en la literatura sobre la acumulación de compuestos fluorescentes durante el procesado de fórmulas infantiles. Ferrer y col. (2005b) encuentran un incremento de tres veces en la intensidad de fluorescencia en fórmulas infantiles tras la conservación de 9 a 24 meses, más altos que los incrementos observados durante el procesado en el presente estudio. En sistemas modelo preparados con ingredientes similares a los usados en fórmulas infantiles y calentados a diferentes tiempos y temperaturas, Rufián-Henares y col., 2006c, obtienen el mayor incremento en la intensidad de fluorescencia tras calentamiento a 140°C/30 min. Estos mismos autores (Rufián-Henares y col., 2002a y b) también hallan un incremento en la intensidad de fluorescencia en fórmulas enterales durante su procesado.

Morales y col. (1996b) reportan valores de intensidad de fluorescencia de 20% y 44% en leche que fue pasteurizada y esterilizada en botella respectivamente, con un valor intermedio para UHT, concluyendo que los tratamientos térmicos pueden ser discriminados por medio de este indicador.

b) Conservación

Los resultados se pueden observar en las tablas III.6.2.1-2 a III.6.2.1-3. Este indicador fue estudiado primero en las muestras elaboradas en la planta industrial. Basados en estos resultados y al no observar grandes cambios, en la planta piloto solo se

estudiaron las muestras conservadas durante 24 meses a 4, 20, y 30°C y durante 15 meses a 30 °C.

En las fórmulas A y B se observó un pequeño incremento en la intensidad de fluorescencia tras la conservación. La fórmula C (planta industrial) mostró un incremento significativo ($p < 0,05$) en la intensidad de fluorescencia tras 15 meses de conservación en todas las temperaturas ensayadas. En la fórmula C preparada en planta piloto se obtuvieron cambios significativos ($p < 0,05$) tras 15 meses a 30 °C, alcanzando el mayor incremento tras 24 meses/30 °C. El estudio de la fórmula D (con proteínas parcialmente hidrolizadas y lactosa) confirma los resultados obtenidos en la planta piloto de la fórmula C (con proteínas parcialmente hidrolizadas y maltodextrinas), ya que se obtuvieron incrementos significativos a 30 °C tras 15 y 24 meses de conservación, aunque el incremento fue más bajo en esta fórmula. Estos resultados se corresponden con lo observado en furosina, donde también se observó mayor incremento en la fórmula C (planta piloto). La correlación lineal obtenida entre tiempo de conservación (24 meses) e intensidad de fluorescencia fue mayor de 0,75 (r^2) solo en las fórmulas con proteínas parcialmente hidrolizadas (tabla IV.6.2.1-1).

Tabla IV.6.2.1-1: Correlación entre tiempo de conservación e intensidad de fluorescencia en las fórmulas de planta industrial.

T ^a (°C)	Tiempo (meses)	Fórmulas		
		A	B	C
4	24 ¹	0,010	0,039	0,758
20	24 ²	0,010	0,139	0,876*
30	24 ²	0,711*	0,502	0,756*

* Nivel de significación ($P < 0,05$)

¹: n=5; ²: n=6

Este estudio sugiere que intensidad de fluorescencia es útil solo en fórmulas preparadas con proteínas hidrolizadas, tras por lo menos 15 meses de conservación. A diferencia de nuestros resultados, Ferrer y col. (2005b) encuentran incrementos en la intensidad de fluorescencia tras la conservación de fórmulas adaptadas y de continuación elaboradas con proteínas intactas durante 24 meses a 20 y 37°C.

c) Conservación a Aw 0,65

Los resultados se observan en las tablas III.6.2.1-4 y III.6.2.1-5.

Fórmulas A y B

La fórmula A mostró incrementos significativos en la intensidad de fluorescencia para ambas plantas (industrial y piloto) tras la primera semana de conservación a 20 y 30°C, pero no se observaron incrementos significativos entre la primera y cuarta semana; esto se explica ya que durante la primera semana se alcanza alrededor de un 9% de humedad en algunas fórmulas, sin observarse prácticamente aumento después de este tiempo. Entre las dos temperaturas estudiadas se observaron

diferencias significativas ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos en la formula B fueron similares a los de la formula A (tabla III.6.2.1-4).

La figuras 27 y 28 muestran la evolución de la intensidad de fluorescencia durante la conservación de las fórmulas A y B a 20 y 30°C/ A_w 0,65.

Figura 27: Evolución de la intensidad de fluorescencia durante la conservación de la formula A a 20 y 30°C/ A_w 0,65.

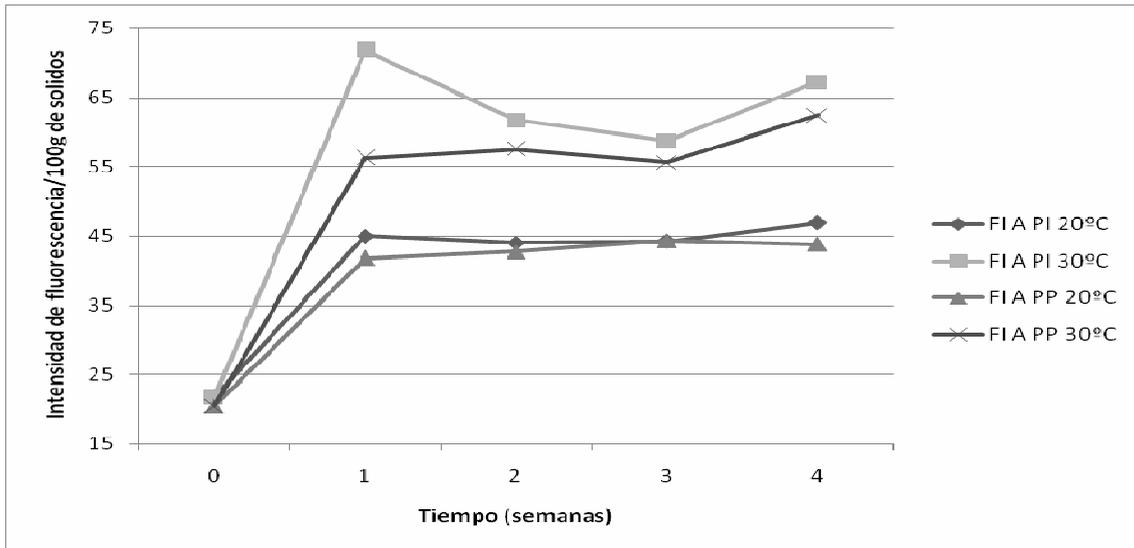
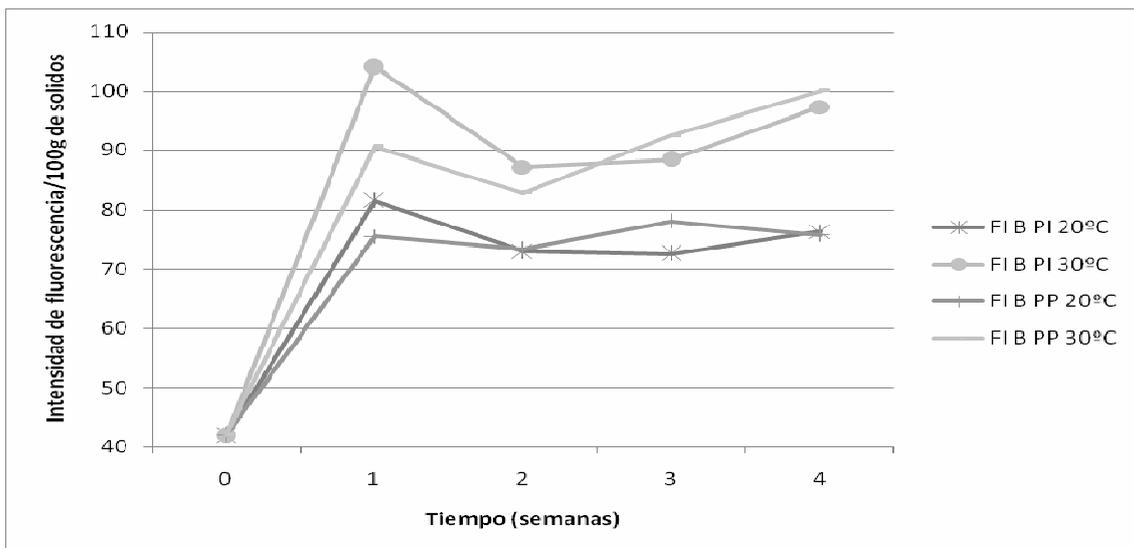


Figura 28: Evolución de la intensidad de fluorescencia durante la conservación de la formula B a 20 y 30°C/ A_w 0,65.

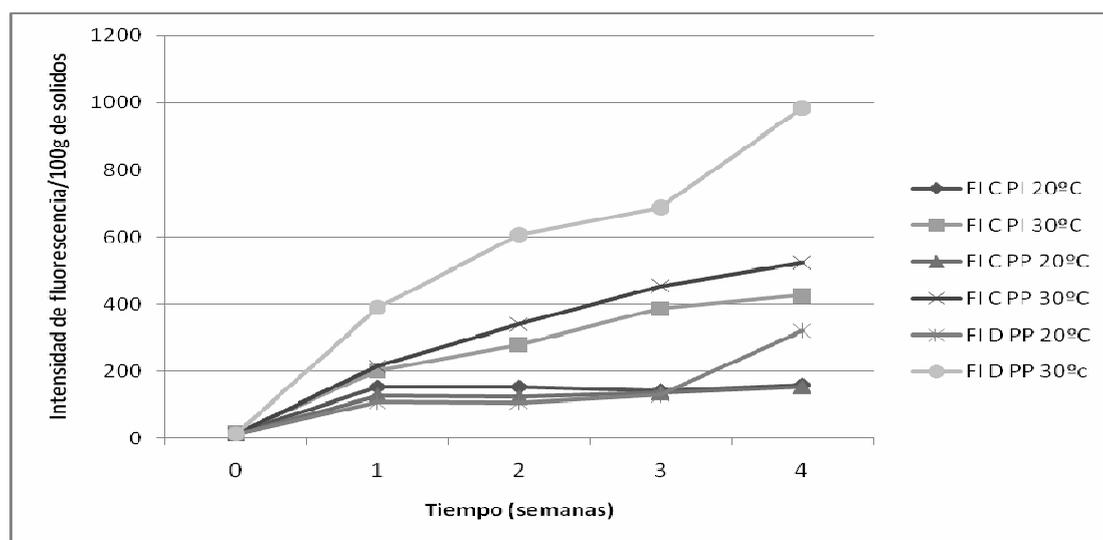


Fórmulas C y D

En las fórmulas con proteínas parcialmente hidrolizadas se observó un comportamiento diferente (C y D) (tabla III.6.2.1-5). A 20°C, el comportamiento de la formula C en ambas plantas (industrial y piloto) y la formula D fue similar al de las fórmulas elaboradas con proteínas intactas, con un incremento significativo en la primera semana ($p < 0,05$) y posterior estabilización de los valores, excepto tras 4 semanas en la formula D donde se observo un incremento notable. A 30°C, sin embargo, se observaron aumentos significativos en todas las semana estudiadas, alcanzando incrementos tras 4 semanas de 409 y 508 para la formula C elaboradas en planta industrial y piloto respectivamente, y 970 para la formula D. Esto confirma la mayor reactividad de la lactosa, la cual no es mostrada claramente por los valores de furosina, ya que su generación es menor cuando el daño térmico inicial es alto. Por lo tanto en este caso el indicador de elección sería la intensidad de fluorescencia.

La figura 29 muestra la evolución de la intensidad de fluorescencia durante la conservación de las fórmulas C y D a 20 y 30°C/Aw 0,65.

Figura 29: Evolución de la intensidad de fluorescencia durante la conservación de las fórmulas hidrolizadas a 30°C/Aw 0,65.



La correlación (r^2) lineal entre tiempo de conservación e intensidad de fluorescencia fue mayor de 0,94 solo en las fórmulas hidrolizadas (tabla IV.6.2.1-2). Los resultados obtenidos a Aw 0,65 confirman los obtenidos a Aw normal. La medida de fluorescencia solo es útil en fórmulas con proteínas hidrolizadas después de largos periodos de conservación.

Tabla IV.6.2.1-2: Correlación (r^2) entre tiempo de conservación a A_w 0,65 e intensidad de fluorescencia.

T ^a (°C)	Tiempo (semanas)	Fórmulas							
		A		B		C		D	
		PI	PP	PI	PP	PI	PP	PP	
20	4	0,561	0,583	0,369	0,533	0,509	0,665	0,799*	
30	4	0,381	0,603	0,388	0,662	0,948*	0,965*	0,959*	

* Nivel de significancia ($P < 0,05$)

n=5

Solo se obtuvieron altas y significativas ($p < 0,05$) correlaciones entre furosina e intensidad de fluorescencia ($r^2 \geq 0,94$) en las fórmulas con proteínas hidrolizadas cuando se conservaron a 30°C con A_w de 0,65. Entre intensidad de fluorescencia y CML también se obtuvo una alta correlación lineal ($r^2 = 0,95$) solo en la formula con proteína hidrolizada.

Ge pan y Melton (2007) estudian la intensidad de florescencia en una mezcla seca de caseinato sódico y lactosa calentada a 60°C/96 h con diferentes HR, encontrando los mayores incrementos a HR de 67 y 75 % en todos los tiempos ensayados.

IV.6.2.2. Sistemas modelo

Los resultados se muestran en las tablas III.6.2.2-1 a III.6.2.2-3 y se expresan en intensidad de fluorescencia por 100 g de solidos.

Sistemas modelo FOS

Los sistemas modelo FOS-PSLBL y FOS-CC 2 no mostraron cambios significativos en ninguna de las temperaturas y tiempos ensayados. Sin embargo los sistemas modelo FOS-Hidrocaseina y FOS-PSLBLPH mostraron un incremento estadísticamente significativo a 90 y 100°C con correlaciones lineales entre tiempo y temperatura mayores de 0,85 y 0,97 respectivamente, siendo estadísticamente significativas ($p < 0,05$) solo en este ultimo sistema (tabla IV.6.2.2-1), lo que indica la gran sensibilidad de este indicador para el seguimiento de la reacción de Maillard en las proteínas parcialmente hidrolizadas.

Tabla IV.6.2.2-1: Correlación entre tiempo y temperatura para la intensidad de fluorescencia.

Sistemas Modelo	80°C	90°C	100°C
FOS-Hidrocaseína	-	0,899	0,854
FOS-PSLBL	0,440	0,352	0,452
FOS-CC 2	0,273	0,307	0,870
FOS-PSLBLPH	0,891	0,973*	0,986*
MDX-PSLBL	0,012	0,706	0,554
MDX-CC 2	0,535	0,010	-0,196
MDX- Hidrocaseína	0,843	0,912*	0,423
MDX-PSLBLPH	0,847	0,991*	0,970*
LAC-PSL	0,052	0,092	0,315
LAC-CC 2	0,069	0,038	0,331
LAC- Hidrocaseína	0,936*	0,977*	0,941*
LAC-PSLBLPH	0,934*	0,906*	0,993*

* Nivel de significancia ($P < 0,05$)

n=4

Sistemas modelo con maltodextrinas

En el sistema MDX-CC 2 no se observaron cambios significativos. El sistema modelo MDX-PSLBL sólo mostró incrementos significativos ($p < 0,05$) tras 10 minutos de calentamiento a 90 y 100°C, con correlaciones entre tiempo y temperatura de 0,71 y 0,55 respectivamente (tabla IV.6.2.2-1); mientras que en el sistema MDX-Hidrocaseína se obtuvieron incrementos estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en las 3 temperaturas ensayadas, obteniéndose una correlación lineal entre tiempo y temperatura estadísticamente significativa ($p < 0,05$) a 90°C (tabla IV.6.2.2-1). El sistema MDX-PSLBLPH mostró incrementos significativos ($p < 0,05$) a 80, 90 y 100°C. A 90 y 100°C los cambios también fueron significativos ($p < 0,05$) entre los tiempos ensayados (3, 6 y 10 minutos) obteniéndose el mayor incremento tras 100°C/10 min. A estas mismas temperaturas las correlaciones lineales entre tiempo y temperatura para la intensidad de fluorescencia fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (tabla IV.6.2.2-1).

Sistemas modelo con lactosa

En los sistemas modelo LAC-CC 2 y LAC-PSL elaborados con proteínas intactas no se observaron cambios significativos en ninguna de las temperaturas y tiempos ensayados. En el sistema LAC-hidrocaseína se observaron incrementos estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en las tres temperaturas ensayadas con correlaciones lineales y significativas ($p < 0,05$) entre tiempo y temperatura superiores a 0,93 (tabla IV.6.2.2-1). El sistema LAC-PSLBLPH se comportó de forma semejante al sistema MDX-PSLBLPH mostrando cambios significativos entre temperaturas para el mismo tiempo y entre los tiempos para la misma temperatura ensayada, obteniéndose un incremento máximo de 30 tras 100°C/10 minutos, superior al obtenido cuando se

elaboró con maltodextrina. Las correlaciones lineales entre tiempo y temperatura obtenidas fueron bastante altas y significativas ($p < 0,05$) para todas las temperaturas ensayadas (tabla IV.6.2.2-1).

Entre Intensidad de fluorescencia y furosina solo se encontraron correlaciones directas en los sistemas con proteínas hidrolizadas ($r^2 > 0,73$), siendo significativas ($p < 0,05$) en los sistemas DEX-Hidrocaseína (80°C), MDX -PSLBLPH (90 y 100°C), LAC-Hidrocaseína (80 y 100°C) y LAC-PSLBLPH (90 y 100°C). Aunque intensidad de fluorescencia es un indicador secundario la alta sensibilidad hace que tenga correlación con furosina.

Este estudio muestra la gran sensibilidad de la intensidad de fluorescencia como indicador del daño térmico por Maillard en los sistemas elaborados con proteínas hidrolizadas. Estos resultados confirman lo observado durante el procesado de las fórmulas C y D, donde también se obtuvo en incremento en la intensidad de fluorescencia en el calentamiento en fase líquida.

Rufián y col. (2002b) calientan sistemas modelo maltodextrina (11,20%)-caseína (5,46%) y maltodextrina (11,42%)-proteínas del lactosuero (2,73%) durante 10 minutos a 120°C, encontrando incrementos en la intensidad de fluorescencia por 100 g de sólidos entre 71,5-83 y 67,5-82 respectivamente con respecto al punto 0, los cuales fueron ligeramente más altos en el sistema con proteína del lactosuero. Estos incrementos fueron mayores que los obtenidos en los sistemas modelo MDX-PSLBL y MDX-CC 2 tras 100°C/10 min, en donde prácticamente no se observamos incrementos probablemente debido a la menor temperatura de calentamiento. Rufián y col. (2006c) estudian 6 sistemas modelo preparados con mezclas de caseína, proteína de suero obtenida en laboratorio o proteína de suero comercial (4%) con maltodextrinas (12%) o lactosa (7%), concentraciones similares a las usadas en la elaboración de fórmula infantiles (menores que las usadas en los sistemas modelo del presente trabajo) y enterales, calentados a 100, 120 y 140°C durante 30 min, encontrando incrementos significativos ($p < 0,001$) a 140°C para todos los sistemas modelo en todos los tiempos ensayados, siendo los sistemas elaborados con lactosa los que mostraron mayor reactividad que los elaborados con maltodextrina; sin embargo a 100°C tampoco obtuvieron cambios significativos.

En general se puede decir que la determinación de intensidad de fluorescencia mostró ser muy sensible y útil en el control de sistemas elaborados con proteínas hidrolizadas. La medida de la intensidad de fluorescencia es útil para control del calentamiento en estado líquido de las fórmulas infantiles.

IV.7. Determinación de reflectancia

La medida óptica del color también es utilizada como medida del pardeamiento, tanto en sistemas modelo (Hidalgo y Zamora, 1993; Morales y van Boekel, 1998) como en alimentos líquidos (Kessler y Fink, 1986; Bertelli y col. 1996) y en alimentos sólidos (Resmini y col. 1993; Fernández-Artigas y col. 1999a; Ramírez-Jiménez y col. 2001; Ferrer y col. 2005b). El fotómetro de reflexión proporciona diferentes parámetros de

color del sistema CIELab: L^* (luminosidad), a^* (rojo-verde) y b^* (amarillo-azul). Mediante diversas ecuaciones, estos parámetros se pueden relacionar con la intensidad de pardeamiento (Francis y Clydesdale, 1975).

IV.7.1. Estudios preliminares

La precisión fue realizada para la medida en todas las fórmulas (A, B, C y D) (Tabla III.7.1-1) y para el método en las fórmulas B (planta piloto 30°C/4 semanas/ A_w 0,65) y D (planta piloto 30°C/4 semanas/ A_w 0,65) elaboradas con proteínas intactas e hidrolizadas respectivamente (Tabla III.7.1-2). Los bajos coeficientes de variación obtenidos para L^* y b^* permiten usar este método para el estudio del pardeamiento en las muestras de este trabajo. Para el análisis de los resultados se incluyó el índice de amarillez (YI) ya que este establece una relación entre L^* y b^* , parámetros que mostraron mayores cambios durante la conservación de las fórmulas infantiles.

IV.7.2. Determinación de reflectancia en muestras

IV.7.2.1. Fórmulas infantiles

a) Conservación

Las tablas III.7.2.1-1 y III.7.2.1-2 muestran los parámetros L^* y b^* y YI de las fórmulas A, B, C, y D elaboradas en planta industrial y piloto, conservadas a 4, 20, y 30°C durante 15 meses. No se encontraron cambios significativos ($p < 0,05$) en ningún caso.

b) Conservación a A_w 0,65

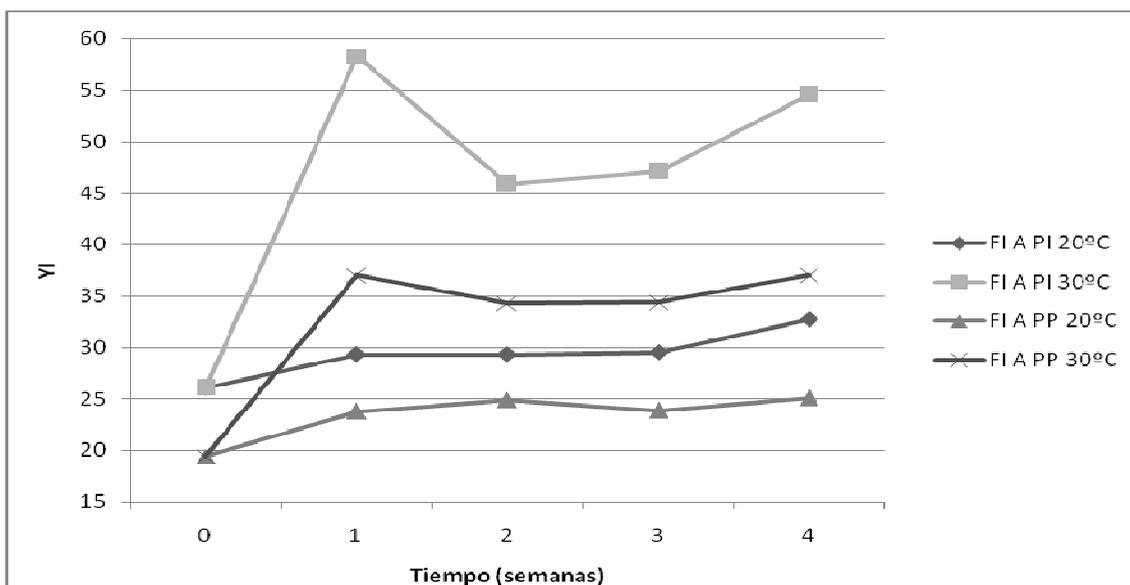
Los resultados para las muestras conservadas bajo condiciones drásticas se observan en las tablas III.7.2.1-3 y III.7.2.1-4.

Fórmula A

En esta fórmula se obtuvieron incrementos significativos ($p < 0,05$) tras 1 semana de conservación a 20 y 30°C en ambas plantas (industrial y piloto), sin embargo no se observaron cambios durante las siguientes 3 semanas de conservación, excepto un ligero incremento tras 4 semanas a 30°C en la planta industrial. A 20 y 30°C, se obtuvieron buenas correlaciones (r^2) lineales entre YI e intensidad de fluorescencia (0,712 y 0,961 respectivamente para la planta industrial y 0,938 y 0,971 respectivamente para la planta piloto).

La figura 30 muestra la evolución del color (YI) durante la conservación de la fórmula A a 20 y 30°C/ A_w 0,65.

Figura 30: Evolución del color durante la conservación de la formula A a 20 y 30°C/Aw 0,65.

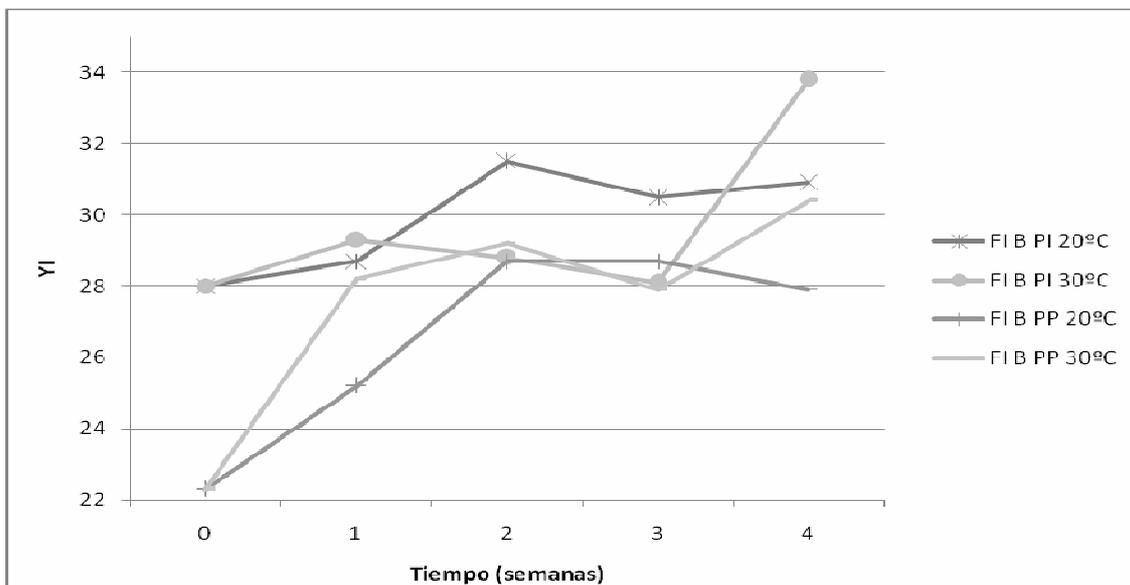


Fórmula B

La formula B (planta industrial y piloto) mostro ligeros incrementos de color tras 1 semana de conservación a 20°C, con un alto y significativo incremento tras 2 semanas, seguida por la estabilización de los valores. Las correlaciones (r^2) lineales entre YI e intensidad de fluorescencia fueron bajas (0,5113 y 0,6816 para la planta industrial y piloto respectivamente). A 30°C, un incremento en el YI fue observado tras 1 semana de conservación, con valores constantes para las siguientes 2 semanas y un incremento tras 4 semanas de conservación. La correlación (r^2) lineal del YI con la intensidad de fluorescencia fue 0,4277 y 0,8983 para la planta industrial y piloto respectivamente.

La figura 31 muestra la evolución del color (YI) durante la conservación de la formula B a 20 y 30°C/Aw 0,65.

Figura 31: Evolución del color durante la conservación de la formula B a 20 y 30°C/Aw 0,65.



Fórmula C

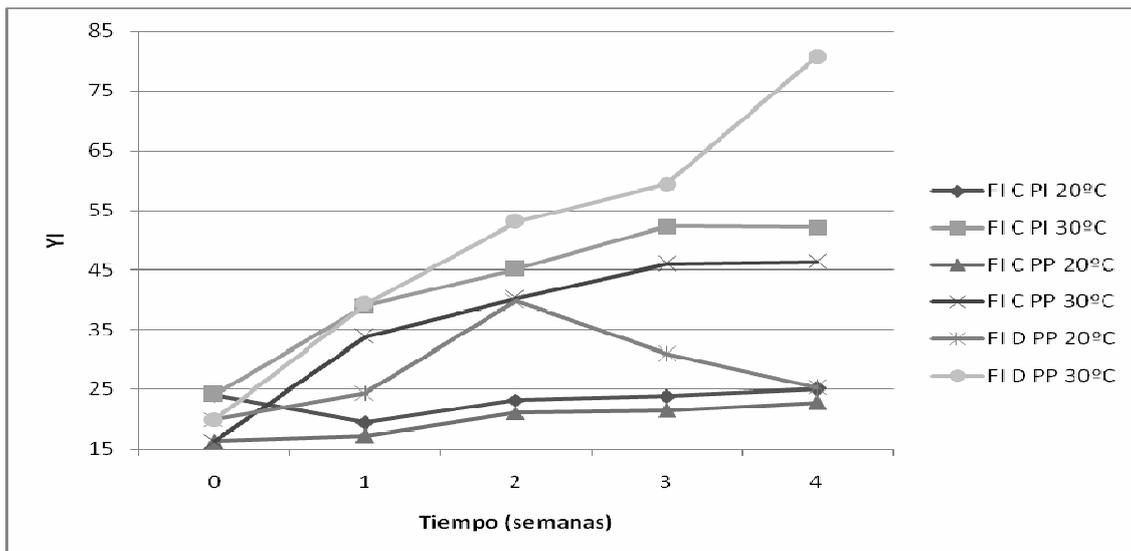
A 20°C, el YI no incrementó durante la conservación de la formula elaborada en planta industrial. Para la misma temperatura de conservación en la planta piloto se observó un ligero incremento tras 2 semanas, y notablemente tras 4, obteniendo una baja correlación (r^2) lineal con la intensidad de fluorescencia (0,441). A 30°C en ambas plantas, el YI incremento durante las primeras 3 semanas, permaneciendo estable hasta la 4 semana, y obteniendo altas correlaciones (r^2) lineales con la intensidad de fluorescencia (0,973 y 0,952 para la planta industrial y piloto respectivamente).

Fórmula D

En la formula D, solo se produjeron cambios significativos durante las 2 primeras semanas a 20°C, mientras que a 30°C estos lo fueron durante las 4 semanas de conservación (tabla III.7.2.1-4). A 20°C no se obtuvo correlación lineal entre color e intensidad de fluorescencia, pero a 30°C la correlación (r^2) fue alta (0,982). Los valores en la medida del color (YI) en la fórmula D fueron más altos que en la fórmula C, similar a lo observado en la intensidad de fluorescencia.

La figura 32 muestra la evolución del color (YI) durante la conservación de las fórmulas C y D a 20 y 30°C/Aw 0,65.

Figura 32: Evolución del color durante la conservación de las fórmulas C y D a 20 y 30°C/Aw 0,65.



Las mayores correlaciones entre color (YI) e intensidad de fluorescencia se obtuvieron a 30°C en las fórmulas con proteínas hidrolizadas (C y D), por lo que en principio en este caso se podría usar indistintamente cualquiera de los dos como indicador del daño térmico por Maillard, sin embargo la sensibilidad es superior para la intensidad de fluorescencia por lo que este sería el de elección.

Buenas y significativas ($p < 0,05$) correlaciones ($r^2 \geq 0,81$) entre furosina y color (YI) se obtuvieron solo en las fórmulas con proteínas hidrolizadas conservadas a 30°C con Aw de 0,65; similar a lo observado entre furosina e intensidad de fluorescencia, por lo que en este tipo de fórmulas almacenadas bajo condiciones extremas se podría usar cualquiera de estos tres indicadores.

Tras 15 meses de conservación a 30°C y Aw propia del producto la medida del color no permite evaluar la extensión de la reacción de Maillard en las fórmulas infantiles analizadas.

Guerra-Hernández y col. (2002b) conservan una fórmula infantil en polvo durante 90 días a 20 y 55°C bajo atmósfera de oxígeno y nitrógeno, observando que la intensidad del pardeamiento medida como ΔE fue mayor a partir de 30 días en atmósfera de nitrógeno y 55°C. Ferrer y col. (2005b) estudian el color en fórmulas infantiles en polvo adaptadas y de continuación conservadas a 20 y 37°C durante 24 meses observando un incremento de color (ΔE) en ambas fórmulas, el cual fue mayor a 37°C para todos los tiempos estudiados. En nuestras fórmulas A y B no se observaron cambios en ΔE (datos no incluidos en tablas). Rufián-Henares y col. (2004a) determinan color en sistemas modelo que simulan fórmulas infantiles y enterales elaborados con caseína, proteína del lactosuero obtenida en laboratorio y proteína de suero comercial (4%), con lactosa (7%) y/o maltodextrina (12%), calentados a 100, 120 y 140°C durante 30 minutos, encontrando que el avance del pardeamiento puede ser seguido a través de los diferentes tratamientos térmicos cuando el ingrediente inicial tiene un alto daño térmico, o el sistema es calentado a altas temperaturas.

IV.8. Análisis complementarios

IV.8.1. Determinación de azúcares

Los azúcares son sustratos de las reacciones de pardeamiento químico. La determinación de los azúcares es utilizada por diversos autores para conocer la evolución de esta reacción (Troyano y col., 1992; Evangelisti y col., 1994; Contreras y col., 2008).

La tabla III.8.3-1 muestra el contenido azúcares obtenido en los ingredientes proteicos. Las proteínas del lactosuero presentaron una mayor concentración de azúcares, especialmente lactosa, con valores que oscilan entre 0,08% y 76,5% para la PSLBL y lactosuero 3 respectivamente. El bajo valor registrado en la PSLBL es lógico ya que se trata de una proteína que se comercializa como baja en lactosa. Además de lactosa también se determinaron galactosa y glucosa en el lactosuero 1 y PSLBL. En los caseínatos, y proteínas de soja no se encontraron azúcares, excepto en el CC 2 donde se detectó una pequeña cantidad de lactosa y en la soja Austria donde se determinó una pequeña concentración de glucosa. En las proteínas hidrolizadas se encontraron pequeñas cantidades de lactosa.

Según estos resultados serían las proteínas del lactosuero las más reactivas al daño térmico por Maillard, debido a las altas concentraciones de lactosa encontradas, lo cual se confirma con los altos valores de furosina obtenidos en estas muestras, siendo las menos reactivas los caseínatos, proteínas de soja y proteínas hidrolizadas, en las cuales se obtuvieron valores muy bajos de furosina (tabla III.2.2.1-1).

IV.8.2. Determinación de ácidos grasos

Los ácidos grasos se determinaron en las fórmulas A, B y C elaboradas en planta industrial conservadas a 30°C durante 15 meses y durante 1 y 4 semanas a $A_w=0,65$ (tablas III.8.4-1 a III.8.4-3). No se observaron cambios significativos ($p<0,05$) en la composición de ácidos grasos durante la conservación en ninguna de las 3 fórmulas analizadas. Las concentraciones de ácidos grasos obtenidas se encuentran dentro de los intervalos establecidos por la regulación europea (tabla IV.8.2-1), y fueron similares a los hallados por otros autores para fórmulas infantiles (O'Keefe y col., 1994; Hayat y col., 1999; Satchithanadam., 2002; Roumeu-Nadal y col., 2007).

Tabla IV.8.2-1: Comparación entre las recomendaciones y los valores obtenidos de ácidos grasos para fórmulas infantiles.

Ácidos grasos	Recomendaciones*	Valores obtenidos
Ácidos laurico y Mirístico	<20% del total de los ácidos grasos	10,16-14,45
Acido linoleico	1,53-6,15 g/100g de muestra	3,54-4,56
Acido α - linolénico	>0,25 g/100g de muestra	0,37-0,46
Linoleico/ α - linolenico	5-15	9,26-10,6

*Directiva 2006/141/CE de la Comisión del 22 de diciembre de 2006. Diario oficial de la unión europea, L401/1-33.

No hay estudios previos publicados sobre el perfil de ácidos grasos en fórmulas infantiles durante la conservación. Rufián-Henares y col. (2005) estudian el perfil de ácidos grasos durante la conservación de fórmulas enterales líquidas preparadas con ingredientes similares a los empleados en las fórmulas infantiles, encontrando pérdidas significativas ($p < 0,01$) en los ácidos oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolenico (C18:3) en todos los tiempos ensayados (1-4 semanas a 32 y 55°C) no encontrando pérdidas en otros ácidos grasos. Durante la conservación por largo tiempo (36 semanas) a 20 y 30°C observaron un comportamiento diferente, obteniendo pérdidas significativas en todos los ácidos grasos analizados, mientras que a 4°C solo observaron pérdidas significativas en los ácidos grasos insaturados (Rufián-Henares y col., 2005). Los ácidos grasos en las fórmulas infantiles del presente estudio mostraron gran estabilidad incluso bajo condiciones drásticas de conservación (tiempo, temperatura y A_w). La gran estabilidad observada en las fórmulas infantiles comparada con las fórmulas enterales puede ser debido al diferente estado de estas (en polvo y líquidas).

IV.8.3. Determinación de peróxidos

Los valores de peróxidos están expresados en miliequivalentes de O_2/kg (tabla III.8.5-1). Las fórmulas fueron conservadas en sus botes originales (cerrados y bajo atmosfera de nitrógeno) a 20°C durante los 15 meses de conservación. A 30°C los botes fueron abiertos después de los 6 meses de conservación. Se analizaron solo las muestras elaboradas en planta industrial.

Tras 6 meses de conservación a 30°C, y 15 meses a 20°C en botes cerrados, no se observó oxidación en ninguna de las fórmulas analizadas. Tampoco se observó oxidación tras la primera semana de conservación a 30°C/ A_w 0,65 en ninguna de las fórmulas. Solo se obtuvieron peróxidos tras 12 y 15 meses de conservación a 30°C para las 3 fórmulas (A, B y C) estudiadas y tras 4 semanas a 30°C/ A_w 0,65 solo en las fórmulas A y B. Los valores de peróxidos siempre incrementaron en las fórmulas A y B, pero disminuyó en la fórmula C entre 12 y 15 meses de conservación a 30°C, no detectando peróxidos tras la conservación a A_w 0,65.

Roumeu-Nadal y col. (2007) estudian la estabilidad a la oxidación de la fracción lipídica en fórmulas en polvo a base de leche, encontrando valores iniciales de 0,52, 0,85 y 0,98 miliequivalentes de O_2/kg respectivamente, para fórmulas no suplementadas (NSF) y fórmulas suplementadas (SF-A y SF-B) con diferentes concentraciones de n-3

y n-6 LC-PUFA. Los valores encontrados en las fórmulas estuvieron dentro de los límites de peróxidos establecidos por la FAO/WHO (1989) para aceites refinados (10 miliequivalentes de O₂/kg). Tras 15 meses de conservación a 25°C, la fórmula NSF mostró un nivel de peróxidos de solo 1,48 miliequivalentes de O₂/kg. Por el contrario, estos valores aumentaron lentamente en la fórmula SF-A a 25 y 37°C siendo 4,5 y 10,5 veces más altos que los valores iniciales, respectivamente. En las fórmulas SF-B los peróxidos aumentaron más rápidamente, alcanzando un máximo tras 8 meses a 25 y 37°C (12,9 y 20,3 miliequivalentes de O₂/kg, respectivamente) decreciendo posteriormente. El valor de peróxidos en las fórmulas sin suplementar fue muy bajo cuando se conservaron a temperatura ambiente (20-25°C) y en botes cerrados.

Los valores de peróxidos obtenidos en las fórmulas del presente estudio se encuentran dentro de los valores permitidos para aceites refinados, excepto en la fórmula A tras 15 meses a 30°C.

En las fórmulas conservadas en botes cerrados no se observó oxidación, y solo se observó cuando los botes fueron abiertos, después de 6 meses de conservación a 30°C. Este pequeño cambio no fue observado en la determinación de ácidos grasos debido al coeficiente de variación de la cromatografía de gases.

IV.8.4. Determinación de pH

La reacción de Maillard produce acidificación del medio. Esta es el resultado de la pérdida del grupo amínico y la aparición de ácidos débiles (Van Boekel, 1988).

El comportamiento del pH fue estudiado en los sistemas modelo siendo bastante irregular, con aumentos y descensos entre tiempos y temperaturas. Contrario a lo que se esperaba los pHs no disminuyeron sino que aumentaron ligeramente en la mayoría de los casos, hasta 0,23, 0,37 y 0,31 unidades para los sistemas FOS-PSLBL, MDX-CC 2 y LAC-PSL respectivamente. Solo se observó una ligera disminución del pH en los sistemas FOS-PSLBLPH, MDX-PSLBLPH y LAC-Hidroc caseína (0,08, 0,07 y 0,05 unidades respectivamente).

En este caso la determinación de pH no permite seguir la evolución de la reacción de Maillard a través de los diferentes tratamientos térmicos. Sin embargo los sistemas con proteínas hidrolizadas son los que mostraron mayor tendencia al descenso del pH, lo que es lógico, pues existe un mayor número de grupos amino que pueden reaccionar y por tanto disminuir el pH.

El no descenso del pH en los diferentes sistemas modelo puede ser debido a que los tiempos y temperaturas ensayados (100°C/10min) no han sido tan drásticos como para ocasionar un daño térmico suficiente que genere descenso de pH. Los tratamientos térmicos a los que fueron sometidos los sistemas modelo se realizaron para tratar de simular los empleados durante la elaboración de las fórmulas, razón por la cual no fueron muy drásticos. Reyes y col. (1982) no observan cambios aparentes de pH por Maillard en un sistema modelo glicina/azúcar tras calentamiento a 60°C. Rufián-Henares (2002) calienta sistemas modelo de caseína, proteínas del lactosuero, glutamina, arginina y lactosa o maltodextrinas a 100, 120 y 140°C durante 30 min,

encontrando descensos notables tras este tiempo en todos los sistemas. Tras 10 minutos de calentamiento a 100°C este autor también obtiene descensos aunque muy ligeros de pH (Rufián-Henares, 2002). Similar a lo obtenido en el presente trabajo, en los sistemas con proteínas hidrolizadas, este autor también obtiene mayores descensos del pH en los sistemas elaborados con aminoácidos. Su-Lin y col. (2005) encuentran gran fluctuación del pH durante las primeras 3 horas en sistemas modelo glicina/galactosa y glicina/glucosa incubados a 45 y 60°C. Finalmente Shih-Chuan y col. (2008) hallan descensos en el pH de un sistema modelo glicina-galactosa tras 80h/60°C, 30h/75°C y 30h/90°C de calentamiento.

Como se puede observar de los datos encontrados en la bibliografía son necesarios tratamientos térmicos elevados para poder utilizar la medida de pH como indicador de pardeamiento químico.

V. CONCLUSIONES

1. Ingredientes proteicos del mismo tipo presentaron valores diferentes de lisina útil. Las proteínas del lactosuero han sido las que han mostrado mayor daño térmico.
2. Furosina y CML son indicadores útiles para el control del daño térmico durante el procesado de formula infantiles.
3. Furosina no puede utilizarse para comparar el daño térmico entre formulas con diferente formulación o similar formulación pero diferentes lotes.
4. Las pérdidas de lisina útil durante el procesado estuvieron entre el 10 y 35%. En todos los casos el valor final de lisina útil fue similar o superior al requerido por los lactantes. En la conservación se incrementaron las perdidas, pero solo cuando se realiza a 30°C durante 24 meses estas no cubren los requerimientos nutricionales de los lactantes. Se recomienda que la temperatura de conservación no superen los 20°C.
5. La correlación obtenida entre perdida de lisina y furosina durante el procesado fue alta. Al ser este último un indicador más sensible se propone a la industria utilizar furosina como indicador de daño térmico y nutricional de las proteínas durante la elaboración de fórmulas infantiles.
6. Durante la conservación, la furosina es un indicador útil cuando las formulas infantiles no presentan un alto daño térmico inicial. Por tanto, el cálculo del porcentaje de lisina bloqueada mediante la medida de furosina puede no ser adecuado.
7. HMF no debe usarse en fórmulas con maltodextrinas o lactosuero, sin embargo la ausencia de furfural en los ingredientes y la relación directa con furosina en formulas comerciales, puede hacer que el furfural si lo sea.
8. Pirralina solo ha sido cuantificado en un tipo de fórmula tras un largo periodo de conservación a temperatura y/o humedad inadecuada por lo que se puede afirmar que para un control rutinario no debe utilizarse este indicador.
9. La formación de CML es mayor durante el procesado que durante la conservación y durante esta última las fórmulas parcialmente hidrolizadas son más sensibles.
10. La medida de intensidad de fluorescencia es muy sensible a los tratamientos en formulas elaboradas con proteínas parcialmente hidrolizadas.
11. La determinación de indicadores de la reacción de Maillard en formulas infantiles conservados a A_w de 0,65 permite comprobar la extensión de la misma de forma fiable en almacenamientos acelerados.

Conclusión final. Los valores de indicadores de pardeamiento químico del producto final están condicionados no solo por el procesado sino por el daño térmico de los ingredientes utilizados en la formulación y por tanto comparar lotes elaborados con distintos ingredientes o fórmulas de diferentes industrias no es adecuado.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Adachi, S. and Patton, S. Presence and significance of lactulose in milk products: A review. *J.Dairy Sci.*, 1961, 44: 1375-1393.

Adrian, J. The Maillard reaction II. Study of the behavior of six pure amino acids. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1963, 17: 1-35.

Adrian, J. The Maillard reaction. En: Handbook of nutritive value of processed food. Vol. 1. Food for human use, Recheigl, M., (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982: 679-685.

Adrian, J. and Fragne, R. Le reaction de Maillard VIII. Role des pre-melanoidines sur la digestibilite azotée et la proteolyse in vitro. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1973, 27: 111-123.

Adrian, J.; Frangne, R.; Petit, L.; Godon, B. and Barbier, J. Nutritional repercussions of soluble products formed during the Maillard reaction. *Ann-Nutr-Aliment.*, 1966, 20: 257-77.

Ahmed, N.; Mirshekar-Syahkal, B.; Kennish, L.; Karachalias, N.; Babaei-Jadidi, R. and Thornalley, P.J. Assay of advanced glycation endproducts in selected beverages and food by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection.

Mol Nutr Food Res., 2005, 49 (7): 691-699.

Ahmed, M.U.; Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. Identification of N-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem.*, 1986, 261: 4889-4894.

Alais, C. and Linden, G. Manual de Bioquímica de los Alimentos. Barcelona: Masson, 1990.

Albalá-Hurtado, S.; Bover-Cid, S.; Izquierdo-Pulido, M.; Veciana-Nogués, T. and Vidal Carou, C. Determination of available lysine in infant milk formulae by HPLC. *J.Chrom.*, 1997a, 778: 235-241.

Albalá-Hurtado, S.; Veciana-Nogués, T.; Izquierdo-Pulido, M. and Vidal Carou, C. Determination of free and total furfural compounds in infant milk fórmulas by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 1997b, 45: 2128-2133.

Albalá-Hurtado, S.; Veciana-Nogués, T.; Mariné-Font, A. and Vidal Carou, C. Changes in furfural compounds during storage of infant milks. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46: 2998-3003.

Albalá-Hurtado, S.; Veciana-Nogués, T.; Mariné-Font, A. and Vidal Carou, C. Progress of Browning Reactions during Storage of Liquid Infant Milks. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 4033-4037

American Academy of Pediatrics. Comité on Nutrition. Hypoallergenic infant fórmulas. *Pediatrics.*, 2000, 106: 346-349.

Ames, J.M. The Maillard reaction. En: Biochemistry of food proteins. Hudson, B.J.F. (Ed.), Elsevier Applied Science, Londres. 1992, Capítulo 4, Vol. 4, 99-153.

- Ames J.M.** Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chem.*, 1998, 62, 431-439.
- Ames, J.M.; Apriyantono, A. and Arnoldi, A.** Low molecular weight coloured compounds formed in xylose-lysine model systems. *Food Chem.*, 1993, 46:121-127.
- Ames, J.M. and Nursten, H.E.** Recent advances in the chemistry of coloured compounds formed during the Maillard reaction. En: Trends in food science, Lien, W.S. and Foo, C.W. (Eds.), Singapore Institute of Food Science and Technology, Singapore. 1989, 8-14.
- Anantanaman, K. and Finot, P.A.** Nutritional aspects of food proteins in relation to technology. *Food Rev. Int.*, 1993, 9: 629-655.
- Anderson, T.R. and Quicke, G.V.** An isotopic method for determining chemically reactive lysine based on succinylation, *J. Sci. Food Agric.*, 1984, 35: 472-480.
- Andrews, G. R.** Distinguishing pasteurized, UHT and sterilized milks by their lactulose content. *J. Society Dairy Technol.*, 1984, 37: 92-95.
- AOAC. Protein (total) in milk. 920.105.** En: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Helrich, K (Ed), 15th edn. Arlington, Virginia, 1990.
- AOAC. Moisture in dried milk. 927.05.** En: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Helrich, K (Ed), 15th edn. Arlington, Virginia, 1990.
- AOAC. Peroxide value of oils and fats. 965.33.** En: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Helrich, K (Ed), 15th edn. Arlington, Virginia, 1990.
- Archer, M.C. and Tannenbaum, S.R.** Vitamins. En: Nutritional and Safety Aspects of Food Processing, Tannenbaum, S.R. (Eds.), Food Science, Basilea , 1979, 47-95.
- Ashoor, S.H. and Zent, J.B.** Maillard browning of common amino acids and sugars. *J. Food Sci.*, 1984, 49: 1206-1207.
- Avendaño, M.C. and Cornejo, E.J.** Clasificación y caracterización de las enzimas amilolíticas de origen bacteriano. *Agroquim. y Tecnol. de los Alim.*, 1988, 28(4): 449-461.
- Badui Dergal, S.** Química de los alimentos. Ed. Alhambra Mexicana. Mexico, 1981.
- Baisier, W.M. and Labuza, T.P.** Maillard browning kinetics in a liquid model system. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40: 707-713.
- Baliga, B. P.; Bayliss, M.E. and Lyman, C. M.** Determination of free lysine -amino groups in cottonseed meals and preliminary studies on relation to protein quality. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 84: 1-6.

Ball, R.O.; Moehn, S. and Bertolo, R.F.P. Next Generation Diet Formulation: true Metabolic Availability of Amino Acids in Diets for Pigs. *Advances in Pork Production* 2004, 15:13

Ballabriga, A. y Carrascosa A. Retraso de crecimiento intrauterino. En: *Nutrición en la infancia y adolescencia*, Ballabriga A. y Carrascosa A. (Eds.), España: Ergón., 1998, 1-32.

Ballabriga, A.; Moya, M.; Martín, E.M.; Dalmau, J.; Doménech, E.; Bueno, M, y Cols. Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. Recomendaciones sobre el uso de fórmulas para el tratamiento y prevención de las reacciones adversas a proteínas de leche de vaca. *An Esp Pediatr.*, 2001, 54: 372-379.

Baptista, J.A.B. and Carvalho, R.C.B. Indirect determination of amadori compounds in milk-based products by HPLC/ELSD/UV as an index of protein determination. *Food Res. Int.*, 2004, 37: 739-747.

Batterham, E.S.; Lowe, R.F.; Darnell, R.E. and Major, E.J. Availability of lysine in meat meal and meat and bone meal and blood meal as determined by the slope-ratio assay with growing pigs, rats and chicks and by chemical techniques. *Br J Nutr.*, 1986, 55: 427-440.

Batterham, E.S.; Murison, R.D. and Lewis, C.E. Availability of lysine in protein concentrates as determined by the slope-ratio assay with growing pigs and rats and by chemical techniques. *Br J Nutr.*, 1979, 41: 383-391.

BeMiller, C. Sweeteners and Syrups. En: *Encyclopedia of food science and technology*, John Wiley & Sons. (Ed.), New York, 1992.

Berg, H.E. and Van Boekel, M.A.J.S. Degradation of lactose during heating of milk. 1. Reaction pathways. *Netherlands milk and Dairy Journal.*, 1994, 48: 157-175.

Bertelli, L.; Torreggiani, D. and Bertolo, G. Nonenzymatic browning in hydrolyzed concentrated cheese whey permeate. *Food Chem.*, 1996, 55: 353-358.

Birlouez-Aragon, F.; Nicolas, M.; Metais, A.; Marchond, N.; Grenier, J. and Calvo, D. A rapid fluorimetric method to estimate the heat treatment of liquid milk. *Int. Dairy J.*, 1998, 8: 771-777.

Birlouez-Aragon, I.; Pischetsrieder, M.; Leclere, J.; Morales, F. J.; Hasenkopf, K.; Kientsch-Engel, R.; Ducauze, C. J. and Rutledge, D. Assessment of protein glycation markers in infant fórmulas. *Food Chem.*, 2004, 87: 253-259.

Birlouez-Aragon, F.; Sabat, P.; Lutz, B.; Leclere, J. and Nicolas, M. Addition of lactose and vitamin C to growth milk reduces the nutritional quality of proteins. *Lait.*, 1999, 79(6): 595-606.

Bjorck, I.; Noguchi, A., Asp, N.-G.; Cheftel, J.C. and Dahlqvist. Protein nutritional value of a biscuit processed by extrusion cooking: effects on available lysine. *J. Agric. Food Chem.*, 1983, 31: 488-493.

Boctor, A. M. and Harper, A. E. Measurement of available lysine in heated and unheated foodstuffs by chemical and biological methods. *J. Nutr.*, 1968, 94: 289-96.

Bohart, G. S. and Carson, J.F. Effects of trace metals, oxygen and light on the glucose-glycine browning reaction. *Nature*, 1955, 175: 470-471.

Bookwalter, G.N. and Kwolek, W.F. Predicting protein quality of corn-soy-milk blends after nonenzymatic browning. *J. Food Sci.*, 1981, 46: 711-715.

Booth, V.H. Problems in the determination of FDNB-available lysine. *J. Sci. Food Agric.*, 1971, 22: 658-66.

Bos C, Gaudichon C, Tomé D. Nutritional and Physiological Criteria in the Assessment of Milk Protein Quality for Humans. *J Amer Coll Nutri.*, 2000, 19:191S-205S.

Bosch, L.; Alegría, A.; Farré, R. and Clemente, G. Fluorescence and color as markers for the Maillard reaction in milk-cereal based infant foods during storage. *Food Chem.*, 2007, 105: 1135-1143.

Braekman, A.; Mortier, L.; Van Renterghem, R.; De Block, J. The influence of batch-pasteurisation on Maillard reaction in sweetened milk products with modified carbohydrate content. *Milchwissenschaft.*, 2001, 56: 3-6.

Brown, D.F.; Senn, V.J.; Dollear, F.G. and Goldblatt, L.A. Comparison of carbonyl compounds in raw and roasted runner peanuts. I. Major qualitative and same quantitative differences. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1973, 50: 16-20.

Brüggemann, J. and Erbersdobler, H. Studies on the analytical and physiological characterization of amino acid injuries in heat treatment of food or animal feed. 1. Introduction and studies on model mixtures. *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelkd.*, 1968, 24: 55-67.

Bujard, E. and Finot, P.A. Measure de la disponibilité et du blocage de la lysine dans les laits industriels. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1978, 32:291-305.

Burton, H. Reviews of the progress of Dairy Science: The bacteriological, chemical, biochemical and physical changes that occur in milk at temperatures of 100-150 °C. *J. Dairy Res.*, 1984, 51: 341-463.

Burton, H.S. and McWeeney. Consideration of sugar stability. *Nature.*, 1963, 197: 266-268.

Burton, H. S., McWeeney, D. J. and Biltcliffe, D. O. Nonenzymic browning. Development of chromophores in the glucose-glycine and sucrose-glycine systems. *J. Food. Sci.*, 1963, 28: 631-639.

Burvall, A.; Asp, N.G.; Bosson, A.; San Jose, C. and Dahlqvist, A. Storage of lactose hydrolysed dried milk, effect of water activity of the protein nutritional value. *J. Dairy Res.*, 1978, 45: 381-389.

- Cardenas, J.** Indicadores de tratamiento térmico en miel y pan. Tesina de Licenciatura, 2001, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
- Cardenas, J.; García-Villanova, B. and Guerra-Hernández, E.** Determination of furosine in honey. *J. Liq Chrom Relat Tech.*, 2003, 26: 317-326.
- Cardenas, J.; Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B.** Furosine is a useful indicator in pre-baked breads. *J. Sci Food Agric.*, 2004, 84: 366-370.
- Carpenter, K.J.** The estimation of the available lysine in animal-protein foods. *Biochem. J.*, 1960, 77: 604-610.
- Carpenter, K.J. and Booth, W.H.** Damage to lysine in food processing: Its measurement and its significance. *Nutr. Abstr. Rev.*, 1973, 43: 424-428.
- Carpenter, K.J. and Ellinger, G.M.** Protein quality and available lysine in animal products. *Poultry Sci.*, 1955, 34: 1451-1452.
- Carson, J.F.** The reaction of fructose with isopropyl-amine and cyclohexylamine. *J Am. Chem. Soc.*, 1955, 77: 1881-1887.
- Carson, J. F. and Olcott, H. S.** Brown condensation products from acetaldehyde and aliphatic amines. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76: 2257-2258.
- Casal, E.; Corzo, N.; Moreno, F. J. and Olano, A.** Glycation of caseinmacropeptide. *Food Chem.*, 2005, 92: 33-36.
- Cerrutti, P.; Resnik, S.L.; Seldes, A. and Fontan, C.F.** Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity. Glucose loss, HMF accumulation and fluorescent development due to non-enzymatic browning. *J. Food Sci.*, 1985, 50: 627-630.
- Charissou, A.; Ait-Ameur, L. and Birlouez-Aragon, I.** Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. *J. Chromatography A.*, 2007, 1140: (1, 2): 189-194.
- Chávez-Servín, J.L.; Castellone A.I. and López-Sabater, M.C.** Evolution of potential and free furfural compounds in milk-based infant formula during storage. *Food Res Int.*, 2006, 39: 536-543.
- Chawla, S.P.; Chander, R. and Sharma, A.** Antioxidant formation by gamma-irradiation of glucose-amino acid model systems. *Food Chem.*, 2007, 103: (4): 1297-1304.
- Cheftel, J.C. and Cheftel, H.** Introducción a la bioquímica de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, 1980, 306-308.
- Chiang, G.H.** High-performance liquid chromatographic determination of ϵ -pyrolysine in processed food. *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36: 506-509.

Chichester, C.O.; Stadman, F.H. and Mackinney, G. Carbon dioxide production in the browning reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 76: 2257-2258.

Chio, K.S. and Tappel, A.L. Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and by malonaldehyde. *Biochemistry.*, 1969, 8: 2827-32.

Chonan, T. Determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural in UHR-sterilized milk by high performance liquid chromatography. *Japanese J. Dairy Food Sci.*, 1986, 35: 1-4.

Chung, S.Y.; Swaisgood, H.E. and Catignani, G.L. Effects of alkali treatment and heat treatment in the presence of fructose on digestibility of food proteins as determined by an immobilized digestive enzyme assay (IDEA). *J. Agric. Food Chem.*, 1986, 34: 579-584.

Cilleruelo-Pascual, M.L y Fernandez-Fernandez, S. Fórmulas especiales. *Rev Pediatr Aten Primaria.*, 2006, 8 Supl 1:S51-67.

Clark, A.V. and Tannenbaum, S.R. Isolation and characterisation of pigments from protein-carbonyl browning systems. Isolation, purification and properties. *J. Agric. Food Chem.*, 1970, 18: 891-894.

Clegg, K. M. Nonenzymic browning in lemon juice. *J. Sci. Food Agric.*, 1964, 15: 878-885.

Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría. Informe técnico sobre la lactancia materna en España. *An Esp Pediatr.*, 1999, 50: 333-340.

Contreras-Calderón, J.; Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B. Indicators of non-enzymatic browning in the evaluation of heat damage of ingredient proteins used in manufactured infant fórmulas. *Eur Food Res Technol.*, 2008, 227: 117-124.

Corradini, C.; Canali, G.; Nicoletti, I.; Biondi, A. and Vinci, G. Characterization of UHT lactose-hydrolyzed milk by innovative analytical methods. *Industria Alimentari.*, 2001, 40(401): 261-266.

Corzo, N.; Delgado, T.; Troyano, E and Olano, A. Ratio of lactulose to furosine as indicator of quality of commercial milks. *J. Food Protect.*, 1994a, 57: 737-739.

Corzo, N.; López-Fandiño, R.; Delgado, T.; Ramos, M. and Olano, A. Changes in furosine and proteins of UHT-treated milks stored at high ambient temperatures. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1994b, 198: 302-306.

Corzo, N.; Villamiel, M.; Arias, M.; Jiménez-Pérez, S. and Morales, F.J. The Maillard reaction during the ripening of manchego cheese. *Food Chem.*, 2000, 71(2): 255-258.

Cuq, J.L.; Provansal, M.; Guilleux, F. and Cheftel, C. Oxidation of methionine residues of casein by hydrogen peroxide. Effects on in vitro digestibility. *J. Food Sci.*, 1973, 38: 11-13.

- Cuzzoni, M.T.; Stoppin, G. and Gazzani, G.** Influence of water activity and reaction temperature of ribose-lysine and glucose-lysine maillard systems on mutagenicity, absorbance and content of furfurals. *Food. Chem. Toxic.*, 1988, 26: 815-822.
- Damico, R.J.** An investigation of N-substituted methionine derivatives for food supplementation. *J. Agric. Food Chem.*, 1975, 23: 30-33.
- Danehy, J. P.** Maillard reactions, nonenzymatic browning in food systems with special reference to the development of flavour. *Adv. Food Res.*, 1986, 30: 77-138.
- Darragh, A.** Protein Effectiveness Index: a new method for expressing the value of dietary protein? 4th International Whey Conference. 2005. Chicago.
- Dauberte, B.; Estienne, J. and Guerra, N.** Formation of hydroxymethylfurfural in beverages based on fruit juices and in Spanish "torrefacto" coffees. *Ann. Fals. Expert. Chim. Toxicol.*, 1990, 83: 231-253.
- Del Castillo, D.; Corzo, N.; Polo, M. C.; Pueyo, E. and Olano, A.** Changes in the amino acid composition of dehydrated orange juice during accelerated nonenzymatic browning. *J. Agric. Food. Chem.*, 1998, 46: 277-280.
- Delgado, T.; Corzo, N.; Santa-Maria, G.; Jimeno, M.L. and Olano, A.** Determination of furosine in milk samples by ion-pair reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia.*, 1992, 33: 374-376.
- Delgado-Andrade, C.; Rufian-Henares, J.A. and Morales F.J.** Fast method to determine furosine in breakfast cereals by capillary zone electrophoresis. *Eur Food Res Technol.*, 2005, 221(5): 707-711.
- Delgado-Andrade, C.; Seiquer, I. and Navarro, M.P.** Copper metabolism in rats fed diets containing Maillard reaction products. *J. Food Sci.*, 2002, 67 (2): 855-860.
- Delgado-Andrade, C.; Seiquer, I. and Navarro, M. P.** Changes in calcium absorption and subsequent tissue distribution induced by Maillard reaction products: in vitro and in vivo assays. *J. Sci Food Agric.*, 2006, 86 (2): 271-278.
- Delgado-Andrade, C.; Seiquer, I. and Navarro, M. P.** Effects of consumption of Maillard reaction products on magnesium digestibility and tissue distribution in rats. *Food Sci. Tech Int.*, 2007a, 13: 109-116.
- Delgado-Andrade, C.; Seiquer, I.; Navarro, M. P. and Morales, F.J.** Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2007b, 51: 341 – 351.
- Dittrich, R.; Hoffmann, I.; Stahl, P.; Mueller, A.; Beckmann, M.W. and Pischetsrieder, M.** Concentrations of N epsilon-carboxymethyllysine in human breast milk, infant formulas, and urine of infants. *J. Agric Food Chem.*, 2006, 54 (18): 6924-6928.
- Dogan, M.; Sienkiewicz, T. and Oral, R.A.** Hydroxymethylfurfural content of some commercial whey protein concentrates. *Milchwissenschaft.*, 2005, 60(3): 309-316.

Donoso, G.; Lewis, O. A. M.; Miller, D. S. and Payne, P. R. Effect of heat treatment on the nutritive value of proteins. Chemical and balance studies. *J. Sci. Food Agric.*, 1962, 13: 192-196.

DRIs. 2002. Dietary reference intakes for Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Protein and Amino Acids (macronutrients). The National Academy of Sciences (USA).

Drusch, S.; Faist, V.; Erbersdobler, H. F. Determination of N-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. *Food Chem.*, 1999, 65: 547-553.

Dunn, J.A.; Ahmed, M.U.; Murtiashaw, M.H.; Richardson, J.M.; Walla, M.D.; Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. Reaction of ascorbate with lysine and protein under autoxidizing conditions: formation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine by reaction between lysine and products of autoxidation of ascorbate. *Biochem.*, 1990, 29: 10964-10970.

Dunn, J.A.; McCance, D.R.; Thorpe, S.R.; Lyons, T.J. and Baynes, J.W. Age-dependent accumulation of N.epsilon.-(carboxymethyl)lysine and N.epsilon.-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochem.*, 1991, 30: 1205-1210.

Dunn, J.A.; Patrick, J.S.; Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. Oxidation of glycated proteins: age-dependent accumulation of N.epsilon.-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochem.*, 1989, 28: 9464-9468.

Dworschak, E. and Örsi, F. Study into the Maillard reaction occurring between methionine and tryptophan on the one hand and glucose on the other. I. Studies in aqueous solutions. *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.*, 1977, 6: 59-71.

Dyer, D.G.; Dunn, J.A.; Thorpe, S.R.; Bailie, K.E.; Lyons, T.J.; McCance, D.R. and Baynes, J.W. Accumulation of maillard reaction-products in skin collagen in diabetes and aging. *J. Clin. Invest.*, 1993, 91(6): 2463-2469.

Eichner, K. and Ciner-Doruk, M. Early indication of the Maillard reaction by analysis of reaction intermediates and volatiles decomposition products. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5: 115-135.

Eichner, K. and Karel, M. The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 1972, 20: 218-223.

Eichner, K. and Wolf W. Maillard reaction products as indicator compounds for optimizing drying and storage conditions. En: *The Maillard reaction in foods and nutrition*, Waller, G.R. and Feather, M.S. (Eds.), American Chemical Society, symposium Series, 215, Washington, D.C., 1983: 313-333.

Einarsson, H.; Eklund, T. and Nes, I.F. Inhibitory mechanisms of Maillard reaction products. *Microbios.*, 1988, 53: 27-36.

El, S.N, and Kavas, A. Available lysine in dried milk after processing. *Int J Food Sci Nutr.*, 1997, 48: 109-111.

Ellis, G.P. The Maillard Reaction, En M.L. Wolfram (Ed.), *Advances in Carbohydrate Chemistry vol. XIV*. New York: Elsevier Science, 1959.

Erbersdobler, H.F. Über untersuchungen zur intestinalen resorption von epsilon-fructoselysin. *Z. Tierphysiol. Tierernaehr. Futtermittelkd.*, 1971, 28: 171-173.

Erbersdobler, H.F. and Anderson, T.R. Determination of available lysine by various procedures in Maillard-type products. En: The Maillard reaction in foods and nutrition, Waller, G.R. y Feather, M.S. (Eds.), American Chemical Society, Symposium Series, 215, Washingtgon, D.C. (USA), 1983: 419-427.

Erbersdobler, H.F.; Dehn-Müller, B.; Nangpal, A. and Reuter, H. Determination of furosine in heated milk as a mesure of heated intensity during processing. *Dairy Res.*, 1987, 54: 147-151.

Erbersdobler, H.F.; Dümmer, H. and Zucker, H. Analytical and physiological characterization of amino acid damage due to thermal treatment of nutrients and feed. II. Effect of amino acid availability on the free amino acid concentration in portal vein plasma. *Z. Tierphysiol. Tierernaehr. Futtermittelkd.*, 1968, 24: 136-152.

Erbersdobler, H.F.; Gross, A.; Klusman, U. and Schlecht, K. Absortion and metabolism of heated protein-carbohydrate mixtures in humans. En: Absortion and utilization of amino acids, Friedman, M. (Ed.), CRC: Boca Raton, Florida, 1989: 91-120.

Erbersdobler, H.F.; Gunsser, I. and Weber, G. 1970. Citado por O'Brien, J. and Morrisey, P.A., 1989.

Erbersdobler, H.F. and Hupe, A. Determination of lysine damage and calculation of lysine bio-availability in several processed foods. *Zeitschrift für EiErnährungswissenschaft*, 1991, 30: 46-49.

Erbersdobler, H.F.; Lohmann, M. and Buhl, K. Utilization of early Maillard reaction products in humans. En: Nutritional and toxicological consequences of food processing, Friedman, M. (Ed.); Plenum: New York, 1991:363-378.

Erbersdobler, H.F. and Somoza, V. Forty years of furosine—Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2007, 51: 423–430.

Erbersdobler, H.F.; Weber, G. and Gunsser, I. Analytical and physiological characterisation of amino acid damage. IV. Heating of proteins alone. *Z. Tierphysiol. Tierernahr. Futtermittelkd.*, 1972, 29: 325-34.

Erbersdobler, H.F. and Zucker, H. Untersuchungen zum gealt and lysin und verfügbarem lysin in trockenmagermilch. *Milchwis.*, 1966, 21: 564-568.

ESPGAN: Comité de Nutrición. Pautas sobre alimentación infantil. Comentario sobre la composición de las fórmulas de continuación a base de leche de vaca. *Acta Pediatr Scand* 1990; **70**: 250-4. Revisión de la composición de las fórmulas de continuación incorporando las recomendaciones de otros organismos internacionales.

- Espinosa-Mansilla, F.; Salinas, F. and Berzas Nevado, J.** Differential determination of furfural and hydroxymethylfurfural by derivative spectrophotometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1992, 75: 678-684.
- Evangelisti, F.; Calcagno, C.; Nardi, S. and Zunin, P.** Deterioration of protein fraction by Maillard reaction in dietetic milks. *J. Dairy Res.* 1999, 66:237-243.
- Evangelisti, F.; Calcagno, C. and Zunin, P.** Relationship between blocked lysine and carbohydrate composition of infant formulas. *J. Food Sci.*, 1994, 59: 335-337.
- Ferguson, I. S.** Thermal degradation of carbohydrates; a review. *J. Agric. Food Chem.*, 1969, 17: 747-750.
- FAO/WHO.** Food Standard Program Recommended International Standards. 1989. London.
- FAO/WHO Expert Consultation.** Protein Quality Evaluation. Food and Agricultural Organization of the United Nations, FAO Food and Nutrition Paper 51. 1990. Rome.
- FAO/WHO/UNU Expert Consultation.** Energy and Protein Requirements. Technical Report Series 724. World Health Organization. 1985. Geneva.
- FDA.** *Code of federal regulation*, Washington, DC, N°172., 1979, 372.
- Fellows, P.** Tecnología del procesado de alimentos. *Ed. Acribia*, Zaragoza, 1994.
- Fenaille, F.; Campos, E.; Guy, P.A.; Schmitt, C. and Morgan, F.** Monitoring of β -lactoglobulin dry-state glycation using various analytical techniques. *Anal Biochem.*, 2003, 320: 144-148.
- Fenaille, F.; Parisod, V.; Visani, P.; Populaire, S.; Tabet, J.C. and Guy, P.A.** Modifications of milk constituents during processing: a preliminary benchmarking study. *Int Dairy J.*, 2006, 16(7): 728-739.
- Fernández-Artigas, P.; Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B.** Browning indicators in model system and baby cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 1999a, 47: 2872-2878.
- Fernández-Artigas, P.; García-Villanova, B. and Guerra-Hernández, E.** Blockage of available lysine at different stages of infant cereal production. *J. Sci. Food Agric.*, 1999b, 79: 851-854.
- Fernández-Artigas, P.; Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B.** Changes in sugar profile during infant cereal manufacture. *Food Chem.*, 2001, 74: 499-505.
- Fernández-Márquez, M.; Montilla-ómez, J.; Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B.** New spectrophotometric method for measuring hydroxymethylfurfural in powdered milk. *J. of Dairy Research.*, 1992, 59: 225-228.

Fernandez, S.R. and Parsons, C.M. Bioavailability of the digestible lysine and valine in cottoseed meal and soybean meal for chicks. *Poult Sci.*, 1996, 75: 216-223

Ferrer, E. Estudio del valor nutritivo de fórmulas para lactantes. Parámetros indicadores de su alteración. Tesis Doctoral, 2001, Facultad Farmacia, Universidad Valencia.

Ferrer, E.; Alegría, A.; Farré, R.; Abellán, P. and Romero, F. Indicadores del deterioro de la calidad proteica y del valor nutritivo de la leche. *Food Sci. Technol. Int.*, 1999, 5(6): 447-461.

Ferrer, E.; Alegría, A.; Farré, R.; Abellán, P. and Romero, F. Effects of thermal processing and storage on available lysine and furfural compounds contents of infant fórmulas. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48: 1817-1822.

Ferrer, E.; Alegría, A.; Farré, R.; Abellán, P.; and Romero, F. High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant fórmulas changes during heat treatment and storage. *Journal of Chromatography A*. 2002, 947: 85-95.

Ferrer, E.; Alegria, A.; Farré, R.; Abellan, P. and Romero, F. Hig-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant fórmulas during full shelf-life. *Food Chem.*, 2005a, 89: 639-645.

Ferrer, E.; Alegria, A.; Farre, R.; Abellan, P.; Romero, F. and Clemente, G. Evolution of available lysine and furosine contents in milk- based infant fórmulas throughout the shelf-life storage period. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 2003, 83, 465-472.

Ferrer, E.; Alegria, A.; Farré, R.; Clemente, G. and Calvo, C. Fluorescence, browning index, and color in infant fórmulas during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 2005b, 53: 4911-4917.

Ferretti, A. and Flanagan, V. P. The lactose-casein (Maillard) browning system, volatile components. *J. Agric. Food Chem.*, 1971, 19: 245-249.

Ferretti, A. and Flanagan, V. P. Steam volatile constituents of stale nonfant dry milk. The role of the Maillard reaction in staling. *J. Agric. Food Chem.*, 1972, 20: 695-698.

Finot, P.A. Metabolism and physiological effects of Maillard reaction products. En: *The Maillard reaction in food processing human nutrition and physiology*, Finot, P.A.; Aeschbacher, H.U.; Hurrell, R.F. y Liardon, R. (Eds.), Basel, 1990:259-271.

Finot, P.A.; Bricout, J.; Viani, R. and Mauron, J., Identification of a new lysine derivative obtained upon acid hydrolysis of heated milk. *Experientia.*, 1968, 24: 1097-1099.

Finot, P.A.; Deutsh, R. and Bujard, E., The extent of the Maillard reaction during the processing of milk. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5: 345-355.

Finot, P.A. and Furniss, D.E. Metabolic transit and toxicity of Maillard reaction products. En: The Maillard reaction in ageing, diabetes and nutrition. Baynes, J.W.; Monnier, V.M. and Alan R. (Eds.), Inc., New York. 1989: 343-358.

Finot, P.A. and Magnenat, E. Metabolic transit of early and advanced Maillard products. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5: 193-207.

Finot, P.A.; Magnenat, E.; Mottu, F. and Bujard, E. Disponibilit  biologique et transit m tabolique des acides amines modifiés par les traitements technologiques. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1978, 32: 325-338.

Finot, P.A. and Mauron, J. Le blocage de la lysine par la reaction de Maillard. II. Propriété chimiques des dérivés N-(désoxy-1-D-frutosyl-1) et N-(désoxy-1-D-lactulosyl-1) de la lysine. *Helv. Chim. Acta*, 1972, 55: 1153-1164.

Folch, J.; Lees, M. and Stanley, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissue. *J. Biol. chem.*, 1957, 226: 497-509.

Ford, J. E. A microbiological method for assessing the nutritional value of proteins. III. Further studies on the measurement of available amino acids. *Br. J. Nutr.*, 1964, 18: 449-460.

Ford, J.E.; Hurrel, R.F. and Finot, P.A. Storage of milk powders under adverse conditions. I. Losses of lysine and other essential amino acids as determined by chemical and microbiological methods. *Brit. J. Nutr.*, 1983, 49: 343-354.

Ford, J.E. and Salter, D.N. Analysis of enzymatically digested food proteins by sephadex-gel filtration. *Brit. J. Nutr.*, 1966, 20: 843-860.

Frangne, R. and Adrian, J. The Maillard reaction. V. Enzymatic proteolysis of heated foods and significance of results. *Ann-Nutr-Aliment.*, 1967, 21: 163-74.

Francis, F.J. and Clydesdale, F.H. Food calorimetry: Theory and Applications, 1975. Citado por Pagliarini y col., 1990.

Frangne, R. and Adrian, J. The Maillard reaction. VI. Demonstration of a lysine labile fraction in proteins. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1972a, 26: 97-106.

Frangne, R. and Adrian, J. The Maillard reaction. VII. Demonstration of a lysine labile fraction in proteins. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1972b, 26: 107-119.

Freeman, J.B.; Stegink, L.D.; Meyer, P.D.; Fry, L.K. and Den Besten, L. Excessive urinary zinc losses during parenteral alimentation. *J. Surg. Res.*, 1975, 18: 463-469.

Freimuth, U. and Tr ubsbach, A. Ninhydrin-positive substances in the hydrolyzates of protein from the Maillard reactio. *Nahrung.*, 1969, 13: 199-206.

Friedman, M. 1978. Citado por Finot y Col., 1990.

Friedman, M. Nutritional values of protein from different food sources. A review. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44: 6-29.

- Friedman, M.; Diamond, M. J. and Broderick, G. L.** Dimethylourea as a tyrosine reagent and protein protectant against ruminal degradation. *J. Agric. Food Chem.*, 1982, 30: 72-77.
- Friedman, M. and Finot, P. A.** Nutritional improvement of bread with lysine and glutamyllysine: studies in mice. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38: 2011-2020.
- Friedman, L. and Kline, O. L.** Amino acid-sugar reaction. *J. Biol. Chem.*, 1950, 184: 599-606.
- Friedman, M. and Molnar-Perl, I.** Inhibition of browning by sulfur amino acids. 1. Heated amino acid-glucose systems. *J. Agric. Food Chem.*, 1990a, 38: 1642-1647.
- Friedman, M. and Molnar-Perl, I.** Inhibition of browning by sulfur amino acids. 2. Fruit juices and protein-containing foods. *J. Agric. Food Chem.*, 1990b, 38: 1648-1651.
- Fu, M.X.; Requena, J.R.; Jenkins, A.J.; Lyons, T.J.; Baynes, J.W. and Thorpe, S.R.** The advanced glycation end product, Nε-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *Journal of Biological Chemistry.*, 1996, 271: 9982-9986.
- Furniss, D.E.; Hurrell, R.F. and Finot, P.A.** Modification of urinary zinc excretion in the rat associated with the feeding of Maillard reaction products. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 1986, 56:188-190.
- Furniss, D.E.; Vuichoud, J.; Finot, P.A. and Hurrell, R.F.** The effect of Maillard reaction products on zinc metabolism in the rat. *Brit. J. Nutr.* 1989, 62: 739-749.
- García-Villanova, B.; Guerra Hernández, E.; Martínez Gómez, M.E. and Montilla, J.** Liquid chromatography for the determination of 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde in breakfast cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41: 1254-1255.
- García-Onieva, M.** Lactancia artificial: técnica, indicaciones, fórmulas especiales. *Pediatr Integral.*, 2007, 11(4): 318-326.
- Garza, S.; Ibarz, A. and Boix, J.** Modelos cinéticos de degradación de cremogenado de naranja concentrado tratado a elevadas temperaturas. *Alimentaria*, 2001, 319: 111-121.
- Geiger, H. and Klostermeyer, H.** Formation of lactulose during heat treatment of milk. *Milchwissenschaft*, 1983, 38: 475-477.
- Ge pan, G. and Melton, L.D.** Nonenzymatic Browning of Lactose and Caseinate during Dry Heating at Different Relative Humidities. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55: 10036–10042.
- Giangiacommo, R. and Messina, G.** Determinazione oggettiva del colore del latte alimentare mediante colorimetria tristimolo. *Scienza e Tecnica Lattiero-Caesaria.*, 1988, 39: 20-39.

Goldberg, T.; Cai, W.; Peppas, M.; Dardaine, V.; Baliga, B.S.; Uribarri, J. and Vlassara, H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc.*, 2004, 104(8): 1287-1291.

Gomis, D. B.; Alvarez, M. D. G.; Naredo, L. S. and Alonso, J. J. M. High-performance Liquid Chromatographic determination of furfural and hydroxymethylfurfural in apple juice and concentrates. *Chromatographia.*, 1991, 32: 45-48.

Gomyo, T. and Miura, M. Effect of melanoidin on the digestion and absorption of disaccharides in the small intestine of rat. En: Amino-carbonyl Reactions in Food and Biological Systems, Proceedings of the 3rd International Symposium on the Maillard reaction, Susono, Shizuoka, Japan, 1985, Fujimaki, M.; Namiki, M.; Kato, H. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1986:549-558.

González Tello, P.; Camacho, F. and Robles, A. Hidrolizados enzimáticos de cereales. *Alim. Equip. y Tecnol.*, 1989, Mayo-Junio: 201-207.

Goodno, C.C.; Swaisgood, H.E. and Catignani, G.L. A fluorimetric assay for available lysine in proteins. *Anal. Biochem.*, 1981, 115: 203-211.

Gregor, J. L. and Emery, S. M. Mineral metabolism and bone strength of rats fed coffee and decaffeinated coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 1987, 35: 551-556.

Guangyuan, L.; Tung-Hsi, Y. and Chi-Tang, H. Generation of flavour compounds by the reaction of 2-deoxyglucose with selected amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45: 233-236.

Guerra-Hernández, E. and Corzo, N. Furosine determination in baby cereal by Ion-Pair Reversed Phase Liquid Chromatography. *Cereal Chem.*, 1996, 73: 729-731.

Guerra-Hernández, E.; Corzo, N. and García-Villanova, B. Maillard reaction by furosine determination during infant cereal processing. *J. Cereal Sci.*, 1999, 29: 171-176.

Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. and Montilla Gomez, J. Determination of hydroxymethylfurfural in baby cereals by high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chrom.*, 1992, 15: 2551-2559.

Guerra-Hernández, E.; Leon, C.; García-Villanova, B.; Corzo, N. and Romera, J.M. Effect of storage on non-enzymatic browning of liquid infant milk formulae. *J. Sci. Food Agric.* 2002a, 82: 587-592.

Guerra-Hernández, E.; Leon, C.; García-Villanova, B.; Corzo, N. and Romera, J.M. Chemical changes in powdered infant formulas during storage. *Int. J. Dairy Technol.*, 2002b, 55: 234-239.

Guerra-Hernández, E.; Ramírez-Jiménez, A. and García-Villanova, B. Glucosylisomaltol, a new indicator of browning reaction in baby cereals and bread. *J. Agric. Food Chem.*, 2002c, 50: 7282-7287

- Hackler, L.R. and Stillings, B.R.** Aminoacid composition of heated-processed soy-milk and its correlation with nutritive value. *Cereal Chem.*, 1967, 44: 70-77.
- Harris, C.H. and Johnson, J.M.** Monitoring nonenzymatic browning in cakes prepared with high fructose corn syrup by high performance liquid chromatography. *J. Food Quality.*, 1987, 10: 417-424.
- Hashiba, H.** Oxidative Browning of Amadori compounds-color formation by iron with Maillard reaction products: 155-164. En: Amino-carbonyl Reactions in Food and Biological Systems, Proceedings of the 3 rd International symposium on the Maillard reaction, Susono, Shizuoka, (Japan), 1985, Fujimaki, M., Namiki, M. and Kato, H. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1986: 588.
- Hashiba, H.; Okuhara, A. and Iguchi, N.** Oxygen-dependent browning of soy sauce and some brewed products. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5: 93-97.
- Hayase, F.; Sato, M.; Tsuchida, H. and Kato, H.** Volatile components formed by thermal degradation of non dialyzable melanoidin prepared from a sugar-butylamine reaction system. *Agric. Biol. Chem.*, 1982, 46: 2987-2996.
- Hayat, L., Al-Sughayer, M. and Afzal, M.** A comparative study of fatty acids in human breast milk and breast milk substitutes in Kuwait. *Nutricional Research.*, 19: 827-841.
- Hegele, J.; Buetler, T. and Delatour, T.** Comparative LC-MS/MS profiling of free and protein-bound early and advanced glycation-induced lysine modifications in dairy products. *Anal Chim Acta.*, 2008, 617: 85-96.
- Henle, T. and Klostermeyer, H.E.** Determination of protein-bound 2-amino-6-(2-formyl-1-pyrrolyl) hexanoic acid (pyrralyne) by ion exchange chromatography and photodiode array detection. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1993, 196: 1-4.
- Henle, T.; Walter, H. and Klostermeyer, H.** Evaluation of the extent of the early Maillard reaction in milk products by direct measurement of the Amadori product lactuloselysine. *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 1991a, 193: 119-122.
- Henle, T.; Walter, H.; Krause, I. and Klostermeyer, H.** Efficient determination of individual Maillard compounds in heat-treated milk products by amino acid analysis. *Int. Dairy J.*, 1991b, 188: 125-135.
- Henry, K.M.; Kon, S.K.; Lea, C.H. and White, J.C.D.** Deterioration on storage of dried skim milk. *J. Dairy Sci.*, 1948, 15: 292-363.
- Hermosin, J.; Ledl, F. and Gómez-Sánchez. A.** Influence of oxidized lipids on the non-enzymatic browning reaction: interaction between linolenic acid and an Amadori compound. *Chem. Phys. Lipids.*, 1992, 63: 265-270.
- Heyns, K.; Henkeshoven, J. and Brose, K.H.** Degradation of fructose amino acids to N-(2-Furomethyl) amino acids. Intermediates in browning reactions. *Ang. Chem. Internat.*, 1968, 7: 628-629.

Hidalgo, A.; Rossi, M. and Pompei, C. Furosine as a freshness parameter of shell egg. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43: 1673-1677.

Hidalgo, F.J. and Zamora, R. Non-enzymatic browning and fluorescence development in a (E)-4,5-epoxy-(E)-2-heptenal/lysine model system. *J. Food Sci.*, 1993, 58: 667-670.

Hodge, J.E., Dehydrated foods. Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 1953, 1: 928-943.

Hodge, J.E. and Rist, C.E. The Amadori rearrangement under new conditions and its significances for non-enzymatic browning reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75: 316-322.

Holsinger, V.H. and Posati, L.P. Chemical estimation of available lysine in dehydrated dairy products: 479. En: Protein nutritional quality of foods and feeds, part I. Assay methods biological, biochemical, and chemical, Friedman, M. (Ed.), Marcel Dekker, New York, 1975: 626-635.

Homma, S.; Aida, K. and Fujimaki, M. Chelation of metal with brown pigments in coffee. En: Amino-carbonyl Reactions in Food and Biological Systems, Proceedings of the 3rd International Symposium on the Maillard reaction, Susono, Shizuoka (Japan), Fujimaki, M.; Namiki, M.; Kato, H. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1986: 165-172.

Host, A.; Koletzko.; Dreborg, S.; Muraro, A.; Wahn, V.; Agget, P. et al. Joint Statement of the European Society for Paediatric Allergology and Clinical Immunology (ESPACI) Committee on Hypoallergenic Formulas and the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. Dietary products used in infants for treatment and prevention of food allergy. *Arch Dis Child.*, 1999, 81: 80-84.

Hrdlicka, J. changes during thermal and hydrothermal reactions XX. The effect of heavy metals on the course of nonenzymatic browning. *Sh. Vys. Sk. Chem. Technol.*, 1975, 65: E48.

Hurrell, R.F. Influence of the Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology. Ed. Finot, P.A.; Aeschbacher, H.U.; Hurrell, R.F. y Liardon, R. Advances in life science, Birkhäuser, Verlag, Switzerland, 1990, pp: 245-258.

Hurrell, R.F. and Carpenter, K.J. Mechanisms of heat damage in proteins. IV. The reactive lysine content of heat-damaged material as measured in different ways. *Brit. J. Nutr.*, 1974, 32: 589-604.

Hurrell, R.F. and Carpenter, K.J. The use of three dye-binding procedures for the assessment of heat damage to food proteins. *Brit. J. Nutr.*, 1975, 33: 101-115.

Hurrell, R.F. and Carpenter, K.J. The estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reactions. En: Maillard reactions in food. Chemical and technological aspects, Eriksson, K. (Ed.), Prog. Food Nutr. Sci., 1981, 5: 501-508.

Hurrell, R. F.; Lerman, P. and Carpenter, K. J. Reactive lysine in foodstuffs as measured by a rapid dye-binding procedure. *J. Food Sci.*, 1979, 44: 1221-1227.

Huyghues-Despointes, A. and Yaylayan, V.A. Kinetic análisis of formation and degradation of 1-morpholino-1-deoxy-D-fructose. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44:1464-1469.

International Commission on Illumination CIE. Colorimetry, second ed., Publication CIE no. 15.2, Central Bureau of the CIE, Vienna., 1986.

Isbell, H.S. and Frush, H.L. Mutarotation, hydrolysis and rearrangement reactions of glycosylamines. *J. Org. Chem.*, 1958, 23: 1309-1319.

Ishii, K.; Sakurai, H. and Matsubara, Y. Characteristics of Brown pigment formed by the reaction of dehydroascorbic acid with adenine. En: Amino-carbonyl Reactions in Food and Biological Systems, Proceedings of the 3rd International Symposium on the Maillard reaction, Susono, Shizuoka (Japan), 1985, Fujimaki, M.; Namiki, M.; Kato, H. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1986: 207-213.

Izzo, H. V.; Ho and C. T. Effect of residual amide content on aroma generation and browning in heated gluten-glucose model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41: 2634-2637.

Jayaprakasha, H.M. and Yoon, Y.C. Characterization of physicochemical and functional behavior of enzymatically modified spray dried whey protein concentrate. *Milchwissenschaft.*, 2005, 60(3): 305-309.

Jeuring, H.P. and Koppers, F.J.E.M. High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey. *J. Assoc. Of. Anal. Chem.*, 1980, 63: 1215-1218.

Jiménez, M.; Mateo, J.J.; Huerta, T. and Mateo, R. Influence of the storage conditions on physicochemical and mycological parameters of honey. *J. Sci. Food Agric.*, 1994, 64: 67-74.

Jiménez, R. Lactancia materna. En: Tratado de Nutrición Pediátrica, Tojo R. (Ed), Doyma, Barcelona, 2001: 377-386.

Johnson, P.E.; Lykken, G.; Mahalko, J.; Milne, D.; Inman, L.; Sandstead, H.H.; García, W.J. and Inglett, G.E. The effect of browned and unbrowned corn products on absorption of zinc, iron and copper in humans. En: The Maillard reaction in foods and nutrition, Waller, G.R; Feather, M.S. (Eds.), American Chemical Society, Symposium Series 215, American Chemical Society, Washington D.C., 1983:349-360.

Jokinen, J.E.; Reineccius, G.A. and Thompson, D.R. Losses in available lysine during thermal processing of soy protein model system. *J. Food Sci.*, 1976, 41: 816-819.

Ju-Woon, L.; Sang-Hee, O.; Jae-Hun K.; Eui-Hong, B.; Mee-Ree, K.; Kwan-Soo, K.; Hyeon-Ja, L. and Myung-Woo, B. The non-enzymatic browning reaction occurred by gamma irradiation in sugar-lysine aqueous model solution. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, 2006, 35 (5): 583-587.

Kakade, M.L. and Evans, R. J. Chemical and enzymatic determinations of available lysine in raw and heated navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *Can. J. Biochem.*, 1966, 44: 648-50.

Kakade, M.L. and Liener, Y.E. Determination of available lysine in proteins. *Anal. Biochem.*, 1969, 27: 273-280.

Kanjahn, D.; Jarms, U. and Maier, H. G. Hydroxymethylfurfural and furfural in coffee and related beverages. 1. Evaluation of the method. *Deutsche Lebensmittel Rundschau.*, 1996, 92: 328-331.

Kanjahn, D. and Maier, H. G. Hydroxymethylfurfural and furfural in coffee and related beverages. 2. Coffee. *Deutsche Lebensmittel Rundschau.*, 1997a, 93: 44-46.

Kanjahn, D. and Maier, H. G. Hydroxymethylfurfural and furfural in coffee and related beverages. 3. Coffee related beverages. *Deutsche Lebensmittel Rundschau.*, 1997b, 93: 110-112.

Kato, H.; Nakayama, T.; Sugimoto, S. and Hayase, F. Volatile and nonvolatile Maillard reaction products between L-lysine and D-glucose. *Agric. Biol. Chem.*, 1982, 46: 2599-2600.

Kato, Y.; Matsuda, T.; Kato, N. and Nakamura, R. Maillard reaction of disaccharides with protein: suppressive effect of non-reducing and pyranoside groups on browning and protein polymerization. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37: 1077-1081.

Kato, Y.; Watanabe, K. and Sato, Y. Effect of some metals on the Maillard reaction of ovoalbumin. *J. Agric. Food Chem.*, 1981, 29: 540-543.

Keeney, M. and Bassette, R. Detection of intermediate compounds in the early stages of browning reaction in milk products. *J. Dairy Sci.*, 1959, 42: 945-960.

Kessler, H.G. and Fink, R. Changes in heated and stored milk an interpretation by reaction kinetics. *J. Food Sci.*, 1986, 51(5): 1105-1111.

Knipfel, J.E.; Botting, H.C. and McLaughlan, J.M. Nutritional quality of several proteins as affected by heating in the presence of carbohydrates: 375. En: Protein Nutritional quality of foods and feeds, Friedman, M. (Ed), New York (USA), 1975: 674.

Koletzko, B.; Baker, S.; Cleghorn, G.; Fagundes Neto, U.; Gopalan, S.; Hernell, O.; Seng Hock, Q.; Jirapinyo, P.; Lonnerdal, B.; Pencharz, P.; Pzyrembel, H.; Ramirez-Mayans, J.; Shamir, R.; Turck, D.; Yamashiro, Y. and Zong-Yi, D. Global Standard for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. *J. Pediatr Gastroentero Nutr.*, 2005, 41: 584-599.

Koletzko, B.; Rodriguez-Palmero, M.; Demmelmair, H. et al. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Dev* 2001; 65: S3-S18.

Konieczko, M. and Reuter, H. Bildung von gesamt Hydroxymethylfurfural während der ultrahocherhitzung von volmilch. *Milchwis.*, 1986, 48: 149-152.

- Kraft, R.A. and Morgan, A. F.** The effect of heat treatment on the nutritive value of milk proteins. IV. The biological value of unheated and autoclaved dried skim milk. *J. Nutr.*, 1952, 45: 567-581.
- Kramhöller, B.; Ledl, F.; Lerche, H. and Severin, T.** HPLC separation of some characteristic components in reactions mixtures of disaccharides with amines model system for milk and cereal products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1992, 194: 431-433.
- Labuza, T.P.; Tannenbaum, S.R. and Karel, M.** Water content and stability of low-moisture and intermediate-moisture foods. *Food Technol.*, 1970, 24: 543-550.
- Leclere, J. and Birlouez-Aragon, I.** The fluorescence of Maillard products is a good indicator of lysine damage during the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49(10):4682-4687.
- Lee, H.S.** Antioxidative activity of browning reaction products isolated from storage-aged orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40: 550-552.
- Lee, H.S. and Nagy, S.** Quality changes and nonenzymatic browning intermediates in grapefruit juice during storage. *J. Food Sci.* 1988, 53: 168-172.
- Lee, H.S.; Rouseff, R.L. and Nagy, S.** HPLC determination of furfural and 5-HMF in citrus juice. *J. Food Sci.*, 1986, 51: 1075-1079.
- Lee, T.C.; Pintauro, S.M. and Chichester, C.O.** Nutritional and toxicological effects of nonenzymatic Maillard Browning. *Diabetes.*, 1982, 31: 37-46.
- Ledl, F. and Schleicher, E.** New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1990, 29: 565-594.
- Liardon, R.; Weck-Gaudard, D.; Philipposian.; and Finot, P.A.** Identification of Nε-Carboxymethyllysine: A New Maillard Reaction Product, in Rat Urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 1987, 35: 427-431.
- Linden, G. and Lorient, D.** Bioquímica agroindustrial. *Editorial Acribia*, Zaragoza, 2^a ed., 1994: 119-298.
- Lo Coco, E. and Novelli, V.** HPLC determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in fruit juice. *J. Chrom. Sci.*, 1997, 35: 578-583.
- Lo Coco, F.; Clemente, V.; Novelli, V. and Ceccon, L.** Liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in beer. *Analytica Chimica Acta.*, 1995, 36: 57-64.
- Lo Coco, F.; Valentini, C.; Novelli, V. and Ceccon, L.** High-performance Liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in honey. *J. Liquid Chromatogr. A.*, 1996, 749(1-2): 95-100.
- López-Fandiño, R.; Corzo, N.; Villamiel, M.; Delgado, T.; Olano, A. and Ramos, M.** Assessment of quality of commercial UHT milks by chromatographic and electrophoretic methods. *J. Food Prot.*, 1993, 56: 263-269.

- Loscher, J.; Kroh, L.; Westphal, G. and Vogel, J.** L-ascorbic acid as carbonyl component of nonenzymatic browning reactions. 2. amino-carbonyl reactions of ascorbic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1991, 192: 323-327.
- Lumpkins, B.S. and Batal, A.B.** The bioavailability of lysine and phosphorus in distillers dried grains with solubles. *Poult Sci.*, 2005, 84: 581-586.
- Mabrouk, A.F.** Flavour of browning reaction products (foods), American Chemical Society, Symposium series American Chemical Society, Washintong, 1979, 115: 206-245.
- Madrid-Vicente, A.; Cenzano-Del Castillo, I. y Madrid-Cenzano, J.** Manual de aceites y grasas comestibles, AMV Ediciones, Mundiprensa, Madrid, 1997, 81-113.
- Mahaut, M.; Jeantet, R.; Brulé, G. and Schuck, P.** Productos lácteos industriales. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, 2004.
- Maillard, L.C.** Action des acides amines sur les sucres, formation des melanoidines par voie methodique. *C. R. Acad. Sci.*, 1912, 154: 66-68.
- Makita, Z.; Radoff, S.; Rayfield, E.J.; Yang, Z.; Skolnik, E.; Delaney, V, Friedman, E.A.; Cerami, A. and Vlassara, H.** Advanced glycosylation end-products in patients with diabetic nephropathy. *N. Engl. J. Med.*, 1991, 325(12): 836-842
- Maldonado-Lozano, J. and Gil-Campos, M.** Nutricion del lactante. En: Tratado de Nutrición. Gil-Hernandez, A. (Ed.), Accion Medica, España. 2005, Tomo 3, Capitulo 3.9, 274-298.
- Malec, L.S.; Pereyra, A. S.; Naranjo, G.B. and Vigo, M.S.** Influence of water activity and storage temperature on lysine availability of a milk like system. *Food Res Int.*, 2002, 35: 849-853.
- Malshet, V. G. and Tappei, A. L.** Fluorescent products of lipid peroxidation. I. Structural requirement for fluorescence in conjugated Schiff bases. *Lipids.*, 1973, 8: 194-198.
- Malcolm, F.; Fuller, M.F. and Tomé, D.** In vivo Determination of Amino Acid Bioavailability in Humans and Model Animals. *J AOAC Int.*, 2005, 88:923-934.
- Marchal, L.M.; Beeftink, H.H. and Tramper, J.** Towards a rational design of commercial maltodextrins. *Trends Fodd Sci. & Technol.*, 1999, 10:345-355.
- Marcy, J.E. and Rouseff, R.L.** HPLC determination of furfural in orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 1984, 32: 979-981.
- Martín-Esteban, M.; Boné-Calvo, J.; Martorell-Aragonés, A.; Nevot-Falcó, S. and Plaza Martín, A.M.** Reacciones adversas a las proteínas de la leche de vaca. Documento de posición de la Sociedad Española de Inmunología Clínica y Alergología Pediátrica. *Pediatrika.* 1998, 18: 319-354.
- Martín, J. and Lozano MJ.** Lactancia materna. *Pediatrika.*, 1999, 1: 14-22.

- Martinez augustin, O. y Martinez de victoria, E.** Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr. Hosp.*, 2006, 21(2): 1-14
- Martínez-Gómez, M.E.; Guerra-Hernández, E.; Montilla-Gómez, J. and Molins-Marin, J.L.** Physicochemical analysis of Spanish commercial Eucalyptus honeys. *J. Apic. Res.*, 1993, 32(3/4): 121-126.
- Martins, S.I.F.S.; Jongen, W.M.F. and Boekel, M.A.J.S.** 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling. *Trends Food Sci. Technol.*, 2001, 11: 364-373.
- Martysiak-Zurowska, D. and Stolyhwo, A.** Content of furosine in infant formulae and follow-on formulae. *Pol J Food Nutr Sci.*, 2007, 57: 185-190.
- Mateo, R. and Bosch-Reig, F.** Sugar profiles of Spanish unifloral honeys. *Food Chem.*, 1997, 60(1): 33-41.
- Mauron, J.** The Maillard reaction in food, a critical review from the nutritional standpoint. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5: 5-35.
- Mauron, J. and Bujard, E.** Guanidation, an alternative approach to the determination of available lysine in foods. En Nutrition. Proc. 6th Int. Congr., Edinburgh, 1963, Mills, C.F. y Passmore, R., (Eds.), E. y S. Livingstone Ltd., 1964: 489.
- Mauron, J.; Bujard, E. and Russell, C.** 1955. Citado por Finot y Col., 1990.
- McPherson, J.D.; Shilton, B.H. and Walton, D.** Casein biochemistry. *Biochem. J.*, 1988, 27: 1901-1907.
- McWeeney, D.J.** Sulphur dioxide and the Maillard reaction in foods. En: Maillard reactions in food. Chemical, physiological and technological aspects, Eriksson, C. (Ed.), 1981:395-404.
- Meissner, K. and Erbersdobler, H.F.** Maillard reaction in microwave cooking. Comparison of early Maillard products in conventionally and microwave heated milk. *J. of the Sci. of Food and Agric.*, 1996, 70: 307-310.
- Messia, M.C.; Panfili, G.; Marconi, E.; Cubbad, R. and Acquistucci, R.** Innovative methods for determination of lysine in pasta. *Tecnica Molitori.*, 2001, 58(2): 844-848.
- Mijares, R. M.; Park, G. L.; Nelson, D. B. and McIver, R. C.** HPLC analysis of HMF in orange juice. *J. Food Sci.* 1986, 51: 843-844.
- Miller, E.L.; Carpenter, K.J. and Milner, C.K.** Availability of sulfur amino acids in protein foods. III. Chemical and nutritional changes in heated cod muscle. *Br. J. Nutr.*, 1965, 19: 547-564.
- Milic, B.L. and Piletic, M. V.** The mechanism of pyrrole, pyrazine and pyridine formation in non-enzymic browning reaction. *Food Chem.*, 1984, 13: 165-180.
- Miltz, J.; Raz, I. and Passy, N.** Shelf-life of grapefruit in multilayer plastic trays. *Lebensm.-Wiss. u-Technol.*, 1995, 28: 442-447.

- Moehn, S.; Bertolo, R.F.P.; Pencharz, P.B. and Ball, R.O.** Development of the indicator amino acid oxidation techniques to determine the availability of amino acids from dietary protein in pigs. *J Nutr.*, 2005, 135: 2866-2870.
- Möller, A.B.; Andrews, A.T. and Cheesman, G.C.** Chemical changes in ultra-heat-treated milk during storage. II. Lactuloselysine and fructoselysine formation by the Maillard reaction. *J. Dairy Res.*, 1977a, 44: 267-275.
- Möller, A. B., Andrews, A. T. and Cheesman, G. C.** Chemical changes in ultra-heat-treated milk during storage. III. Method for the estimation of lysine and sugar-lysine derivatives formed by the Maillard reaction. *J. Dairy Res.*, 1977b, 44: 277-281.
- Montgomery, M.W. and Day, E.A.** Aldehyde-amine condensation reactions, a possible fate of carbonyls in foods. *J. Food Sci.*, 1965, 30: 828-832.
- Montilla, A.; Moreno, F.J. and Olano, A.** A reliable gas capillary chromatographic determination of lactulose in dairy samples. *Chromatographia.*, 62 (5, 6): 311-314.
- Morales, F.J. and Arnoldi, A.** Analysis of galactosylisomaltol in milk systems using HPLC. *Food Chem.*, 1999, 67: 185-191.
- Morales, F. J. and Arribas-Lorenzo, G.** The formation of potentially harmful compounds in churros, a Spanish fried-dough pastry, as influenced by deep frying conditions. *Food Chem.*, 2008, 109: 421-425.
- Morales, F.J. and Jiménez-Pérez, S.** HMF formation during heat-treatment of milk-type products as related to milkfat content. *J Food Sci.*, 1999, 64(5): 855-859.
- Morales, F.J. and Jiménez-Pérez, S.** Effect of malondialdehyde on the determination of furosine in milk-based products. *J Agric Food Chem.*, 2000, 48: 680-684.
- Morales, F.J. and Jiménez-Pérez, S.** Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chem.*, 2001, 72(1): 119-125.
- Morales, F.J.; Romero, C. and Jiménez Pérez, S.** An enhanced liquid chromatographic method for 5-hidroxymethylfurfural determination in UHT milk. *Chromatographia*, 1992, 33: 45-47.
- Morales, F.J.; Romero, C. and Jiménez Pérez, S.** New methodologies for kinetic study of 5-hidroxymethyl-furfural formation and reactive lysine blockage in heated treated milk model system. *J. Food Prot.*, 1995, 58:128-133.
- Morales, F.J.; Romero, C. and Jiménez-Pérez, S.** Evaluation of heat-induced changes in Spanish commercial milk: hidroxymethylfurfural and available lysine content. *Int. J. Food Sci. Tecnol.*, 1996a. 31: 411-418.
- Morales, F.J.; Romero, C. and Jiménez-Pérez, S.** Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. *Food Chem.* 1996b, 57(3): 423-428.

- Morales, F.J.; Romero, C. and Jimenez-Perez, S.** Chromatographic determination of bound hydroxymethylfurfural as an index on milk protein glycosylation. *J. Agric. Food Chem.*, 1997a, 45: 1570-1573.
- Morales, F.J.; Romero, C. and Jimenez-Perez, S.** Application of the clarifying reagent index as a heat induced parameter in commercial milk. *J. Food Prot.*, 1997b, 60: 1241-1246.
- Morales, F.J. and Van Boeckel, M.A.J.S.** Formation of lysylpyrraline in heated sugar-casein solutions. *Netherlands Milk & Dairy Journal*, 1996, 50: 347-370.
- Morales, F.J. and Van Boeckel, M.A.J.S.** A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: Fluorescence accumulation. *Int. Dairy J.*, 1997, 7:675-683.
- Morales, F.J. and Van Boeckel, M.A.J.S.** A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: Colour formation. *Int. Dairy J.*, 1998, 8:907-915.
- Morales, V.; Olano, A. and Corzo, N.** Ratio of maltose to maltulose and furosine as quality parameters for infant formula. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52: 6732-6736.
- Morawski, J.; Ivie, K. and Dincer, A.K.** Uses in HPLC in alcoholic beverages and ethanol processing. *Food Technol.*, 1989, 37: 57-60.
- Moreno, F.J.; Olano, A.; Santa-María, G. and Corzo, N.** Determination of maltodextrins in enteral formulas by three different chromatographic methods. *Chromatographia.*, 1999, 50:705-710.
- Morgan, F.; Appolonia, C.; Baechler, R.; Vautaz, G. and Raemy, A.** Lactose crystallization and early Maillard reaction in skim milk powder and whey protein concentrates. *Lait.*, 2005, 85: 315-323.
- Mottu, F. and Mauron, J.** The differential determination of lysine in heated milk. II. Comparison of the in vitro methods with the biological evaluation. *J. Sci. Food Agric.*, 1967, 18: 57-62.
- Moughan, P.J.** Absorption of chemically unmodified lysine from proteins in food that have sustained damage during processing and storage. *J. AOAC Int.*, 88 (3): 949-954. 2005a.
- Moughan, P.J.** Dietary Protein Quality in Humans-An Overview. *J AOAC Int* 2005b; 88: 874-876.
- Moughan, P.J.; Gall, M.P.J. and Rutherford, S.M.** Absorption of lysine and deoxyketolysine in an early Maillard browned casein by the growing pig. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44: 1520-1525.
- Murkovic, M. and Bornik, M.A.** Formation of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) and 5-hydroxymethyl-2-furoic acid during roasting of coffee. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2007, 51: 390 – 394.
- Moye, C.J. and Krzeminski, Z.S.** The formation of 5-hydroxymethylfurfural from hexoses. *Aust. J. Chem.*, 1963, 16: 258-269.

Nafisi, K. and Markakis, P. Inhibition of sugar-amine browning by aspartic and glutamic acids. *J. Agric. Food Chem.*, 1983, 31: 1115-1117.

Nagy, S.; Lee, H.; Russel, L. and Lin, J.C.C. Nonenzymic browning of coercially canned and bottled grapefruit juice. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38: 333-346.

Nagy, S. and Randall, V. Use of furfural content as an index of storage temperature abuse in commercially processed orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 1973, 21: 272-275.

Nakanishi, T. and Itoh, T. Cahnges of milk casein by various treatments. V. Identification of volatile carbonyl compounds from heated casein solution. *Agric. Biol. Chem.*, 1967, 31: 1066-1069.

Nakayama, T.; Hayase, F. and Kato, H. Formation of ϵ -(2-formyl-5-hydroxy-methyl-pyrrol-1-yl)-L-norleucine in the Maillard reaction between D-glucose and lysine. *Agric. Biol. Chem.*, 1980, 44: 1201-1202.

Namiki, M.; Terao, A.; Ueda, S. and Hayasaki, T. Deamination of lysine in protein by reaction with oxidized ascorbic acid or active carbonyl compounds produced by Maillard reaction. En: Amino-carbonyl reactions in food and biological systems, Proceedings of the 3rd International symposium on the Maillard reaction, Susono, Shizuoka (Japan), 1985, Fujimaki, M.; Namiki, M.; Kato, H. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1986:105-114.

Navarro, P.; Aspe, T. and Seiquer, I. Zinc transport in Caco-2 cells and zinc in rats: influence of the heat treatment of a casein-glucose-fructose-mixture. *J Agric Food Chem.*, 2000, 48: 3589-3596.

Navarro, M.P. Impact of Maillard reaction products on mineral bioavailability. En M.P. Vaquero, T. García-Arias, A. Carbajal, F.J. Sánchez- Muniz (Eds.), *Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds. Metabolic and Technological Aspect.* 2003, Kerala, India: Research Signpost.

Nielsen, J.J. and Weidner, K.A colum chromatographic method for the determination of available lysine. *Acta Agric. Scand.*, 1966, 16: 144-146.

Nursten, H.E. Recent developments in studies of the Maillard reaction. *Food Chem.*, 1980, 6: 263-277.

Nursten, H.E. Maillard browning reactions in dried foods. In "Concentration and drying of foods" MacCarthy. (Ed), *Elsevier Applied Science Publishers*, London, 1989. 53-68

Obretenov, T.D.; Argirov, O.K. and Rashkov, I.B. On melanoidin formation with furfural participation, synthesis of melanoidins from furfural and glycine. *J. Food Process. Preserv.*, 1983, 7: 115-126.

O'Brien, J. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard Browning reaction, *Ph. D. thesis*, National University of Ireland, 1988.

O'Brien, J. and Morrissey, P.A. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1989, 28: 211-248.

O'Brien, J.; Morrissey, P.A. and Flynn, A. The effect of Maillard reaction products on mineral homeostasis in the rat. 214. En: Proc. Euro-food tox II, Institute of toxicology. *Swiss Federal Institute of Technology*, Zurich, 1986.

O'Brien, J.; Morrissey, P.A. and Flynn, A. Alterations of Maillard metabolites and secondary pathology in rats fed Maillard reaction products. En: *Maillard reaction ic chemistry, food and health*. Labuza, T.P.; Reineccius, G.A.; Monnier, V.; O'Brien, J. y Baynes, J. (Eds.), 1994, pp: 397-401.

O'Keefe, S.F., Wiley, V. and Gaskins, S. Geometrical isomers of essential fatty acids in liquid infant fórmulas. *Food Research International.*, 1994, 27: 7-13.

Olano, A.; Calvo, M. and Reglero, G. Analysis of free carbohydrates in milk using micropacked columns. *Chromatographia.*, 1986, 21: 538-540.

Ordóñez, J.A.; Cambrero, M.J.; Fernández, L. y García, M.L. Tecnología de los alimentos. Ed. Síntesis, Madrid, 1998, 138-154.

O'Reilly, R. The nature of the chemical grouping is responsible for the colour of the products of the Maillard reaction, Ph.D. Thesis University of Reading, Reading, 1982.

Oste, R.; Bjork, I.; Dahlqvist, A.; Jagerstad, M.; Sjodin, P. and Sjoström, H. Effect of a glucose-lysine reaction mixture on protein and carbohydrate digestion and absorption. En: The Maillard reaction in foods and nutrition, Waller, G.R. y Feather, M.S., (Eds.), American Chemical Society, Symposium Series, 215, Washington D.C., 1983: 405-417.

Oste, R.; Dahlqvist, A.; Sjoström, H.; Noren, O. and Miller, R. Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vitro studies. *J. Agric. Food Chem.*, 1986, 34: 355-358.

Oste, R.; Miller, R.; Sjoström, H. and Noren, O. Effect of Maillard reaction products on protein digestion. Studies on pure compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 1987, 35: 938-942.

Oste, R.; Sjodin, P.; Jagerstad, M.; Bjorck, I. and Dahlqvist, A. Effect of Maillard reaction products on carbohydrate utilization -studies in vitro and in vivo. *Food Chem.*, 1985, 16: 37-47.

Overby, L.R. and Frost, D.V. The effect of heat on the nutritive value of protein hydrolyzates with dextrose. *J. Nutr.*, 1952, 46: 39-550.

Pagliarini, E.; Vernile, M. and Peri, C. Kinetic study on color changes in milk due to heat. *J. Food Sci.*, 1990, 55: 1766-1767.

Pallás-Alonso, C.R y Grupo PREVINFAD. Promoción de la lactancia materna y supervisión de la alimentación del primer año de vida [En línea][Fecha de acceso 7 de agosto de 2003]. URL disponible en http://www.aepap.org/previnfad/Lactancia_rec.htm

- Palombo, R.; Gertler, A. and Saguy, I.** A simplified method for determination of browning in dairy powders. *J. Food Sci.*, 1984, 49: 1609-1613.
- Parsons, C.M.; Zhang, Y. and Araba, M.** Availability of amino acids in high-oil corn. *Poult Sci.*, 1998, 77: 1016-1019.
- Patton, A.R. and Chism, P.** Paper chromatography of browning reaction fluorogens. *Nature.*, 1951, 167: 406.
- Pearce, J.A.** Fluorescence development in egg powder and glucose-glycine mixtures. *Ind. Eng. Chem.*, 1949, 41: 1514-1517.
- Pellegrino, L.; Resmini, P. and Luf, W.** Assesment (indices) of heat treatment of milk. En *Heat-induced changes in milk*, Boletín de la IDF N° 9501, P.F. Fox. (Ed), Bruselas. 1993, 409-447.
- Penndorf, I.; Biedermann, D.; Maurer, S.V. and Henle, T.** Studies on N-terminal glycation of peptides in hypoallergenic infant fórmulas: Quantification of alpha-N-(2-furoylmethyl) amino acids. *J Agric Food Chem.*, 2007, 55(3): 723-727.
- Pereyra Gonzáles, A.S.; Naranjo, G.B.; Malec, L.S. and Vigo, M.S.** Available lysine, protein digestibility and lactulose in comercial infant fórmulas. *Int Dairy J.*, 2003, 13: 95-99.
- Perkins, E.G.; Baker, D.H.; Johnson, G.H. and Makowski, E.** The metabolism of fructose-phenylalanine in the rat. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5: 229-242.
- Peterson, W.R. and Warthesen, J.J.** Total and available lysine determinations using high pressure liquid chromatography. *J. Food Sci.*, 1979, 44:994-997.
- Pigman, W. and Johnson, K. C.** Reaction of carbohydrates with nitrogenous substances. II. The tetraacetates of N-D-glucosylaniline. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75: 3464-3466.
- Pizzano, R.; Nicolai, M. A.; Siciliano, R.; Addeo, F.** Specific detection of the Amadori compounds in milk by using polyclonal antibodies raised against a lactosylated peptide. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46: 5373-5379.
- Pokorny, J.** Browning for lipid-protein interactions. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5: 421-425.
- Porretta, S.** Chromatographic analysis of Maillard reaction products. Review. *J. Chrom.*, 1992, 624: 211-219.
- Porretta, S. and Sandei, L.** Determination of 5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF) in tomato products, proposal of a rapid HPLC method and its comparison with the colorimetric method. *Food Chem.*, 1991, 39: 51-57.
- Porter, W.L.** Discrimination between oxidation and Maillard browning by means of fluorescence in model systems and foods. *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 1987, 64: 664.

Powell, R.C.T. and Spark, A.A. Effect of zirconium and aluminium compounds and pH on the Maillard reaction. *J. Sci. Food Agric.*, 1971, 22: 596-599.

Primo-Yúfera, E. Química de los alimentos. Editorial Síntesis, S.A. España 1998.

Programa de Atención al Niño. Gerencia del Área 9 Atención Primaria. Instituto Madrileño de la Salud., 2002.

Puig, C.; Perez, M.D.; Ros, L.; Sanchez, L. and Calvo, M. Effect of processing on the composition of infant fórmulas. *Milchwissenschaft—Milk Science International.*, 2003, 58(9-10): 476-480.

Rabasseda, J.; Rauret, G. and Galceran, T. Liquid chromatographic determination of available lysine in soybean and fish meal. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1988, 2: 350-353.

Rada-Mendoza, M.; Olano, A. and Villamiel, M. Chemical indicators of heat treatment in fortified and special milks. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53: 2995-2999.

Ramshaw, E.H. and Dunstone, E.A. Flavor of milk protein. *J. Dairy Sci.*, 1969, 36: 203-213.

Ramírez-Jiménez, A. Pardeamiento químico en derivados de cereales: productos panarios y cereales infantiles. Tesis doctoral, *Universidad Granada*, 2001.

Ramírez-Jiménez, A.; García-Villanova, B. and Guerra-Hernández, E. Hydroxymethylfurfural and methylfurfural content of selected bakery products. *Food Res. Int.*, 2000b, 33: 833-838.

Ramírez-Jiménez, A.; García-Villanova, B. and Guerra-Hernández, E. Effect of toasting time on the browning of sliced bread. *J. Sci. Food Agric.*, 2001, 81(5): 513-518.

Ramírez-Jiménez, A.; García-Villanova, B. and Guerra-Hernández, E. Loss of o-phthaldialdehyde reactivity during storage of infant cereals. *Int. J. Food Sci Nutr.* 2004a, 55: 143-148.

Ramírez-Jiménez, A.; García-Villanova, B. and Guerra-Hernández, E. Effect of storage conditions and inclusion of milk on available lysine in infant cereals. *Food Chem.*, 2004c, 85: 239-244.

Ramírez-Jiménez, A.; García-Villanova, B. and Guerra-Hernández, E. Nonenzymatic browning during storage of infant cereals. *Cereal Chem.*, 2004d, 81: 399-403.

Ramírez-Jiménez, A.; Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B. Browning indicators in bread. *J. Agric. Food Chem.*, 2000a, 48: 4176-4181.

Ramírez-Jiménez, A.; Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B. Evolution of non-enzymatic browning during storage of infant rice cereal. *Food Chem.*, 2003, 83: 219-225.

- Ramírez-Jiménez, A.; Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B.** Evaluation of amino group losses for monitoring storage of infant cereals containing milk. *Food Control.*, 2004**b**, 15: 351-354.
- Rampilli, M. and Andreini, R.** Evaluation of colour components in sterilized milk. *Ital. J. Food Sci.*, 1992, 4: 285-291.
- Ramshaw, E. H. and Dunstone, E. A.** Flavor of milk protein. *J. Dairy Sci.*, 1969, 36: 203-213
- Rao, M. N., Sreenivas, H., Swaminathan, M., Carpenter, K. J. and Morgan, C. B.** The nutritionally available lysine and methionine of heated casein-glucose mixtures. *J. Sci. Food Agric.*, 1963, 14: 544-550.
- Real Decreto 867/2008**, de 23 de mayo por el que se aprueba la reglamentación técnica sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación. BOE núm 131: 25121-25137
- Rees, J.A.G. y Bettison, J.** Procesado térmico y envasado de los alimentos. Ed. Acribia, 1994, 65-77.
- Rendleman, J.A.** Carbohydrate-mineral complexes in foods. En: Interactions of Food Components, Birch G.C. and Lindley, M.G., (Eds.), Elsevier, London, 1986:63-83.
- Rendleman, J.A. and Inglett, G.E.** The influence of Cu (II) in the Maillard reaction. *Carbohydr. Res.*, 1990, 201: 311-326.
- Resmini, P. and Pellegrino, L.** Analysis of food heat damage by direct HPLC of furosine. *Int. Chrom. Lab.*, 1991, 6: 7-11.
- Resmini, P. and Pellegrino, L.** Occurrence of protein-bound lysylpyrrolaldehyde in dried pasta. *Cereal Chem.*, 1994, 71: 254-262.
- Resmini, P.; Pellegrino, L. and Battelli, G.** Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Ital. J. Food Sci. Nutr.*, 1990, 3: 173-183.
- Resmini, P., Pellegrino, L., Pagani, M. A. and De Noni, I.** Formation of 2-acetil-3-D-glucopyranosylfuran (glucosylisomaltol) from nonenzymatic browning in pasta drying. *Italian Journal of Food Science.*, 1993, 4: 341-353.
- Reyes, F.G.R., Poocharoen, B. and Wrolstad, R.** Maillard browning reaction of sugar-glycine model systems: Changes in sugar concentration, color and appearance. *J. Food Sci.*, 2002, 47: 1376-1377.
- Rhim, J.W.; Jones, V.A. and Swartzel, K.R.** Kinetic studies in the colour changes of skim milk. *Lebensm. Und Technol.*, 1988, 21: 334-338.
- Richards, E.L.** 1956. Citado por O'Brien, J. y Morrissey, P.A., 1989.
- Riesen, W.H.; Clandinin, D.R.; Elvehjem, C.A. and Cravens, W.W.** Liberation of essential amino acids from raw, properly heated, and overheated soybean-oil meal. *J. Biol. Chem.*, 1947, 167: 143-150.

Risner, C.H.; Kiser, M.J. and Dube, M.F. An aqueous high performance liquid chromatographic procedure for the determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey and other sugar containing materials. *J. Food Sci.*, 2006, 71(3): C179-C184.

Rivero-Urgell, M. Avances en alimentación infantil: nuevos ingredientes nutracéuticos que mejoran las leches para lactantes. *Rev Esp Nutr Comunitaria.*, 2005, 11(4): 182-186.

Rivero-Urgell, M.; Santamaría-Orleans, A. Y Rodríguez-Palermo, M. La importancia de los ingredientes funcionales en las leches y cereales infantiles. *Nutr Hosp.*, 2005, 20(2): 135-146.

Rizzi, G.P. Chemical structure of coloured Maillard reaction products. *Food Rev. Int.*, 1997, 13:1-28.

Roach, A.G.; Sanderson, P. and Williams, D.R. 1967. Citado por Rabasseda y col., 1988.

Rolland, J. Subproductos lácteos. En "Ciencia y tecnología de la leche" Amiot J. (Ed.), Acribia, S.A, Zaragoza. 1991, Capítulo XIII, 371-394.

Roumeu-Nadal, M.; Chávez-Servín, J.L.; Castellote, A.I.; Rivero, M. and López-Sabater, M.C. Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder fórmulas. *Food Chemistry.*, 2007, 100: 756-763.

Rosen, L.; Johnson, K.C. and Pigman, W. Reaction of carbohydrates with nitrogenous substances. II. Factors affecting the darkening of N-D-glucosylaniline. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75: 3464-3464.

Rossi, M. and Pompei, C. Changes in liquid milk-based infant fórmulas during heat treatments. *Ital. J. Food Sci.*, 1991, 1: 39-47.

Rubenthaler, G.; Pomeranz, Y. and Finney, K.F. Effects of sugar and certain free amino acids on bread characteristics. *Cereal Chem.*, 1963, 40: 658-665.

Rufián-Henares, J.A. Pardeamiento químico en fórmulas enterales: indicadores de control de tratamiento térmico. Tesis doctoral, *Universidad de Granada*, 2002.

Rufián-Henares, J.A.; Delgado-Andrade, C. and Morales, F.J. Analysis of head-damage índices in breakfast cereals: Influence of composition. *J. Cereal Sci.*, 2006a, 43: 63-69.

Rufián-Henares, J.A.; Delgado-Andrade, C. and Morales, F.J. Application of a fast high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of furanic compounds and glucosylisomaltol in breakfast cereals. *Journal of AOAC International*. 2006b, 89(1): 161-165.

Rufián-Henares, J.A.; Delgado-Andrade, C. and Morales, F.J. Relevance of glucosylisomaltol and galactosylisomaltol in commercial biscuits. *Eur Food Res Technol.*, 2008, 227:1447-1453.

- Rufián-Henares, J.A.; García-Villanova, B. and Guerra-Hernández, E.** Determination of furfural compounds in enteral formula. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 2001a, 24(19): 3049-3061.
- Rufián-Henares, J.A.; García-Villanova, B. and Guerra-Hernández, E.** Furosine content, loss of o-phthaldialdehyde reactivity, fluorescence and colour in stored enteral formula. *Int. J. Dairy Technol.*, 2002a, 55(3): 121-126.
- Rufián-Henares, J.A.; García-Villanova, B. and Guerra-Hernández, E.** Maillard reaction in enteral formula processing: furosine, loss of o-phthaldialdehyde reactivity and fluorescence. *Food Res. Int.*, 2002b, 35(6): 527-533.
- Rufián, J.A.; Garcia-Villanova, B. and Guerra-hernandez, E.J.** Available lysine and fluorescence in heated milk proteins/dextrinomaltose or lactose solutions. *FoodChem.*, 2006c, 98: 685-692.
- Rufián-Henares, J.A.; Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B.** Evolución de compuestos furánicos durante el procesado y conservación de fórmulas enterales. *Alimentaria.*, 2001b, 308: 23-28.
- Rufián-Henares, J.A.; Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B.** Generation of furosine and color in infant/enteral formula-resembling systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2004a, 52: 5354-5358.
- Rufián-Henares, J.A.; Guerra-Hernández, E. and García-Villanova, B.** Pyrroline content in enteral formula processing and storage and model systems. *Eur Food Res Technol.*, 2004b, 219: 42-47.
- Rutherford, S.M. and Moughan, P.J.** Digestible reactive lysine in selected milk-based products. *J Dairy Sci.*, 2005, 88: 40-48.
- Rutherford, S.M. and Moughan, P.J.** Development of a novel bioassay for determining the available lysine contents of foods and feedstuffs. *Nutr Res Rev.*, 2007, 20(1): 3-16.
- Rutherford, S.M.; Markwick-Rutherford, K.J. and Moughan, P.J.** The digestible reactive lysine content of selected cat foods. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55: 3517-3522.
- Rutherford, S.M.; Moughan, P.J. and Van Osch, L.** Digestible Reactive Lysine in Processed Feedstuffs: Application of a New Bioassay. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45: 1189-1194.
- Rutherford, S.M.; Torbatinejad, N.M. and Moughan, P.J.** Digestible reactive lysine content of selected breakfast cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54: 9453-9457.
- Ruttkat, A. and Erbersdobler, H.F.** Degradation of furosine during heptafluorobutyric anhydride-derivatization for gas-chromatographic determination. *J. Chrom. A.*, 1994, 673: 103-110.
- Sahai, D.; Adhikari, A.K. and Mathur, O.N.** Formation kinetics of total hydroxymethylfurfural during manufacture of khoa. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 1992, 25: 146-149.

Salmarch, M. and Labuza, T.P. Influence of relative humidity on the physicochemical state of lactose in spray-dried sweet whey powder. *J. Food. Sci.* **1980**, 45, 1231-1235.

Sánchez, A.; Scharffenberg, J.A. and Register, U.D. Nutritive value of selected proteins and protein combinations. II Biological value predictability. *Am J Clin Nut.*, 1963, 13:250-253.

Sanz, H.L.; Castillo, M.D.; Corzo, N. and Olano, A. Formativo of Amadori compounds in dehydrated fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49(11): 5228-5231.

Sarriá, B.; Lopez-Fandiño, R. and Vaquero, M.P. Does processing of a powder or in-bottle-sterilized liquid infant formula affect calcium bioavailability? *Nutrition.*, 2001, 17(4): 326-331.

Sarriá, B. and Vaquero, P. Zinc and iron bioavailability in a powder or in-bottle-sterilized infant formula estimated by in vitro and in suckling rats. *J. Nutr. Biochem.*, 2001, 12: 266-273.

Satchithanadam, S., Fritsche, J. and Rader, J.I. Gas chromatographic analysis of infant fórmulas for total fatty acids, including trans fatty acids. *Journal of AOAC International.*, 2002, 85: 86-94.

Schaafsma, G. Nutritional appreciation of proteins. TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, The Netherlands. 1994, 94: 135.

Schaafsma, G. The Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score. *J Nutr.*, 2000, 130: 1865S-1867S.

Schaafsma, G. The Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) -A Concept for Describing Protein Quality in Foods and Food Ingredients: a Critical Review. *JAOAC Int.*, 2005, 88: 988-994.

Shemer, M. and Perkins, E.G. Utilization of heated soybean protein isolate as a dietary source of methionine for rats. *J. Nutr.*, 1974, 104: 1389-1395.

Schnepf, M.I. and Satterlee, L.D. The interaction of iron with proteins and peptides. En: Interaction of food components, Birch, G.G.; Lindley, M.G. (Eds.), Elsevier, London, 1986: 43-55.

Schroeder, L.J.; Iacobellis, M. and Smith, A. H., The influence of water and pH on the reaction between amino compounds and carbohydrates. *J. Biol. Chem.*, 1955, 212: 973-983.

Schmidtsdorff, W. Harina y aceite de pesacado: no solo productos. En: El pescado y los productos derivados de la pesca: Composición, propiedades nutritivas y estabilidad, Ruiter, A. (Ed.), Acribia, Zaragoza., 1999: 371-402.

Schwartz, H.M. and Lea, C.H. The reaction between proteins and reducing sugars in the "dry" state. Relative reactivity of the alfa-amino groups of insulin. *Biochem. J.*, 1952, 50: 713-719.

Seiquer, I.; Delgado-Andrade, C. and Navarro, P. Effects of the heat treatment of casein on Zn transport and uptake by Caco-2 cells. *The Proceedings of the Nutrition Society.*, 2000, 59, 134.

Seiquer, I.; Díaz-Alguacil, J.; Delgado-Andrade, C.; López-Frías, M.; Muñoz Hoyos, A.; Galdó, G. and Navarro, M. P. Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11–14 y¹⁻³. *Am J Clin Nutr.*, 2006, 83: 1082-1088.

Seiquer, I. and Navarro, M.P. Influencia de los productos de la reacción entre lípidos oxidados (4,5 (E)-epoxy-2 (E)-heptenal y 4,5 (E)-epoxy-2 (E)- decenal) y lisina sobre la utilización de zinc y calcio: ensayos en células Caco-2. *Grasas y aceites.*, 2003, 54: 350-357.

Sell, D.R.; Kleinman, N.R. and Monnier, V.M. Longitudinal determination of skin collagen glycation and glycoxidation rates predicts early death in C57BL/6NNIA mice. *FASEB J.*, 2000, 14(1): 145-156.

Serra-Bombehy, J.; Solvia-Torrentó, M. and Montanair-Raich, J. Invertase activity in fresh and processed honey. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, 80: 507-512.

Serra-Majem, L. and Aranceta, J.; on behalf of the SENC Working Group on Nutritional Objectives for the Spanish Population. Nutritional objectives for the Spanish population. Consensus from the Spanish Society of Community Nutrition. *Public Health Nutrition.*, 2001 4(6A): 1409-1413.

Sgarbieri, V.C.; Amaya, J.; Tanaka, M. and Chichester C.O. Nutritional consequences of the Maillard reaction. Aminoacid availability from fructose-leucine and fructose-tryptophan in the rat. *J. Nutr.*, 1973, 103: 657-663.

Sharma, S.K.; Mulvaney, S.J. and Rizvi, S.S. Ingeniería de Alimentos: operaciones unitarias y practicas de laboratorio. Limusa Wiley. 2003: 202-215.

Shemer, M. and Perkins, E.G. Utilization of heated soybean protein isolate as a dietary source of methionine for rats. *J. Nutr.*, 1974, 104: 1389-1395.

Shih-Chuan, L.; Deng-Jye, Y.; Shu-Yi, J.; Chia-Hung, H. and Su-Lin, C. Kinetics of color development, pH decreasing, and anti-oxidative activity reduction of Maillard reaction in galactose/glycine model systems. *Food Chem.*, 2008, 108: 533-541.

Siegl, T.; Schwarzenholz, U. and Henle, T. Irreversible casein oligomerisation and formation of fluorescent crosslink amino acids in dairy products. *Chem. Reac. Food IV.*, 2000, 18: 72-73.

Singh, B.; Dean, G.R. and Cantor, S.M. Role of 5-(hydroxymethyl)-furfural in the discoloration of sugar solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, 70: 517-522.

Soler-Balda, M.C. y San Segundo-Nieto, C. Indicaciones y prescripción de fórmulas especiales. *Bol Pediatr.*, 2006, 46:200-2005.

Song, P.S. and Chichester, C.O. Kinetic behaviour and mechanism of inhibition in the Maillard reaction. IV. Mechanism of the inhibition. *J. Food Sci.*, 1967, 32: 107-115.

Spreer, E. Lactología industrial. Ed. *Acribia*, Zaragoza, 1991: 97-114.

Sri-Sumartini, F. and Kantasubatra, J. Available lisen in infant food after processing. *ASEAN Food J.*, 1993, 8(3): 114-116.

Stadtman, F.H.; Chichester, C.O. and Mackinney, C. Carbon dioxide production in the browning reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74: 3194-3196.

Stegink, L.D.; Freeman, J.B.; Den Besten, L. and Filer, L.J. Maillard reaction products in parenteral nutrition. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5: 265-278.

Stegink, L.D.; Pitkin, R.M.; Reynolds, W.; Filer, L.J.; Boaz, D.P. and Brummel, M.C. Placental transfer of glutamate and its metabolites in the primate. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1975, 122: 70-78.

Stepanenko, B.N. and Serbyuk, O.G. The content of acyclic forms of various sugars in aqueous solutions. *Biokhimiya.*, 1950, 15: 155-164.

Stewart, G.F. and Kline, R.W. Factors influencing rate of deterioration in dried egg albumin. *Ind. Eng. Chem.*, 1948, 40: 916-919.

Su-Lin, Chen.; Shu-Yi, Jin. and Chia-Song, Chen. Relative reactivities of glucose and galactose in browning and pyruvaldehyde formation in sugar/glycine model systems. *Food Chemistry.*, 2005, 92(4): 597-605.

Sullivan, J.F. Control of non-enzymatic browning in the dehydration of fruits and vegetables. En: Maillard reaction in food. Chemical, physiological and technological aspects, *Prog. Food Nutr. Sci.*, Pergamon Press, Oxford, 1981: 377-393.

Sun, J. B.; Severson. R.F. and Kays, S.J. Quantitative technique of measuring volatile components of baked sweet-potatoes. *Hortscience.*, 1993, 28: 1110-1113.

Swaisgood, H.E. and Catignani, G.L. Digestibility of modified milk proteins, nutritional implications. *J. Dairy Sci.*, 1985, 68: 2782-2790.

Szczesna, T. and Rybak-Chmielewska, H. Determination of hydroxymethylfurfural (HMF) in honey by HPLC. *Pszczelnictwo Zeszyty Naukowe.*, 1999, 43(1): 219-225.

Tamayo G, Sáenz A, Hernández Sáez MR, Pedrón C, García Novo MD. Fórmulas infantiles especiales. *An Esp Pediatr.*, 1997, 47: 455- 465.

Tauer, A.; Hasenkopf, K.; Kislinger, T.; Frey, I. and Pischetsrieder, M. Determination of N epsilon-carboxymethyllysine in heated milk products by immunochemical methods. *Eur Food Res Technol.*, 1999, 209(1): 72-76.

Thieme, J.G. La industria del aceite de coco. FAO, 1970. Roma, Italia.

Tirelli, A. Improved method for the determination of furosine in food by capillary electrophoresis. *J. Food. Prot.*, 1998, 61: 1400-1404.

Tomarelli, R.M.; Yuhás, R.J., Fisher, A. and Weaber, J.R. An HPLC method for the determination of reactive (available) lysine in milk and infant fórmulas. *J. Agric. Food Chem.*, 1985, 33: 316-318.

Tressl, R.; Wondrak, G.T. and Garbe, L.A. Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like Maillard polymers. *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 46: 1765-1776.

Troyano, E.; Martínez-Castro, I. and Olano, E. Kinetics of galactose and tagatose formation during heat-treatment of milk. *Food Chem.*, 1992, 45: 41-43.

Tsai, C.H.; Kong, M.S. and Pan, B.S. Water activity and temperature effects on nonenzymic browning of amino acids in dried squid and simulate model system. *J. Food Sci.*, 1991, 56: 665-670.

U.S. Preventive Service Task Force. Guide to Clinical Preventive Services. Baltimore: Williams&Wilkins., 1996.

Vallejo-Cordoba, B.; Mazorra-Manzano, M.A. and Gonzalez-Cordova, A.F. New capillary electrophoresis method for the determination of furosine in dairy products. *J Agric Food Chem.*, 2004, 52 (19): 5787-5790.

Van Barneveld, R.J.; Batterham, E.S. and Norton, B.W. The effect of heat on amino acids for growing pigs. 3. The availability of lysine from heat-treated field peas (*Pisum sativum* cultivar Dundale) determined using the slope ratio assay. *Br J Nutr.*, 1994, 72: 257-275.

Van Boeckel, M.A.J.S. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chem.*, 1998, 62: 403-414.

Van Boeckel, M.A.J.S. and Brands, C.M.J. In the Maillard reaction in foods and medicine (Ed. J. O'Brien, H.E. Nursten, M.J.C. Crabe, J.M. Ames) Royal Soc, Chemistry, Cambridge, 154-159 (1998)

Van Boekel, M.A.J.S. and Zia-Ur-Rehman. Determination of hydroxi-methylfurfural in heated milk by high-performance liquid chromatography. *Milk Dairy J.*, 1987, 41: 297-306.

Van Mil P.J.J.M., and Jans J.A. Storage stability of whole milk powder: effects of process and storage conditions on product properties. *Neth. Milk Dairy J.*, 1991, 45: 145-167.

Varnam A.H., and Sutherland J.P. Leche y productos lácteos. Tecnología, química y microbiología. Acibia, S.A, Zaragoza, 1995: 109-166.

Vigo, M.S.; Malec, L.S.; Gómez, R.G. and Llosa, R.A. Spectrophotometric assay using o-phtalaldehyde for determination of reactive lysine in dairy products. *Food Chem.*, 1992, 44: 363-365.

Villamiel, M.; DelCastillo, M.; Corzo, N. and Olano, A. Presence of furosine in honeys. *J. Sci. Food Agric.*, 2001, 81(8): 790-793.

Vlassara, H. Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes.*, 1997, 46: S19-S25.

- Vlassara, H.; Bucala, R. and Striker, L.** Pathogenic effects of advanced glycosylation - biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab. Invest.*, 1994, 70(2): 138-151.
- Vlassara, H.; Cai, W.J.; Crandall, J.; Goldberg, T.; Oberstein, R.; Dardaine, V.; Peppas, M.; Rayfield, E.J.** Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.*, 2002, 99(24): 15596-15601.
- Vodrazka, Z. and Soucek, J.** Composition of glucose solutions during sterilization in the autoclave. *Biochem. Z.*, 1960, 332: 477-487.
- Volgunov, G.P. and Pokhno, M.T.** Effect of substrate moisture on the formation of melanoidin substances. *Biokhimiya.*, 1950, 15: 67-74.
- Wahl, P.** Products of the decomposition by heat of sugars and their physiological effect on the human organism. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, 1960, 23: 159-177.
- Wang, X. and Parsons, C.M.** Dietary meat and bone meal on a total versus a digestible or bioavailable amino acid basis. *Poult Sci.*, 1998, 77: 1010-1015.
- Wasserman, R.H. and Lengemann, F.W.** Further observations on lactose stimulation of the gastrointestinal absorption of calcium and strontium in the rat. *J. Nutr.*, 1960, 70: 377-384.
- Webb, B.H.** Color development in lactose solutions during heating with special reference to the color of evaporated milk. *J. Dairy Sci.*, 1935, 18: 81-96.
- Wells-Knecht, M.C.; Thorpe, S.R. and Baynes, J.W.** Pathways of Formation of Glycoxidation Products during Glycation of Collagen. *Biochem.*, 1995, 34: 15134-15141.
- Westwood, M.E. and Thornalley, P.J.** Molecular characteristics of methylglyoxal modified bovine and serum albumins. Comparison with glucose-derived advanced glycation end product modified serum albumins. *J. Protein Chem.*, 1995, 14: 359-372.
- Williams, M.A.; Humphreys, R.C. and Reader, H.P.** The analysis of 5-hydroxymethylfurfural in port by high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1983, 34: 57-60.
- Wolff, S.P. and Dean, R.T.** Glucose autoxidation and protein modification - the potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J.*, 1987, 245(1): 243-250.
- Wolf, J.C.; Thompson, D.R. and Reineccius, G.A.** Initial losses of available lysine in model systems. *J. Food Sci.*, 1977, 42: 1540-1544.
- Wolfrom, M.L. and Rooney, C.S.** Chemical interactions of amino compounds and sugars. VIII. Influence of water. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75: 5435-5436.
- Wong, M. and Stanton, D.W.** Nonenzymic browning in kiwifruit juice concentrate systems during storage. *J. Food Sci.*, 1989, 54: 669-675.

Yeo, H. and Shibamoto T. Effects of moisture content on the Maillard browning model system upon microwave irradiation. *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39: 1860-1862.

Yosimura, J.; Funabashi, M. and Simon, H. On the catalysis of the Amadori rearrangement, *Carbohydr. Res.*, 1969, 11: 276-281.

Yurova, E.A. and Denisovich, E.Yu. Lactulose determination by high performance liquid chromatography. *Molochnaya Promyshlennost.*, 2003, 10: 49-50.

Zamora, R.; Hidalgo, F.J. Linoleic acid oxidation in the presence of amino compounds produces pyrroles by carbonyl amine reactions. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1995, 1258: 319-327.

Zhang, Y. and Zhang, Y. Formation and reduction of acrylamide in Maillard Reaction: A review base don the current state of knowledge. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 2007, 47: 521-542.

Difusión de los resultados

Artículos

- José Contreras-Calderón, Eduardo Guerra-Hernández, Belén García-Villanova. Indicators of non-enzymatic browning in the evaluation of heat damage of ingredient proteins used in manufactured infant fórmulas. *Eur Food Res Technol.*, 2008, 227: 117-124.
- José Contreras-Calderón, Eduardo Guerra-Hernández, Belén García-Villanova. Utility of some indicators related to the Maillard browning reaction during processing of infant fórmulas. *Food Chem.*, 2008, DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.11.004, (En prensa).
- José Contreras-Calderón, Eduardo Guerra-Hernández, Belén García-Villanova. Usefulness of Maillard reaction indicators during infant formula storage. *Food Res. Int.* 2008, (en revision).
- José Contreras-Calderón, Eduardo Guerra-Hernández, Belén García-Villanova. Loss of available lysine and evaluation of fatty acids and peroxide value during storage of infant fórmulas. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 2008, (en revision).

Comunicaciones a Congresos

- J. Contreras-Calderón, E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova. Monosaccharides, disaccharides and fatty acids in infant fórmulas. 2ND International EuroFIR Congress. Granada. Septiembre de 2007.
- J. Contreras-Calderón, E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova. Detreminacion N^é Carboximetillisina (CML) en ingredientes proteicos y en el procesado de fórmulas infantiles. IV Congreso de Ingeniería y Tecnología de Alimentos CESIA 2006. Cordoba. Noviembre de 2006.
- J. Contreras-Calderón, E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova. Control de pardeamiento químico en fórmulas infantiles conservadas bajo condiciones aceleradas. IV Congreso de Ingeniería y Tecnología de Alimentos CESIA 2006. Cordoba. Noviembre de 2006.
- J. Contreras-Calderón, E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova. Sintesis y puesta a punto del metodo para detreminacion N^é Carboximetillisina (CML). IV Congreso de Ingeniería y Tecnología de Alimentos CESIA 2006. Cordoba. Noviembre de 2006.
- J. Contreras-Calderón, E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova. Control de daño térmico en ingredientes proteicos. III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2005. Burgos. Mayo de 2005.

- J. Contreras-Calderón, E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova. Indicadores de pardeamiento químico en el procesado de fórmulas infantiles. III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2005. Burgos. Mayo de 2005.
- J. Contreras-Calderón, E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova. Determinación de furosina y lisina útil durante la conservación de fórmulas infantiles. III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2005. Burgos. Mayo de 2005.
- J. Contreras-Calderón, E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova. Pardeamiento Químico en Sistemas Modelo de Fórmulas Para Lactantes. III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2005. Burgos. Mayo de 2005.