

TESIS DOCTORAL

BEATRIZ SARRIA RUIZ

**"EFECTOS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO DE
FÓRMULAS INFANTILES Y LECHE DE VACA SOBRE
LA BIODISPONIBILIDAD MINERAL Y PROTEICA"**



INSTITUTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA

CENTRO MIXTO CSIC-UCM

FACULTAD DE BIOLOGICAS

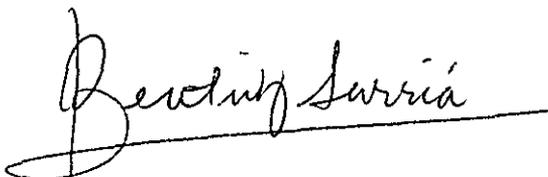
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

MADRID, 1998



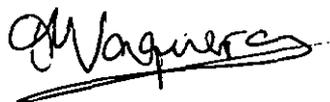
ARCHIVO

**"EFECTOS DEL TRATAMIENTO TERMICO DE LA
LECHE DE VACA Y FORMULAS INFANTILES SOBRE
LA BIODISPONIBILIDAD MINERAL Y PROTEICA"**



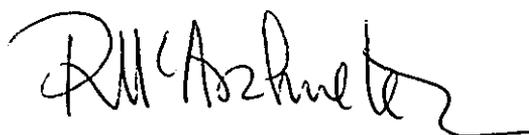
Memoria que presenta la Lda. Beatriz
Sarriá Ruiz para aspirar al Grado de
Doctor en Biología,

Directora:



Fdo.: María del Pilar Vaquero

Vº Bº El Ponente



Fdo.: Rosa María Arahetes
Directora del Departamento de Fisiología Animal

María del Pilar Vaquero Rodrigo, Colaborador Científico del C.S.I.C.,

CERTIFICA: Que los trabajos de investigación objeto de la Memoria de Tesis Doctoral titulada: "EFECTOS DEL TRATAMIENTO TERMICO E LA LECHE DE VACA Y FORMULAS INFANTILES SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD MINERAL Y PROTEICA" han sido realizados bajo su dirección en el Instituto de Nutrición y Bromatología (CSIC-UCM) de Madrid.

Estos trabajos forman parte de los proyectos de Investigación:

"Biodisponibilidad de minerales en función de la grasa dietética" (ALI92-0289-CO2-O2), y

"Efectos nutricionales del enriquecimiento con determinados ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y de distintos tratamientos térmicos industriales de preparados para lactantes" (ALI 96-0465).

Considero que la memoria se ha completado y es adecuada su presentación para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste, firma el presente escrito en Madrid a veintiseis de Febrero de mil novecientos noventa y ocho.

A handwritten signature in black ink, reading "M. P. Vaquero", is written over a horizontal line that extends across the width of the signature.

Indice

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	3
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	9
2.1. Biodisponibilidad	9
2.1.1. Concepto de biodisponibilidad	9
2.1.2. Factores que influyen en la biodisponibilidad mineral	10
2.1.2.1. Factores dietéticos	10
2.1.2.1.1. Nutrientes	10
2.1.2.1.2. No nutrientes	13
2.1.2.2. Factores fisiológicos	14
2.1.3. Técnicas para el estudio de la biodisponibilidad mineral	15
2.1.3.1. Métodos in vitro	15
2.1.3.2. Métodos in vivo	16
2.2. Efectos del tratamiento termico sobre la leche	19
2.2.1. Efectos sobre las proteínas	19
2.2.1.1. Proteínas solubles	20
2.2.1.2. Caseína	22
2.2.2. Efectos sobre la materia grasa	23
2.2.3. Efectos sobre la lactosa	25
2.2.4. Efectos sobre los minerales	27
2.2.5. Efectos sobre las vitaminas	29
2.3. La reacción de Maillard	35
2.3.1. Química de la reacción	37
2.3.2. Factores que influyen en la reacción de Maillard	45
2.3.2.1. Temperatura	46
2.3.2.2. pH	47
2.3.2.3. Actividad de agua	48
2.3.2.4. Sustancias reaccionantes	48

2.3.3. Consecuencias nutritivas y fisiológicas de la reacción de Maillard .	50
2.3.3.1. Consecuencias desfavorables	50
2.3.3.1.1. Pérdida de valor nutritivo	50
2.3.3.1.1.1. Proteína	50
2.3.3.1.1.2. Minerales	54
2.3.3.1.1.3. Vitaminas	58
2.3.3.1.2. Formación de sustancias antinutritivas y tóxicas .	58
2.3.3.1.3. Formación de sustancias mutagénicas	59
2.3.3.2. Consecuencias favorables	60
2.4. Efectos del calentamiento domestico: microondas	63
2.4.1. Efectos nutritivos	65
2.4.1.1. Proteínas	65
2.4.1.2. Hidratos de carbono	67
2.4.1.3. Lípidos	69
2.4.1.4. Minerales	71
2.4.1.5. Vitaminas	72
2.5. Efectos del procesamiento industrial	75
2.5.1. Pasteurización	75
2.5.1.1. Condiciones de la pasteurización. Métodos	75
2.5.1.2. Efectos de la pasteurización sobre el valor nutritivo de la leche	77
2.5.2. Esterilización	79
2.5.2.1. Esterilización en la botella	80
2.5.2.2. Efectos de la esterilización sobre el valor nutritivo de la leche	81
2.5.3. Esterilización a temperatura ultraelevada (UHT)	82
2.5.3.1. Métodos de esterilización UHT	82
2.5.3.2. Efectos de la esterilización UHT sobre el valor nutritivo de la leche	84

2.5.4. Deshidratación	88
2.5.4.1. Procedimientos de deshidratación	88
2.5.4.2. Efectos de la deshidratación de la leche sobre el valor nutritivo de la leche	89
2.6. Fórmulas infantiles para lactantes	93
2.6.1. Tipos de fórmulas y directivas vigentes	93
2.6.2. Composición nutritiva de las fórmulas para lactantes	98
2.6.2.1. Energía	98
2.6.2.2. Proteínas	99
2.6.2.3. Grasa	105
2.6.2.4. Hidratos de carbono	107
2.6.2.5. Minerales	109
2.6.2.6. Vitaminas	116
2.6.3. Formas de presentación y efectos nutritivos de las formas de procesamiento	117
3. MATERIAL Y METODOS	125
3.1. Diseño experimental	125
3.2. Experimento I	126
3.2.1. Muestras utilizadas	126
3.2.2. Realización de los calentamientos	126
3.2.2.1. Calentamiento al baño María	127
3.2.2.2. Calentamiento al microondas	127
3.2.3. Ensayos de digestión <i>in vitro</i>	127
3.2.4. Ensayos <i>in vivo</i>	130
3.2.4.1. Parámetros controlados	131
3.2.4.2. Índices utilizados	132
3.2.4.3. Técnicas analíticas empleadas	133

3.3. Experimento II	135
3.3.1. Muestras utilizadas	135
3.3.2. Realización de los calentamientos	136
3.3.3. Ensayos de digestión <i>in vitro</i>	136
3.3.4. Ensayos de balance con animales	136
3.3.4.1. Parámetros controlados	136
3.3.4.2. Índices utilizados	136
3.3.4.3. Técnicas analíticas empleadas	136
3.4. Experimento III	137
3.4.1. Muestras utilizadas	137
3.4.2. Análisis de indicadores térmicos	137
3.4.2.1. Lactulosa	137
3.4.2.2. Furosina	138
3.4.3. Ensayos de digestión <i>in vitro</i> de las fórmulas	139
3.4.4. Preparación de las dietas	139
3.4.5. Ensayos de balance con animales	146
3.4.5.1. Parámetros controlados	146
3.4.5.2. Índices utilizados	147
3.4.5.3. Técnicas analíticas empleadas	148
3.5. Tratamiento estadístico	148
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	225
4.1. Tablas de resultados	225
4.2. Experimentos I y II	225
4.2.1. Ingesta y evolución ponderal	225
4.2.2. Biodisponibilidad del calcio	227
4.2.2.1. Ensayos <i>in vitro</i>	227
4.2.2.2. Ensayos <i>in vivo</i>	233

4.2.3. Biodisponibilidad del fósforo	237
4.2.3.1. Ensayos in vitro	237
4.2.3.2. Ensayos in vivo	241
4.2.4. Biodisponibilidad del magnesio	243
4.2.4.1. Ensayos in vitro	243
4.2.4.2. Ensayos in vivo	247
4.2.5. Biodisponibilidad del hierro	252
4.2.6.1. Ensayos in vitro	252
4.2.6.2. Ensayos in vivo	257
4.2.6. Biodisponibilidad del zinc	262
4.2.6.1. Ensayos in vitro	262
4.2.6.2. Ensayos in vivo	266
4.2.7. Biodisponibilidad del cobre	270
4.2.7.1. Ensayos in vivo	270
4.3. Experimentos III	274
4.3.1. Evaluación del daño térmico	274
4.3.2. Ingesta y evolución ponderal	283
4.3.3. Biodisponibilidad de nitrógeno	286
4.3. Ensayos in vivo	286
4.3.3. Biodisponibilidad del calcio	288
4.3.3.1. Ensayos in vitro	288
4.3.3.2. Ensayos in vivo	289
4.3.4. Biodisponibilidad del fósforo	293
4.3.4.1. Ensayos in vitro	293
4.3.4.2. Ensayos in vivo	294
4.3.5. Biodisponibilidad del magnesio	298
4.3.5.1. Ensayos in vitro	298
4.3.5.2. Ensayos in vivo	299

Índice

4.3.6. Biodisponibilidad del hierro	302
4.3.6.1. Ensayos in vitro	302
4.3.6.2. Ensayos in vivo	303
4.3.7. Biodisponibilidad del zinc	308
4.3.7.1. Ensayos in vitro	308
4.3.7.2. Ensayos in vivo	309
4.3.8. Biodisponibilidad del cobre	312
4.3.8.1. Ensayos in vivo	312
5. RESUMEN Y CONCLUSIONES	315
6. BIBLIOGRAFIA	321

Objetivos y Plan de trabajo

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La leche humana como modelo para la alimentación del lactante es incuestionable. Sólo cuando ésta no es suficiente o no es posible se emplean fórmulas infantiles. Actualmente el contenido de la mayoría de los nutrientes en las fórmulas infantiles imita con bastante éxito el correspondiente de la leche materna. Sin embargo, la alimentación natural presenta las ventajas, frente a la artificial, de que se encuentra apta para su consumo, a la temperatura adecuada y sin necesidad de higienización, aporta nutrientes de alta biodisponibilidad y también componentes no nutritivos como inmunoglobulinas, lactoferrina, y lisozima, que la convierten en el alimento por excelencia para el recién nacido.

Existen recomendaciones de ámbito nacional, europeo e internacional (Real Decreto 72/1998 de 23 de Enero BOE, 4/2/1998; ESPGAN, 1993; AAP, 1992; FAO/OMS, 1994) sobre la composición en nutrientes de los preparados para lactantes y preparados de continuación, así como sobre determinadas medidas higiénicas, de etiquetado reconstitución, etc. No obstante, en las citadas directrices no se indica de qué modo debe realizarse el calentamiento a la hora de preparar un biberón. Particularmente, no se contempla la posibilidad de emplear un horno microondas. De hecho, se han reseñado casos de quemaduras en el paladar de bebés a los que se les ofreció un biberón cuya tetina había sido introducida en el microondas (Nemethy y Clore, 1990). Esos datos junto con la mayor dificultad para controlar la correcta relación tiempo-potencia y el calentamiento desigual que se obtiene con el horno microondas quizá justifiquen que en ninguna etiqueta de fórmulas infantiles se den instrucciones sobre la preparación del biberón utilizando microondas, incluso cuando si se trata de fórmulas en polvo sólo sería necesario calentar el agua.

A pesar de ello, es patente que los microondas están cada vez más extendidos en los hogares y tienen una gran utilidad en el recalentamiento de platos preparados así como en el calentamiento de líquidos, incluyendo leche de vaca y fórmulas infantiles.

Por otro lado, cabe pensar que los efectos de las microondas sean diferentes en función de las características del alimento que se calienta. Así, pensamos que sería interesante estudiar si su empleo afecta o no a la leche de vaca con mayor o menor contenido graso. Además, en el caso de las fórmulas infantiles líquidas, listas para su consumo, cabría plantearse si el microondas podría afectar la calidad del producto, ya que algunos datos manifestaban la posibilidad de racemización de aminoácidos en determinadas muestras sometidas a tratamientos por microondas (Lubec y col., 1989) y existía un cierto tabú ante este tema.

Pero la influencia del calentamiento doméstico de la leche de vaca y fórmulas infantiles y sus repercusiones nutritivas no son sino efectos añadidos al ya existente por el tratamiento térmico industrial utilizado en la fabricación de dichos alimentos. Así, la leche de vaca se presenta en distintas formas en función de que sea pasteurizada, evaporada, uperizada (UHT), concentrada, etc., y las fórmulas infantiles en España se presentan en forma de polvo, deshidratadas, o líquidas, esterilizadas convencionalmente o por UHT. Los preparados en polvo se distribuyen mayoritariamente en oficinas de farmacia para lactantes de primera y segunda infancia, mientras que los preparados líquidos en general se emplean en hospitales infantiles y neonatología, siendo fundamentalmente los productos líquidos obtenidos por UHT los que se utilizan más en lactantes mayores que comienzan a diversificar su dieta e incluso niños de hasta tres años de edad.

La industria alimentaria conoce desde hace tiempo la existencia de la denominada reacción de Maillard, o pardeamiento no enzimático, que se produce entre azúcares reductores y aminoácidos y consiste en una cadena de reacciones comenzando por el compuesto de Amadori pasando por las prelanoidinas, que son compuestos poliméricos de bajo peso molecular, y por último las melanoidinas, que son insolubles y ciertos compuestos volátiles. Las consecuencias nutritivas más extremas son pérdida del valor nutritivo de la proteína y de algunos metales que se fijan a las melanoidinas y resultan no absorbibles.

Otra reacción que se produce en la leche por efecto del tratamiento térmico es la isomerización de la lactosa, originando lactulosa, que a su vez puede participar en otras reacciones que finalizan también en la formación de polímeros y compuestos volátiles. Sin embargo, los efectos nutritivos de este proceso son menos importantes que los causados por la reacción de Maillard.

Por todo ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Conocer la influencia del tratamiento térmico doméstico, al baño María o por microondas, de leche de vaca entera y descremada, así como de una fórmula infantil, presentada en forma de polvo y líquida, sobre la biodisponibilidad mineral.
2. Establecer si el proceso térmico implicado en la fabricación de preparados para lactantes, deshidratación, esterilización convencional o esterilización UHT, modifican la biodisponibilidad de proteínas y minerales.

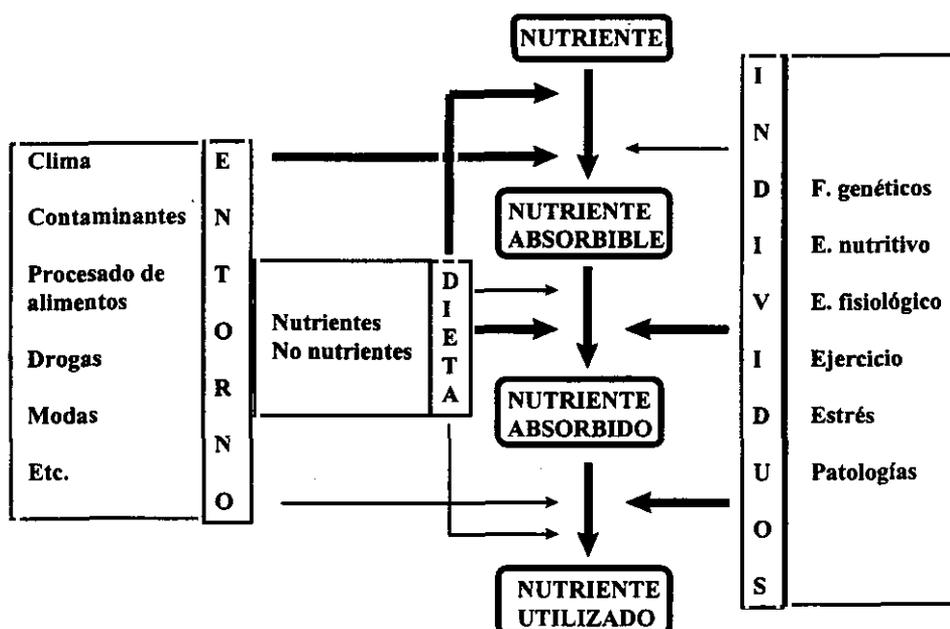
Revisión Bibliográfica

2.1. BIODISPONIBILIDAD

2.1.1. Concepto de biodisponibilidad

La idea de que no basta con ingerir un nutriente sino que éste debe ser capaz de ser utilizado ya se había considerado por diferentes autores, pero es en los últimos diez años cuando el concepto de bio-disponibilidad ha adquirido gran relieve. Actualmente se entiende por biodisponibilidad "la fracción de un nutriente ingerido que se utiliza para funciones metabólicas normales o almacenamiento" (Jackson, 1997), y se aplica fundamentalmente a vitaminas, minerales y aminoácidos. En el congreso "Biodisponibilidad '97" se planteó redefinir el término biodisponibilidad, la propuesta de West fue: "la fracción de cualquier nutriente que se ingiere que potencialmente puede alcanzar sus tejidos diana". Esta definición tiene en cuenta que uno de los determinantes más importantes de la biodisponibilidad es la proporción que se absorbe en el tracto gastrointestinal, es decir, el nutriente ingerido debe transformarse en una forma absorbible y atravesar eficazmente la barrera intestinal. Pero además debe ser transportado a los lugares de acción o a sus reservorios corporales (esquema 1). Este proceso guarda semejanza con la denominada utilización nutritiva que engloba los procesos de absorción y utilización metabólica, como se describe en la metodología del presente trabajo. Sin embargo, el estudio de la biodisponibilidad es más amplio y abarca características físico-químicas del nutriente así como mediciones en tejidos y determinaciones de la función. Además, el concepto de biodisponibilidad también se aplica a medicamentos para los que se utiliza la siguiente definición (Jackson, 1997): "la proporción y magnitud en la cual las sustancias activas o partes terapéuticas de una medicina se absorben y llegan a ser disponibles en los lugares de acción", y para estos principios activos se contempla la serie L.A.D.M.E. (Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción).

En los últimos años se han celebrado diversos congresos internacionales y se han publicado numerosas revisiones sobre la biodisponibilidad mineral, algunas de las cuales señalamos a continuación: Hazell, 1985; Southon et al. (1988); Southgate y col., (1989); Fairweather-Tait (1992); Barbera y Farré (1992); Schlemmer (1993); Jackson et al. (1997).



2.1.2. Factores que influyen en la biodisponibilidad mineral

Como se indica en el esquema 1 existen una serie de factores exógenos, dependientes del entorno, y endógenos, o dependientes del individuo, que modulan la biodisponibilidad mineral. En esta Memoria se dedica un capítulo especial a la influencia del procesado de los alimentos, concretamente el tratamiento térmico de la leche, sobre la biodisponibilidad de los minerales. Entre los factores dependientes del entorno la dieta juega un papel destacado.

2.1.2.1. Factores dietéticos

2.1.2.1.1. Nutrientes

El primer condicionante de su biodisponibilidad va a ser el propio **mineral** que se considera. Tanto su cantidad como la forma química en que se presente serán determinantes de una mayor o menor utilización en el organismo. Por ejemplo, el hierro hemo es mucho más disponible para el hombre que el hierro no hemo, y de este último se absorbe mucho mejor la forma ferrosa (Hallberg, 1981).

La **grasa** dietaria afecta la utilización de los minerales en el organismo y no sólo su cantidad sino también el tipo de ácidos grasos que contenga, como indica en su revisión Pérez-Granados (1997): en general, cierta cantidad de grasa es necesaria para la absorción mineral pero cuando la dieta es francamente hipergrasa puede producirse un efecto inhibitorio que se extiende a todos los nutrientes en el caso de que origine diarrea; por otro lado, los ácidos grasos saturados de cadena larga dificultan la absorción del calcio, que se absorbe mejor con los insaturados o el oleico (C18:1), mientras que el ácido linoleico (C18:2) y en general la grasa poliinsaturada incide negativamente en la biodisponibilidad del hierro (Pérez-Granados y col., 1995) elemento que prefiere la presencia de grasa saturada.

Los **hidratos de carbono** también ejercen un efecto. Uno de los más importantes en relación con nuestro estudio es el aumento de la absorción de calcio por la lactosa, como se pone de manifiesto en la leche materna. La absorción de hierro se ve favorecida por los azúcares: lactosa>sacarosa>fructosa>glucosa, y por el contrario, la presencia de sacarosa o de fructosa disminuye la biodisponibilidad del cobre (Fields, 1988), habiéndose observado que el efecto de esta última es más intenso (Van den Berg y col., 1993)

La **proteína** desempeña una función muy relacionada con la biodisponibilidad mineral. Igual que se ha indicado para la grasa, cierta cantidad de proteína es necesaria para la absorción mineral, pero las dietas hiperproteicas favorecen una mayor excreción de algunos metales, como el calcio (Hegsted y Linkswiler, 1981) y el zinc (Sandstead, 1981). Los productos resultantes de la digestión proteica, péptidos y aminoácidos, pueden unirse a los iones metálicos evitando su precipitación cuando avanzan hacia el yeyuno y el íleon donde el pH va haciéndose menos ácido y la solubilidad de estos elementos disminuye. Se ha comprobado que el mecanismo consiste en la formación de quelatos que pasan intactos la barrera intestinal (Ashmead, 1989). En el caso del hierro se sabe que la carne mejora notablemente su absorción, no sólo porque aporte hierro hémico sino también porque los productos de su digestión son responsables del efecto, el llamado "factor carne" presente en la carne, el pollo y el pescado (Bjorn-Rasmussen y Hallberg, 1979). Aguirre (1995) indica

detalladamente la influencia de las proteínas de origen animal y vegetal sobre la biodisponibilidad de calcio, magnesio, hierro y zinc.

Los macronutrientes influyen en la biodisponibilidad mineral pero también **otros minerales**. Así, las interacciones fósforo-calcio, calcio-hierro y calcio-zinc están bien documentadas. Aunque en condiciones de una ingesta adecuada de estos elementos no se producen alteraciones de la absorción, un exceso de fósforo en la dieta puede impedir la absorción de calcio por formar complejos de fosfato cálcico insolubles (Widdowson y col., 1963) y estimular la liberación de la hormona paratiroidea conduciendo a un hiperparatiroidismo secundario, lo que tiene especial relevancia en lactantes y niños que se encuentran en periodo de crecimiento óseo (Lau, 1986; Fomon, 1995) y en personas de edad más avanzada que están más expuestas a una osteoporosis (Calvo y col., 1993; Van Beresteijn, 1993); la ingesta de calcio se ha relacionado con un estado de hierro deficiente (Dawson-Hughes y col., 1986; Hallberg y col., 1991) y también con la inhibición de la absorción de zinc, por favorecer los complejos insolubles calcio-fibra-zinc (Mills, 1985).

Los elementos traza interaccionan entre sí fundamentalmente porque compiten por mismos lugares de absorción. En este sentido son conocidas las interacciones con el hierro del cobalto, cobre, cadmio, manganeso y plomo (Bremner, 1978; Morris, 1987; Linder, 1988) o las que afectan al zinc (Solomons, 1986; Rogers y col., 1987; Hill, 1988; Flanagan y Valberg, 1988; Yadrick y col., 1989).

Las **vitaminas** que se ingieren modulan la biodisponibilidad de los distintos minerales y elementos traza. Aparte de la relación entre el estado de vitamina D y el metabolismo fosfocálcico, el ácido ascórbico favorece la absorción del hierro no hemo por reducirlo a estado ferroso y a la vez por formar un quelato que es estable en un amplio rango de pH (Hallberg y Rossander, 1984; Herbert, 1987). Sin embargo, esta vitamina disminuye la biodisponibilidad del cobre ya que inhibe su absorción y además estimula su excreción por la bilis (Van den Berg y Beynen, 1992).

2.1.2.1.2. No nutrientes

Quizá la influencia más notable es la de la **fibra** dietaria sobre la absorción mineral. La fibra insoluble tiene la capacidad de captar diferentes metales, particularmente zinc y hierro dificultando su solubilidad y posterior absorción (Hallberg y col., 1989; Brune y col., 1989; Vaquero y col., 1992). La fibra soluble también es capaz de fijar iones metálicos pero, en función del grado en que es degradada en el colon y la capacidad de absorción del mineral en dicho segmento del intestino, las repercusiones serán más o menos importantes (Torre y col., 1991). Los efectos fisiológicos de la fibra: disminución del tiempo de tránsito, dilución del contenido intestinal, irritación de la mucosa, etc, indirectamente pueden contribuir a empeorar la absorción de los minerales.

Determinadas sustancias se encuentran en los alimentos asociadas a la fibra. Entre ellas destacan los **fitatos** cuya acción inhibe el transporte intestinal de calcio, magnesio, y especialmente hierro y zinc (Hazell, 1985; Torre y col., 1991; Aguirre, 1995). El grado de fosforilación de la molécula condiciona la capacidad de fijar iones metálicos. Así, Sandberg y col. (1989) encontraron que el inositol penta- y hexafosfato reducían la solubilidad del hierro pero no los inositoles de menor número de fosfatos.

Los **oxalatos** también causan efectos negativos sobre la absorción de calcio, magnesio y zinc (Kelsay y Prather, 1983). el mecanismo responsable podría ser la formación de complejos fibra-mineral-oxalato que son mucho más difíciles de romper que los de oxalato-mineral y fibra-mineral.

Los efectos de los **compuestos fenólicos** (flavonoides, polifenoles, taninos, etc.) sobre la biodisponibilidad mineral se han estudiado relativamente poco. Se considera en general que los taninos la disminuyen, pero no todos los compuestos fenólicos afectan con la misma intensidad a la absorción de los minerales; Brune y col. (1989) describieron la interacción entre algunos compuestos fenólicos concretos -ácido gálico, ácido tánico, ácido clorogénico- y el hierro. El té y el café son infusiones que se consumen ampliamente en todo el mundo y

que contienen una gran variedad de compuestos fenólicos, algunos de ellos no identificados. El hierro tradicionalmente es el elemento que se ha considerado más afectado por la ingesta de ambas bebidas, en parte porque sobre este elemento se han realizado mayor número de estudios que sobre los demás (Farkas y Le Riche, 1987; Brune y col., 1989; Christian y Seshadri, 1989). Además la influencia negativa que el té ejerce sobre este metal es superior que la del café (Hallberg y Rossander, 1982; Vaquero y col., 1991). Por el contrario, la absorción real de calcio prácticamente no se modifica por la presencia de café, aunque en consumos crónicos tiende a incrementar su excreción por vía urinaria, lo que reduce su retención corporal (Whiting y Whitney, 1987; Vaquero y col., 1993). Sin embargo, respecto al cobre se ha indicado que el té favorece tanto su solubilidad como su absorción y retención hepática (Vaquero y col., 1994)

2.1.2.2. Factores fisiológicos

Los factores intrínsecos determinan que parte de un mineral absorbible es retenido por el organismo y como consecuencia utilizado. Esto está directamente relacionado con su estado nutricional y sus necesidades individuales, patologías, herencia genética... según lo cual la biodisponibilidad no es una propiedad del alimento sino el resultado de su interacción con el individuo. El nacimiento supone un paso brusco de la nutrición parenteral transplacentaria a la alimentación enteral fraccionada e intermitente. Este paso implica la adaptación al metabolismo y nutrición extrauterinos, para lo cual el aparato digestivo debe madurar para que capacite al niño para adaptarse progresivamente a la alimentación variada. El paso a la alimentación oral precisa de la coordinación de todo el tracto gastrointestinal: succión y deglución, vaciamiento gástrico y motilidad intestinal, regulación de la secreción salivar, gástrica, pancreática y hepatobiliar y actividad de las enzimas del enterocito (Martínez, 1993).

El crecimiento es una etapa fisiológica anabólica durante el cual un porcentaje importante de la ingesta energética se dedica a este fin (Fomon y Nelson, 1994). Las eficacias de absorción y utilización de los nutrientes están incrementadas, como también lo están durante la gestación y lactación, aunque en estos dos estadios el reparto de sustratos entre

madre e hijo están condicionados por el estado nutritivo de la madre (Vaquero y Navarro, 1993; Vaquero y Navarro, 1996) .

Bajo condiciones de escasez de nutrientes el organismo incrementa al máximo la biodisponibilidad y a la vez limita considerablemente las pérdidas (Fairweather-Tait y col., 1985).

2.1.3. Métodos para el estudio de la biodisponibilidad mineral

A grandes rasgos pueden dividirse en tres categorías:

- Métodos *in vitro*

- * solubilidad
- * membranas de diálisis
- * intestino aislado
- * cultivos celulares

- Métodos *in vivo*

- * intestino *in situ*
- * perfusión de hígado
- * técnicas de balance
- * técnicas radioactivas

2.1.3.1. Métodos *in vitro*

Originalmente el método de disponibilidad *in vitro* con membrana de diálisis fue descrito por Miller (1981), básicamente se trataba de simular la digestión gástrica e intestinal mediante una incubación con los enzimas pepsina, pancreatina y sales biliares y el digerido gastrointestinal resultante difundía libremente a través de una membrana semipermeable de diálisis con un tamaño de poro similar al del intestino. A su vez de este método existen dos modalidades: método discontinuo y método continuo; en el primero teóricamente se llegaría

a un equilibrio entre los solutos de ambos lados de la membrana de diálisis; en el segundo mediante bombeo se retiran continuamente los productos dializados, lo que pretende acercar el modelo más al proceso digestivo en el que el torrente circulatorio supone una disminución de la concentración de los elementos ya absorbidos en el lado interno de la membrana; no obstante Wolters y col. (1992) demostraron que los resultados obtenidos por ambos métodos son equiparables.

De acuerdo con Schaafsma (1997), el método de digestión *in vitro* es adecuado para estimar cuándo un elemento está disponible para ser absorbido debido a su solubilidad; y a este respecto Hurrell y col. (1988; 1989) matiza que es adecuado para predecir la dirección de la respuesta de absorción pero no la magnitud de dicha respuesta .

Actualmente es de plena actualidad la combinación del sistema de digestión *in vitro* con la absorción a través de líneas de células intestinales (ejem. células Caco-2) (Glahn y col., 1996; Glahn y col., 1997). Este método tiene la ventaja frente al modelo *in vitro* con diálisis de que se mide la fracción de nutriente dializado que es captado por las células, y por otro lado no intervienen factores intrínsecos; es decir puede aplicarse para estudiar la influencia de componentes alimentarios concretos sobre la biodisponibilidad mineral.

2.1.3.2. Métodos *in vivo*

Las **técnicas de balance** se han utilizado tanto en modelos experimentales con animales de laboratorio como en humanos. Estos metodos miden la diferencia entre la ingesta del micronutriente y las pérdidas por vía fecal y urinaria para conocer si existe balance positivo o negativo. Se consideran de gran laboriosidad y con limitaciones en el caso de elementos traza y aquellos cuya secreción endógena es importante Sin embargo, en estudios comparativos entre distintas dietas y en conjunción con datos bioquímicos o de composición corporal siguen siendo utilizados (Pérez-Granados, 1995). Para determinar en humanos qué fracción de las heces corresponde al periodo de balance se utilizan diferentes marcadores fecales (Fairweather-Tait, 1977) aunque en la infancia prácticamente no hay trabajos

publicados y la mayoría se realizaron en prematuros bajo condiciones de hospitalización.

Cuando no se discrimina en el contenido fecal entre la cantidad del elemento proveniente de la dieta y el de las secreciones intestinales (endógeno), se utilizan los parámetros de absorción y retención aparentes, como se describe en la metodología de este trabajo, pero en algunos estudios se determinan esas pérdidas endógenas según diferentes aproximaciones. Para el caso del balance nitrogenado se considera eliminación fecal endógena la de animales alimentados con una "dieta carente de proteínas o que tiene la cantidad estrictamente necesaria de una proteína altamente digerible para prevenir una pérdida excesiva de proteínas corporales.

El problema de la determinación de la absorción y retención real se soslaya con la utilización de marcaje isotópico. Los **isótopos radioactivos** han sido ampliamente utilizados en animales de investigación e incluso en humanos, aunque para determinados grupos de población (lactantes, gestantes, etc.) son inaceptables. Básicamente consiste en añadir el isótopo a la dieta y medir repetidamente la retención corporal total a fin de calcular la absorción real (Sandström, 1997). La retención real se calcula conociendo la retención corporal total en un grupo al que se le administra el isótopo intraparenteralmente (Vaquero, 1994).

Sandström y col (1983) diseñaron un modelo in vivo con ratas lactantes para estudiar la biodisponibilidad de zinc en leche y fórmulas infantiles, que se aplicó posteriormente par otros elementos (Lönnerdal y col., 1985, 1988 y 1993). Utilizaron ratas lactantes de 14 o 16 días a las que se les administraba intragástricamente la muestra marcada con un isótopo radioactivo del elemento a estudiar, posteriormente se sacrificaba a los animales y se determinaba la radioactividad en distintos tejidos del cuerpo. Estos autores establecieron que los resultados obtenidos con este modelo en rata lactante se correspondían bastante bien con los de humanos.

El futuro de estos métodos está encaminado hacia aquellos basados en **isótopos**

estables que ya han sido establecidos como adecuados para valorar la biodisponibilidad mineral, y las técnicas de espectrometría de masas están siendo desarrolladas en este sentido. Dichos métodos están de plena actualidad y su mayor ventaja es que pueden aplicarse a humanos de cualquier edad, siempre y cuando las condiciones de pureza del isótopo estable estén garantizadas (Mellon y Sandström, 1996). No obstante, se les ha atribuido algunos inconvenientes (Sandström y col., 1993; Bioavailability '97, workshops):

- Alto coste
- Equipamiento sofisticado
- En ocasiones la adición del isótopo estable no puede producirse en condiciones traza
- Para algunos elementos no se dispone de isótopo estable.

Este mismo año, Hurrell y col (1998) demostraron que los estudios con fórmulas infantiles pueden realizarse con isótopos estables, y que se obtienen resultados comparables en niños y adultos.

2.2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA LECHE

Introducción

El comportamiento de la leche sometida a calentamiento es función no solamente de la temperatura alcanzada sino también de la duración del calentamiento.

Cuando la leche se calienta tienen lugar una serie de reacciones importantes:

- El pH disminuye como consecuencia de la ruptura de lactosa dando lugar a formas ácidas (Gould, 1948)
- Las caseínas se desfosforilan parcial o totalmente (Belec y Jenness, 1962).
- Las caseínas se disocian de las micelas (Kudo, 1980; Aoki y Kako, 1983; Dalglish y col. 1987)
- Se producen interacciones entre las proteínas séricas y la κ -caseína de la superficie de las micelas (Sawyer, 1969)
- Este conjunto de reacciones pueden afectar al comportamiento del fosfato cálcico micelar y pudiendo precipitar del suero (Dalglish, 1989):

Por lo tanto, el calentamiento de la leche implica numerosas consecuencias, como modificaciones de la estabilidad de la solución coloidal y de la emulsión grasa, del color y sabor, con sus correspondientes repercusiones nutricionales.

2.2.1. Efectos sobre las proteínas

En el caso de la proteína, el procesamiento normalmente incrementa el sabor y el gusto (reacción de pardeamiento) aunque el valor nutritivo disminuye.

Se puede esquematizar el daño proteico debido al procesamiento en los siguientes grupos:

- Reacciones suaves con grupos carbonilo: este primer tipo se produce en condiciones de calentamiento relativamente suaves de alimentos ricos en azúcares reductores, como es el caso

de la leche. Este mecanismo corresponde a la reacción de Maillard o pardeamiento no enzimático. Como consecuencia, el grupo amino, principalmente el de la lisina, queda no disponible.

- Reacciones que se dan en condiciones más severas: se producen por calentamiento más fuerte, tanto en presencia (correspondería a la reacción de Maillard en etapas más avanzadas) o ausencia de azúcares, y se origina una disminución de la digestibilidad y de la disponibilidad en la mayoría de los aminoácidos.
- Reacciones con tratamiento alcalino: cuando la proteína es expuesta a un medio alcalino, se produce la pérdida de cistina y lisina, en primer lugar, con la formación de lisinoalanina.
- Reacciones de oxidación: este grupo comprende una serie de reacciones de oxidación siendo la metionina y la cisteína los aminoácidos más sensibles.

En el caso de la leche es preciso distinguir la acción sobre las proteínas solubles, bastante termoestables, y la acción sobre las caseínas, que son mucho menos alterables por el calor.

2.2.1.1. Efectos sobre las proteínas solubles

Según Scott (1989) las proteínas séricas de la leche son muy termolábiles debido a su bajo contenido en fósforo, prolina (responsable de prevenir la formación de enlaces de hidrógeno en la coagulación) y por el contrario elevado contenido de aminoácidos azufrados.

Estas proteínas se desnaturalizan cuando se someten a temperaturas superiores a 56 °C durante 30 minutos (Larson y Rolleri, 1955), lo cual se traduce por una desestabilización y activación de los grupos sulfidrilo (-SH).

El calentamiento provoca la agitación de las moléculas de proteínas del suero que tienen carácter globular. Esta agitación aumenta con la temperatura y provoca la ruptura de enlaces secundarios que unen las cadenas polipeptídicas produciendo cambios en la estructura nativa. Por tanto, se desenrollan y como consecuencia, los grupos apolares que estaban dirigidos hacia

el interior de la molécula proteica se encuentran en posición externa, mientras que los grupos polares pueden asociarse con la transferencia de agua de la molécula al disolvente. Todos estos fenómenos conducen a una disminución de la solubilidad de la proteína.

La desnaturalización de las proteínas séricas es más importante cuanto más alta sea la temperatura utilizada en el procesamiento industrial como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Desnaturalización de las proteínas solubles de la leche por diversos tratamientos térmicos industriales

Condiciones calentamiento	Procedimiento	% proteínas solubles desnaturalizadas
63°C - 30 min	Pasteurización baja	despreciable
72°C - 15-20 s	Pasteurización HTST	despreciable
80°C - 1 min	-	20%
145°C - 1 a 2 s??	Calentamiento UHT	60%
80°C - 30 min	-	90%
90°C - 5 min	-	100%
115°C - 15 min	Esterilización en autoclave	100%

Tomado del libro de Lactología Técnica, pp 98.

Por otra parte, algunos grupos químicos como los sulfidrilo sufren un desenmascaramiento, con lo que se encuentran disponibles para ciertas reacciones.

La β -lactoglobulina es la proteína soluble mayoritaria, representa el 40-60% de las proteínas del lactosuero y es el origen de fenómenos de gran importancia tecnológica. Relativamente rica en cisteína, es la principal fuente de grupos SH junto con las proteínas de la membrana del glóbulo graso. Estos grupos experimentan una activación lenta a partir de

los 73°C y más rápida a partir de temperaturas superiores. Los grupos SH son muy sensibles al oxígeno. Una leche desprovista de aire es más rica en grupos SH que la misma leche no desaireada. Este fenómeno explica las propiedades antioxidantes de la leche sometida a calentamiento conservada en atmósfera inerte, ya que los grupos sulfidrilo son potentes agentes reductores que rebajan el potencial de óxido-reducción de la leche confiriéndole cierta resistencia a la oxidación (Hutton y Patton, 1952).

Por otro lado, los grupos SH parecen ser responsables, al menos en parte, del aroma a cocido de las leches calentadas. En disolución acuosa a temperatura de ebullición, la cisteína, principal fuente de grupos SH en la β -lactoglobulina, libera sulfuro de hidrógeno (SH_2) volátil. También se piensa que la activación de los grupos SH causa la formación de un complejo entre la β -lactoglobulina y la caseína en la leche calentada. Este fenómeno, observado por primera vez por Tobias (1952) mediante examen electroforético fue confirmado posteriormente por numerosos autores, quienes pusieron de manifiesto la implicación de la caseína κ en la formación de dicho complejo. Dicho complejo goza de propiedades estabilizantes con respecto a las micelas de fosfocaseinato, de forma que al provocar su formación, mediante un recalentamiento apropiado, se refuerza la estabilidad de la leche.

Rose (1962) llegó a la conclusión de que existe una relación entre la formación del complejo β -lactoglobulina-caseína y el pH inicial de la leche.

En lo que respecta a su desnaturalización por los procesamientos térmicos industriales más comunes aplicados a la leche: la inyección directa de vapor provoca una menor desnaturalización que el calentamiento en tubos. Según Dill y col. (1964) se debe a la dilución de la leche por el vapor.

2.2.1.2. Efectos sobre las caseínas

En el rango de temperaturas en que las proteínas séricas se alteran, las caseínas calentadas por separado no muestran ningún signo de desnaturalización. Para poder constatar alguna modificación es necesario calentar a temperaturas muy elevadas, superiores a 120°C

durante 10 minutos. Además, es de destacar que esta modificación no es una desnaturalización sino una hidrólisis; produciéndose la ruptura parcial de las cadenas polipeptídicas con la liberación de nitrógeno no proteico, fósforo y ácido siálico. Según Alais y col. (1966), un calentamiento a 135°C durante una hora produce una desfosforilación completa de las moléculas. La totalidad del fósforo orgánico se encuentra en forma mineral y los enlaces ester, con la serina, son escindidos en su totalidad. El ácido siálico también parece ser liberado en su totalidad. Cerca del 15 al 20% del nitrógeno se encuentra en forma de nitrógeno no proteico. Estas transformaciones suponen una disminución notable de la solubilidad.

Este comportamiento se explica por la estructura de la caseína nativa. Sus componentes no son proteínas globulares como las proteínas del lactosuero, sino que su insolubilidad en el punto isoeléctrico, su sensibilidad a la acción de los electrolitos y su poder rotatorio elevado hacen que sean proteínas cercanas, por su estructura, a las proteínas desnaturalizadas.

Es interesante precisar la estabilidad térmica de las diversas fracciones de la caseína bruta: la α -caseína es más sensible que la β -caseína mientras que la κ -caseína es la más sensible. Para un mismo tratamiento térmico, la proporción de nitrógeno y fósforo liberados son claramente superiores en la caseína κ , pues presenta enlaces frágiles que pueden romperse fácilmente.

En determinadas circunstancias un calentamiento más moderado que el descrito anteriormente puede modificar las caseínas. A partir de 45°C se observa una tendencia a la disociación del complejo entre la caseína α y la caseína κ ya que esta última pierde progresivamente su capacidad para estabilizar la fracción α (Garnier, 1996).

2.2.2. Efectos del calentamiento sobre la materia grasa

La grasa juega un papel muy importante en la aceptabilidad de los alimentos. A diferencia de las proteínas, el procesamiento térmico de la grasa da lugar a la formación de un sabor y olor desagradables, es decir al enranciamiento. Este puede ser debido a cambios hidrolíticos, debidos a la presencia de agua en el alimento, oxidativos por el oxígeno atmosférico o térmicos por la elevada temperatura que se aplica con el procesamiento (Fritch,

1981; Stevenson y col. 1984).

El enranciamiento hidrolítico implica la hidrólisis de la grasa, dando ácidos grasos libres y glicerol. Los triglicéridos formados por ácidos grasos de cadena corta se hidrolizan con más facilidad que los de cadena larga. Posteriormente, los ácidos grasos resultantes de la hidrólisis darán lugar a hidroperóxidos durante las reacciones de oxidación (Pernamyer y col., 1985). Cuando la leche se calienta tiene lugar la formación de lactonas y metilcetonas. A temperaturas elevadas se favorece la producción de lactonas, con su consecuente sabor desagradable. Las metil-cetonas también tienen un efecto negativo sobre el sabor de la leche, y así mismo la formación de este compuesto aumenta con la temperatura: la leche cruda contiene 10 nmol/g grasa, 12 la leche pasteurizada, 21 la leche UHT y 104 la leche esterilizada convencionalmente (Piergiovanni y Volonterio, 1977).

El enranciamiento oxidativo implica la adición de oxígeno de la atmósfera en presencia de enzimas o determinados catalizadores. Se produce principalmente a nivel de los dobles enlaces de los ácidos grasos (Stevenson y col. 1984). Debido a estas reacciones se producen hidroperóxidos tanto se producen a altas como bajas temperaturas (Frankel, 1985). Así a temperaturas bajas, hasta 100°C se forman monómeros de triglicéridos oxidados. A altas temperaturas, próximas a 200°C, se originan principalmente dímeros y polímeros (Nawar, 1984). Este segundo mecanismo es el que induce pérdidas en el valor nutritivo del alimento, ya que además de la disminución de ácidos grasos esenciales, a través de reacciones secundarias de la oxidación lipídica, también se modifican indirectamente las vitaminas y las proteínas.

Los hidroperóxidos que reaccionan de distintas formas, se pueden descomponer, originar compuestos carbonílicos o polimerizarse. Los radicales libres y los hidroperóxidos pueden interactuar con pigmentos, compuestos volátiles, vitaminas y proteínas para dar lugar a una amplia variedad de productos, y a la inactivación de nutrientes a través de la oxidación de vitaminas y aminoácidos azufrados. Los compuestos carbonílicos por otro lado pueden participar en la reacción de Maillard (Danehy, 1986; Namiki, 1988).

El tratamiento térmico puede afectar la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos

y cambiar el contenido de ácidos grasos libres, así se ha observado un incremento de este componente en la leche UHT (Renner, 1983).

En el capítulo correspondiente a la reacción de Maillard, ya se ha indicado que la grasa al oxidarse origina aldehídos y cetonas que pueden participar en la citada reacción. Arnoldi (1994) estudió la autooxidación lipídica en un sistema modelo constituido por glucosa y lisina que fueron calentados junto a aceites comestibles en presencia de compuestos prooxidantes o antioxidantes. El compuesto prooxidante en ausencia de los aceites tenía un efecto directo sobre la reacción de Maillard incrementando la formación de furanos, pirroles y pirazinas. Este mismo compuesto al incluir los aceites en el sistema tenía un efecto menos pronunciado porque el prooxidante estaba principalmente implicado en la oxidación del aceite, incrementando notablemente la formación de aldehídos.

Los componentes de la materia grasa de la leche son poco sensibles a los tratamientos térmicos moderados. Es preciso alcanzar temperaturas muy superiores a 100°C o realizar un calentamiento prolongado durante varias horas a 70-80°C para detectar una degradación de los glicéridos.

La acción del calentamiento sobre la estructura del glóbulo graso es mucho más importante a las temperaturas alcanzadas normalmente en lecherías. La pasteurización HTST (72°C durante 20 segundos) desnaturaliza las aglutininas superficiales de los glóbulos y dificulta la formación de la capa de crema. Cuando el calentamiento alcanza 85-90°C durante 15 a 20 segundos, puede observarse la pérdida de material de la membrana del glóbulo graso. El complejo fosfolipoproteico es desplazado en bloque y se encuentra en la fase acuosa.

2.2.3. Efectos sobre la lactosa

La lactosa es responsable de importantes cambios químicos que se produce en la leche al ser calentada. Este disacárido reductor participa en las reacciones propias de aldosas, la primera reacción que se desencadena en la lactosa por efecto tratamiento térmico es su mutarotación de formas α a β a 125°C en presencia de agua (Van Leverink, 1980; Adachi y Itoh, 1981). Las formas α se hidrolizan en el intestino y digieren más rápidamente, aunque

es más interesante una hidrólisis relativamente lenta mejor puesto que favorece la absorción de diversos minerales (Fomon, 1995).

A temperaturas intermedias, entre las que se produce la mutarotación y el punto de fusión de la lactosa, se produce su isomerización rindiendo lactulosa y epilactosa, y a una temperatura próxima a su punto de fusión se produce la formación de lactulosa (Fernández y col., 1980). En este rango también se produce la hidrólisis de la lactosa a glucosa y galactosa.

A temperaturas entre 300-500°C se produce su paralización (caramelización) originando productos volátiles comunes a los todos carbohidratos bajo estas condiciones.

Aunque la mayoría de los cambios que experimenta la lactosa están relacionados con la reacción de Maillard, que ha sido ampliamente estudiada en otro apartado, la leche es un sistema complejo donde prácticamente todos sus componentes interactúan. Centrándonos en las interacciones en las que participa la lactosa, este disacárido forma enlaces de hidrógeno con el agua, interacción que modifica la actividad de agua de la leche. Adachi y Patton (1961) observaron que la presencia de citratos y fosfatos favorecía la formación de lactulosa a partir de lactosa. Corroborando esta idea en otros estudios Klostermeyer (1982) obtuvo que la isomerización de la lactosa durante el proceso de esterilización era mayor por efecto de Na_2HPO_4 . Este mismo autor junto a Geiser estudió la cristalización de los fosfatos durante el calentamiento de la leche. Estos cristales actúan catalizadores en la reacción de isomerización de la lactosa (Andrew y Prasad, 1989). Otro componente de la leche que actúa como catalizador es la urea, componente nitrogenado no proteico que actúa sobre las interacciones entre los grupos carbonilos y las proteínas activando alguno de los dos.

Según Pierre y col. (1977) este efecto protector es muy importante en el suero de la leche. También se ha observado que la lactosa a elevadas temperaturas es responsable de la desestabilización de las caseínas. Por efecto del tratamiento térmico la lactosa da lugar a formas ácidas y en presencia de oxígeno la lactosa es la principal causa de acidez que induce la coagulación de la leche.

Algunos de los métodos que se emplean para valorar la intensidad del tratamiento térmico están basados en el análisis de las reacciones en las que participa la lactosa. Para la leche de vaca "The International Dairy Federation" ha propuesto la lactulosa como indicador de procesamiento térmico, estableciendo el límite máximo para la UHT en 600 mg/L (Schlimme y col., 1993), valores superiores indicarían que se trata de leche esterilizada convencionalmente. Corzo y col., (1994) han descrito contenidos de furosina de 53.5 a 109.9 mg/L para una leche de vaca en polvo reconstituida comercializada, y 17.6 a 85.4 mg/L para una leche de vaca UHT.

A elevadas temperaturas, como las que se alcanza en la esterilización o tratamiento UHT, la formación de lactulosa puede llegar a ser considerable. Por el contrario, a bajas temperaturas, como en el almacenamiento de la leche, la formación de lactulosa es baja y predomina la reacción de Maillard, que puede ser valorado a través de la determinación del contenido de lisina, tras hidrólisis ácida, de hidroximetilfurfural o de furosina.

2.2.4. Efectos sobre los minerales

Los componentes minerales de la leche están en equilibrio dinámico entre la fase acuosa y coloidal, pero con el calentamiento dicho equilibrio se ve alterado. Scott (1989) clasificó a las sales minerales de la leche en dos grupos según les afectara o no el tratamiento térmico: al primer grupo pertenecía el calcio, fosfatos, magnesio y citrato y al segundo el sodio, potasio, cloro y sulfato .

La leche fresca presenta un contenido de fosfato cálcico disuelto próximo a su punto de saturación en la fase acuosa, por ello toda elevación de la temperatura conduce a su insolubilización progresiva. Las consecuencias del calentamiento están en función de su intensidad, así cuando la elevación de temperatura es moderada y no sobrepasa los 55-60°C, se observa que la insolubilización progresiva del fosfato cálcico acompañada de la integración del mismo en las micelas de fosfocaseinato en forma de una sal coloidal. Por lo tanto, se produce una mineralización de las micelas y, como consecuencia, un aumento del tamaño medio de las mismas junto a una disminución del grado de hidratación. Estas modificaciones parecen ser completamente reversibles cuando la leche calentada se enfría. A temperaturas más

altas, por ejemplo a 85°C, casi todo el fosfato cálcico que se ha depositado se vuelve a disolver tras 48 horas a 5°C (Kannann y Jenness, 1961). A temperaturas por encima de 110°C, y más elevadas solo una parte del material depositado se redisuelve al enfriar (Hilgeman y Jenness, 1951; Kannan y Jenness, 1961). Esto podría ser explicado por la hipótesis de que una parte del mineral depositado haya cambiado su estado formándose hidroxapatita cristalizada dentro de las micelas que no puede redisolverse durante el enfriamiento. (Evenhuis, 1956; Edmonson y Tarassuk, 1956; Kannan y Jenness, 1961; Visser y col., 1986).

Este último fenómeno, también es responsable del denominado formación de la costra de leche en los cambiadores de calor. Dalgleish (1987) al estudiar el comportamiento de los minerales en la leche calentada observó que se producía un depósito importante de calcio y fosfatos en las paredes del tanque soporte de acero inoxidable. Cuando analizó los depósitos parece que estos no tenían una composición bien definida que se pudiera relacionar con una forma específica de fosfato cálcico. Cuando la leche se calentaba en recipientes de vidrio, que presentan menos lugares donde se puede depositar el fosfato cálcico, observó que estaba favorecida el depósito de estos compuestos en las micelas.

El efecto de la disminución de pH en la leche calentada no puede ser analizado aisladamente, sino teniendo en cuenta todas las demás reacciones, especialmente la desfosforilación de las caseínas que condicionan la modificación del fosfato cálcico micelar que pasa a tener una naturaleza más inorgánica y dicha desfosforilación es la principal causante de la disociación de las caseínas de las micelas. Según disminuye el pH, el fosfato cálcico micelar se disuelve mejor y la medida en que se da el descenso depende de la intensidad del tratamiento térmico (Sweetsur y Muir, 1980) .

En la leche existen proteínas y fragmentos de proteína de la leche, tal como las "peptone proteose" que ejercen un efecto estabilizante sobre el calcio y fósforo previniendo que estos minerales precipiten. El citrato también juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad del calcio sérico puesto que forma un complejo con él.

Cuadro 1.

Contenido de vitaminas de la leche de vaca y los porcentajes de pérdidas inducidas por los tratamientos térmicos: pasteurización, esterilización y uperización (Ford y Thompson, 1981)

Vitamin	Raw milk, content/100 ml	Loss (%)		
		Past.	Steril.	UHT
Thiamin	45 μ g	<10	30	10
Riboflavin	180 μ g	ns	ns	ns
Nicotinic acid	80 μ g	ns	ns	ns
Vitamin B ₆	40 μ g	<10	20	10
Vitamin B ₁₂	0.3 μ g	<10	<90	10
Pantothenic acid	350 μ g	ns	ns	ns
Biotin	2.0 μ g	ns	ns	ns
Folic acid	5.0 μ g	<10	50	15
Ascorbic acid	2.0 mg	20	90	25
Vitamin A	30 μ g	ns	ns	ns
Vitamin D	22 ng	ns	ns	ns
Vitamin E	86 μ g	ns	ns	ns
β -carotene	17 μ g	ns	ns	ns

ns = not significant.

Past. = 72°C for 15 s.

Steril. = 115°C for 30 min.

En lo que respecta al valor nutritivo de las vitaminas de la leche, esta es una importante fuente de vitamina B₁₂ y de riboflavina. Aunque el contenido de ácido nicotínico de la leche no cumple con las RDA, sí llega a contribuir hasta en un 50% a las RDA, si también se incluye el ácido nicotínico procedente del triptófano. El aporte de vitamina A, D y E, liposolubles, es mucho más limitado en la leche descremada o semidescremada respecto a la leche que contiene toda su grasa.

La vitamina B₁₂ y el ácido fólico de la leche, así como el hierro, están fuertemente y específicamente unidos a proteínas séricas minoritarias, que están presentes en exceso, de manera que la leche tiene capacidad para unirse a las vitaminas añadidas. A nivel de la glándula mamaria esta capacidad puede actuar como un mecanismo para atrapar las vitaminas acumuladas en el plasma sanguíneo en la leche, y facilitar el transporte y absorción de vitaminas y a la vez evitar que las vitaminas sean tomadas de la microflora intestinal (Ford, 1974).

Las vitaminas liposolubles A, D y E son relativamente estables a los tratamientos térmicos, así como la riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico y la biotina (Ford y Thompson, 1981).

La pérdida de vitamina C se determina por la concentración de oxígeno disuelto en la leche tras su procesamiento y envasado. Después de la pasteurización la leche presenta un contenido total de aproximadamente 15 µg/ml de vitamina C, alrededor del 85% está presente como ácido ascórbico y un 15% es dehidroascórbico. El tratamiento UHT, directo o indirecto, reduce el contenido de ácido ascórbico de la leche cruda en un 8% (Burton y col., 1970), aunque el ácido dehidroascórbico es destruido en su mayoría. Numerosos estudios citan que las pérdidas de vitamina C están entre un 5% y un 30% para UHT, y entre un 30% y 100% en el caso de la esterilización.

La tiamina, vitamina B₆, vitamina B₁₂ y el ácido fólico son menos estables al calor y por lo tanto en los tratamientos térmicos más severos se incrementa la pérdida de éstas. La destrucción de vitamina B₁₂ y ácido fólico implican interacciones complejas entre ellos y con el oxígeno y agentes reductores tales como el ácido ascórbico. (Ford, 1967; Ford y col., 1974). Los tratamientos térmicos que se emplean en la producción de leche esterilizada y UHT

(Burton y col., 1967) causan pérdidas acumulativas de la tiamina y la vitamina B₆, que incrementan con la frecuencia e intensidad del calentamiento. Respecto al ácido fólico, el primer tratamiento potencia el efecto destructivo de los posteriores, sin embargo la pérdida de vitamina B₁₂ se reduce notablemente por la pasteurización HTST preliminar.

Por lo tanto se puede concluir, que en general las pérdidas de vitaminas son pequeñas, <10% en la pasteurización y entre un 10 y 20% después de la esterilización UHT. El método indirecto produce probablemente pérdidas ligeramente mayores que el directo, aunque las pérdidas de la esterilización en envase son considerablemente mayores que ambos métodos UHT. Las pérdidas de vitaminas son sensiblemente reducidas cuando a la leche se aplica una pre-esterilización UHT antes de introducirla en el autoclave a una temperatura y tiempo bajo (Ford y Thompson, 1981).

En algunos casos el tratamiento térmico por sí solo no produce pérdidas significativas de vitaminas, pero es muy importante considerar las pérdidas posteriores debidas al envasado, distribución y almacenamiento de la leche antes de su consumo.

Varias vitaminas son potencialmente lábiles y su contenido en la leche puede verse afectado por diversos factores en el intervalo entre su embotellado o envasado y su consumo. Las botellas de vidrio transparentes siguen siendo un envase muy común de leche pasteurizada, los cartones revestidos de polietileno también se llevan usando años, y más recientemente se han introducido las botellas de polietileno.

La exposición de la leche a la luz del día o a la luz artificial (tubos fluorescentes cuya longitud de onda es similar a la de la luz del día), puede producir efectos muy perjudiciales sobre las propiedades nutritivas y organolépticas de la leche, ya que se inducen reacciones químicas que afectan especialmente a las proteínas y los lípidos, así como al sabor (Shipe y col., 1978; de Man, 1981; Thomas, 1981; Levey, 1982; Farrer, 1982).

El oxígeno juega un papel muy importante en el deterioro de la calidad organoléptica y en la destrucción de ciertas vitaminas. La leche generalmente está saturada de O₂, pero si no se introduce más el contenido de O₂ va disminuyendo a la vez que las reacciones adversas

asociadas. Pero si existe más O_2 procedente del aire de dentro del recipiente, o por que las paredes del envase sean permeables, se desencadenan reacciones de oxidación.

Entre todas las vitaminas, la vitamina C y hasta cierto punto la riboflavina y la vitamina A son particularmente vulnerables al oxígeno y a la luz. La leche es una fuente importante de riboflavina. La pérdida de ácido ascórbico así como de ácido fólico viene determinada por la concentración de O_2 disuelto en la leche. La pérdida de ascorbato se ve muy incrementada por la exposición de la leche a la luz en presencia de riboflavina, esta destrucción está catalizada por algunos metales pesados, especialmente el Cu.

Estudios de Ford y col, (1969) demuestran que durante el procesamiento UHT directo el oxígeno se elimina de la leche mientras que en el método indirecto queda cierta cantidad. Sin embargo, si el método indirecto va seguido de un desaireador, puede dar como resultado leche con un bajo contenido de O_2 . Se ha observado que el contenido de vitamina C de la leche procesada por el método indirecto y almacenada a 15-19°C rápidamente disminuye después de 90 días. También se encontró que la estabilidad del ácido fólico estaba claramente relacionada con el contenido de ácido ascórbico (Burton, 1988). En la leche UHT por el método indirecto se observó una pérdida total de ácido fólico al cabo de 14 días, sin embargo en la leche producida por el método indirecto no hubo pérdida alguna. Se pueden dar pérdidas significativas de otras vitaminas lábiles durante el almacenamiento; Ford y col, 1969 describió la pérdida progresiva de vitamina B_6 hasta un 50% después de tres meses. La vitamina B_{12} mostró un comportamiento similar pero en menor medida. La adición de ácido ascórbico a la leche antes de ser sometida al procesamiento UHT elimina eficazmente el oxígeno residual y preserva el ácido fólico de la leche durante 60 días de almacenamiento, pero la pérdida de vitamina B_{12} rápidamente se incrementa.

El folato de la leche está inicialmente protegido porque la oxidación del ácido ascórbico es preferente. La riboflavina es fotolábil tal como lo son, aunque en menor medida la vitamina B_6 , B_{12} y el ácido fólico. La riboflavina también cataliza el desarrollo de sabores oxidados así como la oxidación de ácido ascórbico (Finley y Shipe, 1968). La vitamina A está sometida

a pérdidas por su exposición a la luz, pero se debe tener en cuenta que la vitamina A nativa es considerablemente más estable que los suplementos de vitamina A. Levey, (1982) describió que las leches descremadas enriquecidas experimentan importantes pérdidas de vitamina A. Además la luz penetra más en la leche descremada que en la entera.

Los efectos del tratamiento térmico sobre las proteínas y los carbohidratos originando compuestos de la combinación de ambos nutrientes se describen en el siguiente apartado.

2.3. LA REACCION DE MAILLARD

La interacción entre el grupo amino y los compuestos carbonilo da lugar a cambios complejos en los sistemas biológicos y en los alimentos. Aunque desconocía la reacción, en 1912 Louis Maillard, percibió su importancia cuando realizaba estudios sobre la síntesis de las proteínas. Observó que al calentar una solución de glicina y glicerina se producía un oscurecimiento y el desarrollo de aroma. Ling (1908) también había detectado que el calentamiento de la malta a 120°C - 140°C tenía el efecto de realzar su sabor y color. Los pigmentos pardos que se forman no son dializables, algunos son sin embargo solubles en agua, otros son insolubles. Parece que su polimerización da lugar a sustancias con un peso molecular superior a 1000 y que son sustancias inertes desde un punto de vista químico y biológico. Por tanto, el tamaño molecular de 1000 sería la barrera que diferenciará las premelanoidinas de las melanoidinas (Mauron, 1985). Como consecuencia, la reacción de Maillard mejoraba el sabor del alimento tratado termicamente pero también podía ser responsable de la menor calidad del mismo.

Durante las últimas décadas se han publicado numerosos trabajos sobre la reacción de Maillard, al principio el interés de los investigadores se centró en los cambios organolépticos, color y sabor, de los alimentos. Más tarde el interés se desvió hacia los efectos nutritivos y fisiológicos de la reacción, así como los cambios de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas y su actividad antioxidante. Estudios más recientes de estas reacciones abarcan los problemas de seguridad de los alimentos (formación de mutágenos), la química de las proteínas *in vivo*, etc.

Aunque existe gran complejidad, los principales constituyentes de los sistemas biológicos, incluidos los alimentos, son tres: las proteínas, los polisacáridos y los lípidos, cuyas unidades estructurales -aminoácidos, monosacáridos, ácidos grasos y alcoholes- se reducen básicamente a cuatro grupos funcionales: -NH₂, -CHO -COOH y -OH. Estos grupos son responsables de la formación de constituyentes biológicos poliméricos que se forman a través de reacciones de condensación mediados por enzimas. Sin embargo, la combinación de

-CHO y -NH₂ es muy distinta, es no enzimática. Aunque el primer paso de la reacción no enzimática entre estos grupos es reversible (formación y descomposición de productos glicosil-amino), estos productos experimentan reagrupaciones para dar productos cetosil-amino que sufren reacciones irreversibles complejas que implican deshidrataciones, reagrupaciones, escisiones, etc. y dan productos de descomposición y polimerización que incluyen componentes organolépticos y melanoidinas. Las funciones fisicoquímicas y fisiológicas de las proteínas están afectadas por este tipo de reacciones (Namiki, 1988).

Tabla 1. Importancia de la reacción de Maillard en los alimentos y en sistemas biológicos (Namiki, 1988).

Aspectos químicos	Mecanismo de la reacción de pardeamiento, aislamiento e identificación de los productos intermediarios, estructura y propiedades de las melanoidinas
Aspectos técnicos	Desarrollo de sabor, cambios cualitativos fisicoquímicos, control del pardeamiento del alimento
Aspectos nutricionales	Pérdida de aminoácidos (lisina, arginina, etc.), pérdida del valor nutritivo, propiedades antinutritivas, quelación de iones metálicos
Toxicología	Formación de mutágenos, Antimutagénesis
Fisiopatología	Diabetes, envejecimiento

Se ha demostrado que la glicosilación no enzimática que se produce en la etapa inicial de la Reacción de Maillard también tiene lugar in vivo entre diversas proteínas afectando su función de distintas maneras. Así por ejemplo la cantidad de productos de Amadori se ve incrementada en el doble en diabéticos, especialmente en aquellas proteínas de los tejidos que no dependen de insulina para su asimilación de glucosa. Esta reacción también es responsable de algunos de los cambios, agudos o crónicos, que se producen a nivel molecular en diabéticos.

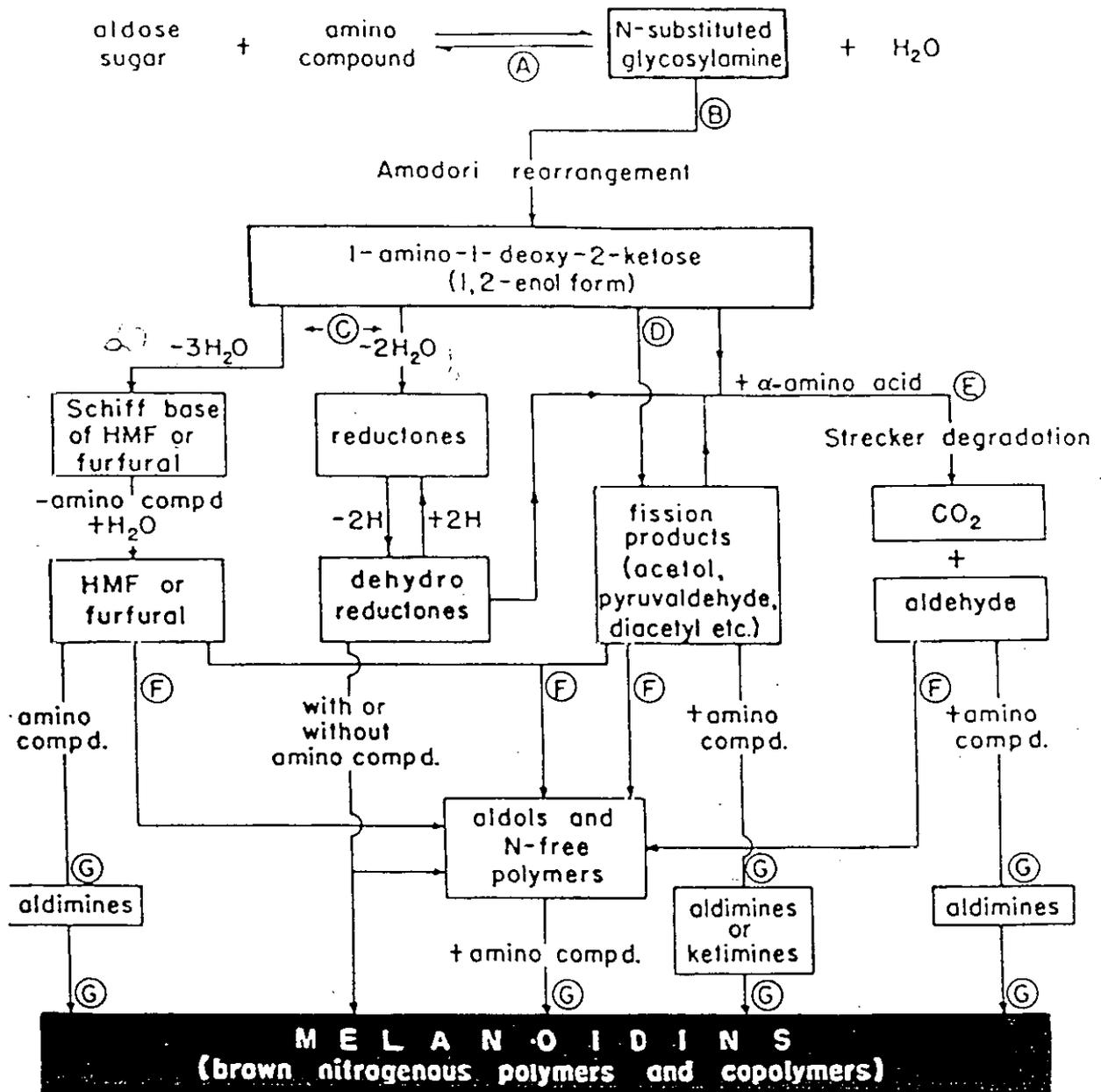
En lo que se refiere a las etapas más avanzadas de la Reacción de Maillard, se ha visto que existen muchas semejanzas entre los cambios que se producen en proteínas de larga vida de algunos tejidos y los alimentos almacenados en presencia de azúcares reductores. Esto podría explicar, en parte, los cambios de solubilidad proteica que se producen con el envejecimiento y diabetes (Monnier y Cerami, 1983).

2.3.1. Química de la reacción

Es bien conocido que el índice de coloración y las propiedades del producto de la reacción de pardeamiento dependen de la naturaleza de las sustancias reaccionantes y de las condiciones de la reacción, especialmente del pH y la temperatura. A pesar de los numerosos estudios que se han llevado a cabo sobre el tema, todavía no se conocen completamente los aspectos químicos, debido a la elevada reactividad de las sustancias reaccionantes y los productos, los entrecruzamientos de las rutas de la reacción y la diversidad de productos. Las revisiones de Hodge (1953, 1967) son muy completas. Este autor dividió el esquema de esta reacción en tres etapas:

- 1) Una etapa temprana (reacciones A y B) que implica la formación de productos glicosil-amino, seguido de la reagrupación de Amadori.
- 2) Una etapa avanzada (reacciones C,D y E) que conlleva la deshidratación y fragmentación de azúcares, degradación de aminoácidos, y otros.
- 3) Una etapa final (reacciones F y G) que supone la condensación, polimerización y formación de compuestos nitrogenados heterocíclicos y productos coloreados.

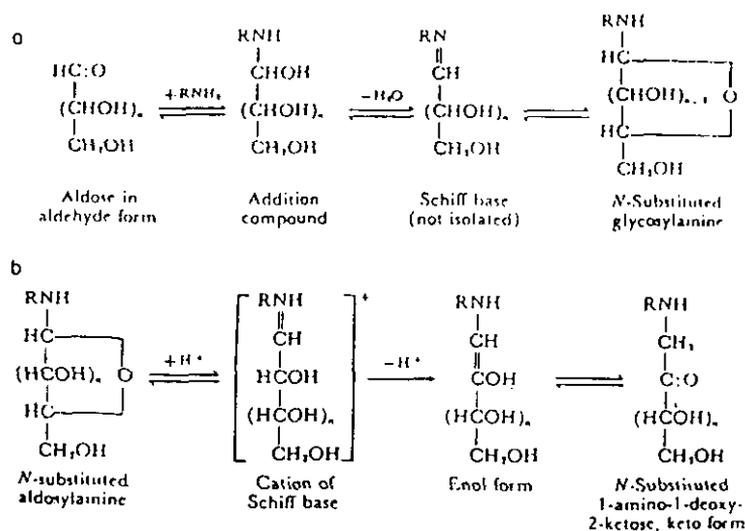
Cuadro 1. Esquema general de la reacción de Maillard, tomado de la revisión de Hodge (1953).



1) Reacciones de la etapa temprana

La etapa temprana de la reacción viene esquematizada en la figura 2.

Cuadro 2. La etapa temprana de la reacción de Maillard (Hodge, 1967).



La primera etapa consta de la condensación simple entre un grupo carbonilo de un azúcar reductor (en forma de aldehído) y un átomo de nitrógeno trivalente procedente de un grupo amino libre de un aminoácido, una proteína, ácido nucleico o una amina de bajo peso molecular, para dar una glucosilamina N-sustituída: base de Schiff. Esta reacción inicial, ha sido ampliamente estudiada y es bien conocida, se han determinado tanto la estructura y las propiedades del primer producto de la reacción como su reagrupación para dar una cetosamina más estable.

Las aldosas reaccionan espontáneamente y reversiblemente con las aminas para formar aldosilaminas. En lo que respecta a este punto se han llevado a cabo muchos trabajos con aminas aromáticas para facilitar su aislamiento; también se han utilizado una amplia variedad de aminas alifáticas primarias y secundarias. Sin embargo, la estabilidad de las glucosilaminas es limitada. En un medio seco y semi-seco a 25°C, se reagrupan espontáneamente para dar 1-amino-2-cetosas, denominadas productos de reagrupación de Amadori (Hodge, 1955). Según Namiki (1988), en medios acuosos las glicosilaminas N-sustituídas como producto muy inestable son susceptibles de hidrolizarse o participar en reacciones irreversibles.

La importancia que presentan los compuestos de Amadori para la reacción de Maillard fue señalada por Hodge y Rist (1953). Estos investigadores observaron que la D-glucosilpiperidina se transformaba en una sustancia oscura, 1-N-piperidino-1-desoxi-D-fructosa (compuesto de Amadori), cuando se almacenaba a temperatura ambiente y éste podía ser aislada. Sin embargo, el 2-O-metil-D-glucosilpiperidina, que presenta el grupo hidroxilo del C-2 bloqueado, permanecía incoloro y estable hasta 2 años a 25°C. Por lo tanto, la prevención de la formación del producto de reagrupación de Amadori a partir de la glicosilamina N-sustituida inhibe el subsiguiente pardeamiento.

Cuando el compuesto carbonilo es de una cetosa (fructosa, por ejemplo) en lugar de una aldosa, tiene lugar la formación de fructosilamina que se reagrupa de idéntica manera para dar una 2-alquilamino-2-deoxi-D-glucosa, (compuesto de reagrupación de Heyns) Dicho producto, al igual que el procedente de la reagrupación de Amadori, es precursor del fenómeno de pardeamiento.

La reacción de Maillard cuando participan disacáridos unidos por enlaces 1,4 glicosídicos da lugar a compuestos que difieren en su estructura de aquellos que se forman a partir de glucosa o fructosa. Las dos fuentes más importantes de disacáridos son la maltosa, producto de degradación del almidón, y la lactosa. Cuando la maltosa o lactosa se calientan en presencia de aminas primarias o secundarias, se obtiene como primer producto una amino-2-deoxicetosa N-sustituida. Sin embargo, este compuesto, como producto de Amadori no es estable y da lugar a estructuras dicarbonilo (cuadro A). La proporción de deoxisonas que se forman se depende especialmente del valor de pH. En soluciones neutras la degradación de los productos de Amadori da lugar a 1-deoxihexulosas principalmente. Posteriormente tiene lugar la enolización y cicación de este producto. A partir de aquí la degradación de los monosacáridos y disacáridos siguen disacáridos siguen distintos caminos.

La principal consecuencia de la etapa temprana de la reacción de Maillard es la pérdida de valor nutritivo de la proteína, puesto que la lisina bloqueada con su grupo en forma de un compuesto de Amadori ha demostrado ser biológicamente no disponible en la rata (Mauron,

1970). Esta consecuencia es especialmente importante cuando la lisina constituye un aminoácido limitante de la proteína (por ejemplo en los cereales). La lisina de la leche, aunque no es un aminoácido limitante, pasa a ser no disponible al convertirse en deoxilactulosil-lisina en esta etapa. Existen diversos métodos para detectar si la reacción de Maillard ha afectado a la lisina, como son los métodos de disponibilidad de lisina y el contenido de lactulosil lisina (Finot, Hurrell) o la medida de furosina. La furosina es un compuesto que se puede obtener en el laboratorio mediante hidrólisis ácida de la deoxilactulosil-lisina (Erbersdobler, 1970) y puede emplearse como un indicador para valorar la reacción de Maillard pues la proporción de moléculas de lisina bloqueadas puede calcularse a partir del contenido de furosina. Este índice se utiliza para valorar la intensidad del tratamiento térmico de la leche (Finot y col., 1968; Erbersdobler, 1986; Olano y col., 1989; Delgado y col., 1992).

El daño de la lisina puede ser calculado a partir de la lisina (x) y la furosina (y) a través de la fórmula:

$$\% \text{lisinadañada} = \frac{3 * l y x 100}{x + 2y}$$

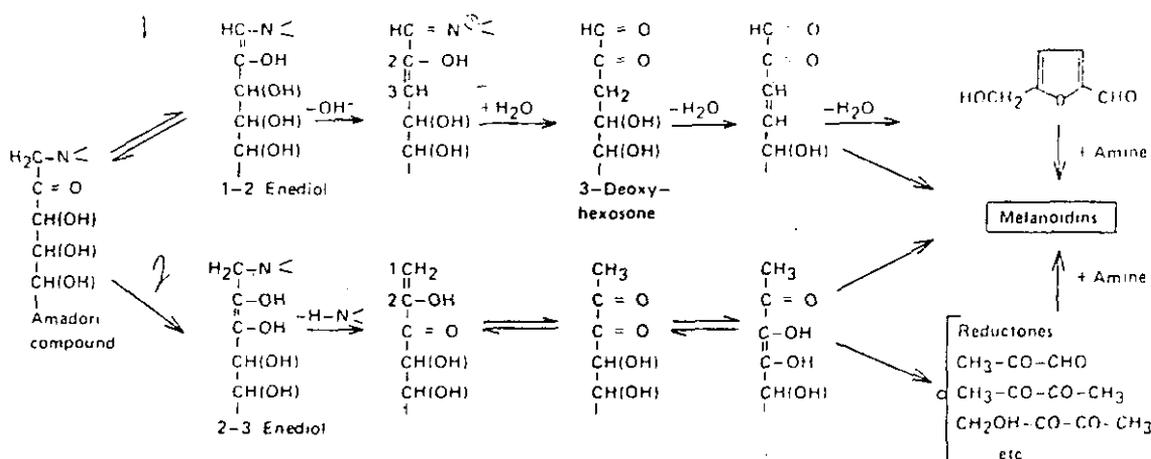
La etapa posterior a la formación de los productos de Amadori (y de los productos de Heyns) puede transcurrir por diversas rutas dependiendo de que la enolización se dé en un carbono u otro de la aldosa o cetosa. Hodge (1967) expuso que tenía lugar la formación de fracciones de productos que procedían de los compuestos de Amadori que habían sufrido una enolización y desaminación, aunque no existía una evidencia clara en lo que respecta a dicho proceso.

Etapa avanzada

Lo que Hodge (1967) denominó la etapa avanzada abarca una serie de reacciones que comienzan con los productos de reagrupación de Amadori hasta las melanoidinas. Comparado

con la simplicidad de la primera etapa los numerosos estudios de la segunda etapa son caóticos y todavía no se ha sistematizado una vía reconocida universalmente para la formación de melanoidinas. Obviamente, esto se debe a la elevada reactividad de casi todos los productos de esta etapa que siguen rutas complejas que en todos los casos conducen a la formación de unos polímeros de color denominados melanoidinas. Se acepta que dichos polímeros no son absorbibles (Pieniazek y col., 1975; Hurrell y Carpenter, 1976; Whitelaw y Weaver, 1988)

Cuadro 3. Reacciones de la etapa avanzada (Hodge, 1967); enolización y degradación de los compuestos de Amadori (tomada de la Namiki (1988)).



Los productos de Amadori son bastantes estables y presentan una débil actividad de pardeamiento incluso en presencia de compuestos amino. El principal proceso por el cual los productos de Amadori dan compuestos coloreados y con sabor es a través de la enolización 1,2 seguido de la eliminación de un grupo hidroxilo en el C-3 y de la desaminación en C-1 (a). Como consecuencia, se obtiene hidroximetilfurfural y furfural, que ya poseen aroma y pueden reaccionar con una nueva amina para producir pigmentos pardos. Por otro lado también se puede producir la enolización 2,3 del compuesto de Amadori seguido de la eliminación del grupo amino del C-1 da el intermediario 1-deoxidicarbonio que reacciona dando productos carbonilos de fisión tales como el metilglioxal, diacetilo etc. (b) (Hodge, 1967) que contribuyen al aroma y a su vez pueden reaccionar con nuevos grupos amino.

Parece que existe una vía adicional más directa, por la que mediante la caramelización de azúcares (hexosas, pentosas) se obtienen productos fragmentados como el metilglioxal, diacetilo, etc. Por tanto, dichos compuestos de fisión pueden obtenerse a partir de los compuestos de Amadori que sufren la enolización 1,2, por fragmentación de azúcares o también por aminación adicional de compuestos de Amadori (Hayesli y Namik, 1986; Hodge, 1967).

Un cuarto camino, la degradación de Strecker, implica la transformación de los aminoácidos en sus correspondientes aldehídos con un átomo de carbono menos y por lo tanto conlleva la eliminación de un CO₂ (E). Estos aldehídos también juegan un papel importante como componentes del sabor. Se ha demostrado mediante marcaje isotópico (Wolform y col., 1953; Kato y Tsuchida, 1981) que la mayor parte del dióxido de carbono procede del aminoácido, aunque también puede proceder el CO₂ del azúcar (Stadtman y col., 1952).

También se conocen casos en los que los productos de Amadori dan productos coloreados por degradación oxidativa de N-glucosidos por otras vías.

En este sentido Hayase y Kato (1986) estudiaron la formación de productos de bajo peso molecular en un sistema de reacción de glucosa-n butilamina a través de análisis por cromatografía de gas-líquido. Los resultados obtenidos indicaban que a pH 4.0 se obtenían productos heterocíclicos que se asume que se forman a partir de compuestos de Amadori que experimentan una 1,2 enolización; a pH 11.4 se obtienen grandes cantidades de productos de fragmentación de bajo peso molecular pero no compuestos heterocíclicos; y si la reacción se efectuaba a pH 6.5 tendían a aumentar los productos fragmentados. Estos autores propusieron que las amidas de bajo peso molecular se forman a partir de glioxal y diacetil, y que estos últimos proceden de la escisión de las uniones C-2/C-3 y C-4/C-5 de la glucosa después de la 2,3 enolización de los compuestos de Amadori. Estos resultados son interesantes porque el diacetilo y el glioxal son productos intermedios en el pardeamiento y lo que es más, agentes activos que inducen reacciones cruzadas en la polimerización de proteínas en la reacción de Maillard (Cho y col. 1986). Cuando estos autores examinaron los productos de bajo peso

molecular, encontraron cantidades considerables de N-butilformamida y N-butilacetamida, así como 2,3 dihidroxil-6-metil-4H piran-4-ona y derivados de piroles en mezclas neutras y ácidas. Al profundizar en la formación de estos compuestos partiendo de sus compuestos de origen observaron que había tenido lugar otra reacción distinta a la enolización 1,2.

Otros productos de fragmentación de compuestos carbonilos como el glicolaldehído, gliceraldehído, etc. o sus correspondientes iminas se sabe que también son compuestos intermedios de la reacción de Maillard, pero no se ha evaluado su actividad de pardeamiento.

En lo que respecta a cómo los pigmentos se forman a partir de sus precursores a los productos de la reacción de enolización 1,2 hace tiempo que se sabe que la reacción del furfural con compuestos amino origina derivados de piroles y piridinas (Aso, 1939, 1940). Los productos pardos procedentes de la reacción, a partir de una 1-deoxisona, por enolización 2,3 son las pirrolinonas del tipo de las reductonas (Ledel y Fritxh, 1984) intermediarios clave en la formación de melanoidinas.

Etapa final

En la etapa final de la reacción de Maillard los productos intermedios de color y otros precursores reactivos (tales como los productos enaminoles, análogos de azúcares de bajo peso molecular y productos carbonilo insaturados) se condensan y polimerizan para dar polímeros pardos o melanoidinas, que son prácticamente inertes, siendo incrementada esta reacción por una amina. Existe una gran variedad de estos compuestos pardos, tanto por lo que se refiere a su estructura química como a sus propiedades, dependiendo de las condiciones en que se han formado y las sustancias reaccionantes. No son dializables y se considera que no pueden absorberse en el intestino, aunque no siempre son insolubles, algunos pueden solubilizarse en agua (Mauron, 1985)..

Ya que las estructuras químicas de las melanoidinas no se conocen con precisión, se ha propuesto la fórmula general, "azúcar + amino ácido - 2~3 H₂O" para las melanoidinas

basada en la consideración de que la principal ruta de formación de las melanoidinas implica la reacción entre compuestos amino y deoxisonas, furfural y otros productos de fragmentación que acompañan la deshidratación (Kato y Tsuchida, 1981; Namiki, 1988). Pero no solo, la formación de melanoidinas es el resultado final de la deshidratación de los compuestos provenientes de la unión entre el azúcar y el aminoácido (compuesto de Amadori) sino que parece que también se dan reacciones de deshidratación y reagrupación tras la formación de polímeros. Los análisis de ^{13}C de las melanoidinas formadas a partir de glucosa y L-alanina marcada con ^{13}C -1 o ^{13}C -2 indicaban que ambos carbonos de la L-alanina quedaban incorporados al polímero y que C-1 y C-2 de la L-alanina permanecían como carbonos carboxilos y un carbono amino sustituido, de manera que la fuente de liberación del dióxido de carbono no está limitado al grupo carboxil del α -aminoácido.

Es interesante recordar que en sistemas de alimentos se produce la degradación térmica de carbohidratos solos (Fagerson, 1969) que tiene lugar simultáneamente a la reacción de Maillard y que origina compuestos conjugados (reductonas, derivados de furano, derivados de piranos, derivados de ciclopentenos y otros productos) algunos de los cuales son compuestos intermedios y otros finales que contribuyen al aroma, sabor y color del alimento.

Los lípidos al oxidarse producen compuestos carbonilos que reaccionan con los compuestos amino para formar productos pardos de alto peso molecular. Esta reacción ha sido ampliamente descrita por Pokorny (1981). Fujimoto y col. (1971) estudiaron la reacción de pardeamiento en el músculo pardo y observaron que la reacción entre lípidos oxidados y aminoácidos era más importante que la que se daba entre la ribosa y aminoácidos.

2.3.2. Factores que influyen en la reacción de Maillard

La intensidad de la reacción depende de la temperatura del proceso, de la actividad de agua, del pH del medio y de la naturaleza de las sustancias reaccionantes.

2.3.2.1. Temperatura

El calor no es indispensable para el desarrollo de la reacción de Maillard, ya que sucede tanto durante el almacenamiento a temperatura ambiente como en los tratamientos térmicos e incluso en congelación.

El papel del calor es activar el proceso de modo que, a bajas temperaturas, puede retardarse el pardeamiento y por el contrario a temperaturas elevadas aumenta rápidamente (Adrian, 1974; Cheftel y Cheftel, 1976; Dutson y Orcutt, 1984; Hegarty, 1982; Lingert, 1990; Labuza y Saltmarch, 1981).

En un sistema modelo formado por proteína pura y dos ceto-aldehídos, comunes en los alimentos, se cuantificó la pérdida de lisina disponible así como el efectos de las condiciones sobre el desarrollo de la Reacción de Maillard. La temperatura era el factor que producía mayores efectos sobre la pérdida de lisina, seguido de las concentración de los compuestos carbonilo y el pH de la reacción . El enfriamiento rápido y el almacenamiento a bajas temperaturas después del procesamiento a alta temperatura minimiza las pérdidas de lisina (Tucker y col., 1983).

Así, se estudió la interacción entre la N- α -acetil-lisina y la glucosa a 40, 50, 60°C (actividad de agua: 0,19-0,21). La pérdida de acetil-lisina en 6 días fue 22, 54 y 79%, la formación de pigmentos pardos se incrementó con el aumento de temperatura (Ananthe Narayan y Cross, 1992)

Por otro lado, la temperatura influye también en la estructura de los productos de la reacción. Así, los estudios de Bensin-Purdie y col. (1985) demuestran que la estructura de las melanoidinas sintetizadas a temperatura ambiente (22°C) difieren considerablemente de las sintetizadas a temperaturas más elevadas (68 y 100°C) en que tienen diferentes tipos de carbonos alifáticos y un menor número de carbonos insaturados.

2.3.2.2. pH

Los efectos del pH son complejos, porque cada una de las reacciones que intervienen en el pardeamiento tienen su propio pH óptimo: entre 6 y 8 para la condensación de Maillard, próximo a 7 para la reestructuración de Amadori, 5.5 para la degradación de cetosaminas por enolización, etc... (Cheftel y Cheftel, 1976).

Pero en la mayoría de los casos, la intensidad de la reacción se incrementa al aumentar el pH (Adrian, 1974, Ashoor y Zent, 1984, Lignert, 1990) y en general, dicho aumento es lineal desde valores de pH de 3 a 8 (Lee y col., 1984) y probablemente hasta 10 (Adrian, 1974), disminuyendo a valores de pH más elevados (Ashoor y Zent, 1984). Por debajo de pH 3 la intensidad de la reacción aumenta otra vez, probablemente debido a la hidrólisis de la proteína (Kaanane y Labuza, 1989).

Así mismo, Petriella y col (1985) encontraron que en el sistema lisina/glucosa, el desarrollo del color era lineal desde valores de pH de 5 a 7 a temperaturas correspondientes a un calentamiento moderado (35, 45 y 55°C). Además, en las mismas condiciones, Cerutti y col. (1985) observaron una pérdida lineal del azúcar. También el pH de la reacción puede influir cuali y cuantitativamente en los productos volátiles de la reacción (Apriyantonio y Ames, 1993). Al igual, Buera y col (1987) en sistemas modelos con diferentes azúcares (fructosa, glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa y xilosa) y glicina, siendo la actividad de agua 0,9, todos los sistemas mostraron un incremento del color al aumentar el pH de 4 a 6.

Por lo tanto, en el caso de alimentos la cierta acidificación inhibe la reacción, por ejemplo, un descenso de pH permite atenuar el pardeamiento durante procesos de deshidratación en alimentos cuyo pH está comprendido entre 6 y 8, como es la leche, si bien modifica desfavorablemente los caracteres organolépticos.

2.3.2.3. Actividad de agua

La intensidad de color va aumentando desde un estado seco y a medida que se incrementa la actividad del agua hasta un máximo, a valores de actividad de agua, DEFINIR, de 0,5 a 0,8, para a partir de este valor, ir disminuyendo (Kaanane y Labuza, 1989). El color desaparece en el caso de soluciones extremadamente diluídas (Adrian, 1974).

Así, durante el procesamiento y almacenamiento, debido a la reacción de Maillard, las pérdidas de calidad proteica se producen a actividades de agua intermedias entre 0,3 y 0,75 (Ben-Gara y Zimmerman, 1972; Kato y col., 1986, 1988; Ringe y Love, 1988; Desrosiers y col., 1989). Cuando Saltmarch (1981) almacenó suero en polvo con distintas actividades de agua 0.33, 0.44 y 0.65 observó que la pérdida de calidad proteica y la intensidad de pardeamiento era mayor a 0.44.

Se han realizado estudios en sistemas acuosos de glucosa-lisina con actividad de agua elevada en los que ligeras variaciones de la actividad de agua no han influido sobre la formación de color (Petriella y col., 1985), ni la pérdida de glucosa, acumulación de 5-hidroximetilfurfural o el desarrollo de fluorescencia en el sistema (Cerrutti, 1985). El color aparece más intenso si la humedad del sistema es muy baja (Fox y col, 1982). Por consiguiente, a nivel doméstico e industrial, los tratamiento térmicos en medios secos son más perjudiciales que en medios acuosos.

2.3.2.4. Sustancias reaccionantes

La naturaleza del azúcar condiciona, en gran medida, la intensidad de la reacción de Maillard. Las pentosas y más concretamente la ribosa, son los azúcares reductores más reactivos; las hexosas (glucosa , fructosa) son un poco menos reactivos y los disacáridos (lactosa, maltosa) aún todavía menos (Cheftel y Cheftel, 1976; Lingnert, 1990). Hashiba () estudió en mezclas de distintos azúcares y glicina a 120°C durante 5 minutos, la naturaleza reaccionante de los primeros, valorándolo a través de la intensidad de pardeamiento del

sistema. De acuerdo con sus resultados ordenó a los azúcares (de más a menos): ribosa, ácido glucurónico, galactosa, manosa, glucosa y lactosa. También observó que la cantidad de glicina consumida y el poder reductor era proporcional a la intensidad de pardeamiento, pero no obtuvo una correlación con la cantidad de compuestos de Amadori acumulados en la mezcla de la reacción.

A su vez, dentro de cada grupo existen diferencias. De este modo, los disacáridos isomaltosa y melobiosa producen muchos más compuestos fluorescentes que la celobiosa, maltosa y lactosa cuando se almacenan con ovoalbúmina durante 20 días a 50°C y una humedad relativa de 65% (Kato, y col 1989).

Asimismo, también se producen variaciones cuando se modifica la estructura del azúcar. Por ejemplo, la intensidad fluorescente producida por la lactulosa (resultante del tratamiento térmico elevado o alcalino de la lactosa) es mayor que la de la lactosa al almacenarse con β -lactoglobulina a 50°C durante 10 días y humedad relativa del 65% (Matsuda y col, 1991).

También la sacarosa, que no es azúcar reductor, en alimentos ácidos se hidroliza progresivamente en glucosa y fructosa, así como durante el calentamiento a temperaturas superiores a 130°C, pudiendo participar de este modo en la reacción de Maillard (Cheftel y Cheftel, 1976; Hurrell y Carpenter, 1977).

El tipo de aminoácido también juega un papel importante en la formación de color. Cuando los aminoácidos están incluidos en una cadena proteica, la reacción de Maillard no afecta a toda ella sino que se produce una selección, y el primer aminoácido dañado es el que contiene el grupo amino terminal de la cadena. Los siguientes aminoácidos dañados son los básicos, especialmente la lisina cuya destrucción es de cinco a quince veces mayor que la de los restantes aminoácidos. Posteriormente, se afectarían los aminoácidos azufrados, cisteína y metionina, y algunas veces el triptófano. (Adrian, 1974).

En cuanto a la reactividad de los aminoácidos libres, no hay concordancia entre los distintos autores. Candiano y col (1990) indicaron que la lisina es el más reactivo en solución acuosa con distintos azúcares y en condiciones fisiológicas, y Ames (1986) además de la lisina, indicó que también la glicina es la que produce más color mientras que la cisteína normalmente produce poca coloración. Sin embargo, Adrian (1974) señaló que las muestras que contienen triptófano suelen ser más coloreadas que cuando está otro aminoácido implicado.

2.3.3. Consecuencias nutritivas y fisiológicas de la reacción de Maillard

2.3.3.1. Consecuencias desfavorables

La reacción de Maillard se sabe que produce importantes efectos negativos sobre la calidad nutricional de los alimentos durante su procesamiento y almacenamiento. Según Hurrell (1990), la reacción de Maillard puede modificar el valor nutritivo a través de tres componentes de los alimentos: las proteínas, los minerales y las vitaminas.

2.3.3.1.1.1. Proteína

La reducción de la calidad proteica es el efecto nutricional más importante de la reacción de Maillard sobre un alimento. La calidad proteica puede reducirse durante el procesamiento de los alimentos, tanto a nivel industrial como doméstico, mediante la formación de compuestos de Amadori con la lisina en las etapas tempranas de la reacción. La principal causa de pérdida de valor nutritivo se produce aquí cuando el aminoácido se queda bloqueado y pierde parte de su disponibilidad al no poder ser absorbido por imposibilidad de acceso del enzima al lugar de ataque del aminoácido (Marín, 1981; Hurrell, 1984). No obstante hay que tener en cuenta que el aminoácido no se destruye, puesto que todavía puede ser recuperado por hidrólisis ácida (Mauron, 1985; Hurrell y Finot 1985). Cuando las condiciones del proceso son más severas, la lisina se llega a destruir así como la cistina, histidina, triptófano y metionina (Hurrell y col., 1983). Este autor estudió el

comportamiento de la lisina contenida en leches en polvo, con un 2,5% de humedad, cuando se almacenaba varias semanas a dos temperaturas. Cuando la leche se mantenía a 60°C, a las 9 semanas de almacenamiento el producto conservaba su color natural; sin embargo alrededor del 40% de lisina se había bloqueado en forma de lactulosil-lisina. Por el contrario, si la temperatura de almacenamiento se subía a 70°C, ya en las dos primeras semanas, el 50% de la lisina se bloqueaba, aunque el producto todavía conservaba su color natural y sólo a partir de las tres semanas tomaba una tonalidad marrón-rojiza, como consecuencia de la degradación de la molécula de lactulosil-lisina.

In vitro se ha observado, que las proteínas que han experimentado la reacción de Maillard, no son completamente digeridas por las enzimas digestivas (Ford y Salter, 1996), y su valor nutritivo medido por estudios del crecimiento en animales o por estudios de utilización neta de proteínas también se reduce. Sin embargo, poca excreción de producto de Maillard ha sido encontrada en las heces (Henry y Kon, 1950) Nesheim y Carpenter (1967) han sugerido que la flora bacteriana gastrointestinal puede degradar los aminoácidos dañados por el calor de modo que no sean excretados en las heces. Pero Valle-Riestra y Barnes (1970) y Pronnczuk y col. (1973) han proporcionado pruebas de que los aminoácidos son absorbibles y posteriormente excretados en la orina.

Al comparar el comportamiento de la lisina con el de la metionina o triptófano bajo las mismas condiciones, los autores vieron que a 60°C ambos aminoácidos mantenían su estabilidad, pero a 70°C disminuía progresivamente y se originaba un empeoramiento de sus digestibilidades.

El primer caso es un claro ejemplo de la fase temprana de la reacción de Maillard, no hay coloración y parte del aminoácido se bloquea. En el segundo caso se instaura ya la fase más avanzada en la que se bloquea mayor proporción de lisina, se implican otros aminoácidos en el proceso y se produce el pardeamiento (Mauron, 1981).

Marín (1985b) justificaba el deterioro proteico de modo parecido, e indica que en la

etapa temprana de la reacción se produce la pérdida de valor nutritivo de la proteína por bloqueo del grupo ϵ -NH₂ de la lisina; a medida que avanza la reacción, la degradación del compuesto de Amadori de la lisina conlleva la destrucción del aminoácido y, además, la posible formación de enlaces cruzados que disminuirían la disponibilidad de metionina y triptófano.

La pérdida de aminoácidos o de su disponibilidad, en función de la intensidad de la reacción, se pone de manifiesto también en los trabajos de Hurrell y Carpenter (1982) quienes realizaron un estudio comparando la disponibilidad de estos dos aminoácidos limitantes para la rata. Utilizaron ratas que ingirieron leche en polvo sometida a dos temperaturas distintas. Cuando la temperatura era de 80°C la disponibilidad del triptófano disminuía menos que la de la lisina. Sin embargo, al elevar la temperatura a 100°C, el triptófano era menos disponible que la lisina. Así mismo, Dowschak y Hegadus (1974) encontraron que el triptófano era el aminoácido limitante para las ratas, en leche severamente calentada.

La biodisponibilidad de los compuestos de Amadori, formados en las etapas iniciales de la reacción, ha sido estudiada también por Finot y col. (1977a) quienes hallaron en leches calentadas de un 22,5% a un 10% de lisina en forma de base de Schiff y pensaron que ésta podía ser biológicamente disponible para las ratas. No obstante en trabajos posteriores (1977b) vieron que aunque el producto de Amadori, resultante de la reacción de la fructosa con la lisina, era parcialmente absorbido por el intestino, no se utilizaba y concluyeron que dicho compuesto no era utilizable para la rata.

Adrian y Frangne (1973) prepararon premelanoidinas, por calentamiento de una solución de glucosa y glicina, y las añadieron a una dieta para ratas con un 10% de caseína. Encontraron depresión del crecimiento, mayor excrección fecal de nitrógeno, lo cual se traduce en menor digestibilidad de la proteína y pérdida de valor biológico.

Estudios llevados a cabo con melanoidinas ¹⁵N-no dializables mostraron que un 76% de las melanoidinas de la dieta eran excretadas en las heces de las ratas (Homma y col. 1981).

Buraczewska y col. (1967) estudiando la influencia del calentamiento de filetes de bacalao sobre la digestión, encontraron que, en los animales alimentados con la proteína dañada, el contenido intestinal en aminoácidos y pequeños péptidos era mucho mayor que en los controles. Sin embargo, en la vena porta, la concentración de aminoácidos era mucho más baja. Los autores interpretaron este resultado como una obstaculización de la absorción de aminoácidos, por saturación de los lugares del transporte a través de la barrera intestinal.

La pérdida por bloqueo o destrucción de los aminoácidos no es el único daño producido en la proteína. Si así fuera, sería suficiente añadir los aminoácidos perdidos al alimento dañado para recuperar el valor nutritivo. Sin embargo, esto no sucede siempre así. Rao y col (1963) calentando caseína con glucosa, encontraron un descenso en el PER de 2,6 a 0,7. Al añadir la lisina y metionina perdidas, la recuperación sólo se alcanzó hasta un valor de 2,2. Brueggeman y Erbersdobler (1968), suplementando polvo de leche, encontraron resultados similares. Sgarbieri y col. (1973) observaron que al suplementar la proteína de albúmina de huevo que había experimentado la Reacción de Maillard con los aminoácidos destruidos por esta reacción, el valor nutricional se restauraba hasta un 84% respecto a esta misma proteína no calentada. En concordancia con estos autores Rogers y Harper (1965) concluyeron que era preciso añadir un suplemento adicional de un 14% más de aminoácidos a la caseína parda para igualar el índice de crecimiento de un grupo de ratas que tomaron caseína cruda. Estos resultados indican que los productos de la reacción de Maillard tienen efectos antinutritivos además de la destrucción o bloqueo de aminoácidos.

Las reacciones que suceden en la etapa avanzada de la reacción de Maillard conducen a la destrucción de lisina, a la disminución de la digestibilidad proteica y a la reacción de las premelanoidinas con otros aminoácidos, en particular con la histidina, arginina y quizá también, con el triptófano y la cisteína (Hurrell, 1990). Otros aminoácidos esenciales, tales como el triptófano y la metionina, posiblemente por su reacción con otros compuestos intermedios activos, tales como las dicarbonilos y los aldehídos (Finot y col. 1982, Hurrell y col, 1983, separata de Mauron, influence of processing on protein quality) también son destruidos. En general hay una reducción de la biodisponibilidad de todos los aminoácidos

esenciales. Tales descubrimientos se explican a través de la formación de enlaces cruzados profusos entre las cadenas laterales via los productos reactivos procedentes de las escisiones. Estas reacciones cruzadas disminuyen la digestión de las proteínas evitando la penetración de enzimas o enmascarando los sitios de ataque enzimático (Marin, 1985).

Los productos de la etapa avanzada de la reacción de Maillard parecen reaccionar con el triptófano destruyéndolo, tal como muestra Finot y col (1982) en un sistema modelo empleando la técnica de colorimetría. Por el contrario, Nielsen y Hurrell (1983) detectaron una destrucción mínima (4%) de triptófano en los mismos productos procedentes de la etapa avanzada cuando el triptófano se determinó tras su hidrólisis alcalina y mediante HPLC tampoco detectaron una disponibilidad reducida de triptófano en ratas. Por lo tanto, se puede concluir que el triptófano es estable durante la etapa avanzada de la reacción de Maillard y que su disponibilidad no está disminuida mientras que la digestibilidad proteica no este afectada.

Adrian (1974) sugiere un efecto indirecto de los productos de la reacción sobre la utilización de la proteína dietaria, ya que la fracción soluble en agua de la reacción glucosilisina reduce la digestión de la caseína "in vitro" e "in vivo" en ratas, incrementando la excrección urinaria de N_2 . Además, los productos de bajo peso molecular, formados a partir de la misma mezcla, afectan a la utilización de los aminoácidos derivados de la proteína dietaria (Öste y Sdodin, 1984) y diferentes compuestos heterocíclicos, formados durante la reacción, inhiben los enzimas aminopeptidasa N y fundamentalmente, carboxipeptidasa A, pudiendo influenciar la utilización de la proteína dietaria si se encuentra en suficiente cantidad. Estos hallazgos, por tanto reforzarían la idea de que los productos de la reacción de Maillard pueden tener efectos antinutritivos.

2.3.3.1.1.2. Minerales

Los productos de la reacción de Maillard interfieren con el metabolismo de los minerales, datos experimentales demuestran que producen modificaciones en la excrección

urinaria de zinc (Freeman y col. 1975) y también de otros elementos como el cobre, hierro (Stegink y col. 1981) y calcio (Rendelman, 1987).

En 1975, Freeman y col. observaron que pacientes a los que se les administraba por vía parenteral una solución que contenía azúcares y aminoácidos esterilizados conjuntamente, presentaban una excrección urinaria de zinc más alta. Sin embargo, aquellos pacientes que tomaban dicha solución via nasogástrica u otra solución, cuyos componentes habían sido calentados separadamente, no veían su eliminación de zinc incrementada. En consecuencia, estos autores propusieron que se producía una reacción entre los azúcares y aminoácidos que originaban productos con capacidad de quelar el zinc a nivel metabólico y aumentar su excrección actuando sobre procesos reabortivos del riñón.

Años más tarde, en el mismo tipo de pacientes Stegink y col. (1981) describieron un efecto semejante para los cationes cobre y hierro.

Aspe (1992) observó que la adición de caseína a una disolución de calcio iónico originaba una redistribución del elemento de forma que parte del mismo precipitaba, tanto más cuanto más se había calentado la proteína. Además, si el tratamiento térmico se lleva a cabo en presencia de glucosa y fructosa la precipitación cálcica se agrava, lo cual puede atribuirse a los productos formados en la reacción de Maillard (Aspe y col., 1993). Esta influencia negativa en el caso de la sacarosa sólo se manifiesta a 200°C cuando el disacárido ya se había desdoblado.

Esta conclusión también puede aplicarse al cobre y el hierro, aunque se ha comprobado que en el último caso las reducciones en la retención del hierro se producen mediante mecanismos independientes de las reacciones de Maillard.

Datos experimentales en ratas confirman el efecto de los productos de la reacción de Maillard favoreciendo la excrección urinaria de diversos cationes. En 1980, Andrieux llevó a cabo un ensayo en ratas que consumieron una dieta con un 3% productos de la Reacción

de Maillard. Dichos animales presentaron una disminución en su retención de Ca, P, Mg y Cu.

Pzonczuk (1973) estudiando los efectos de la reacción en cuestión en los mismos animales alimentados con dietas tostadas, observó que excretaban compuestos de peso molecular entre 3000-5000. Este mismo fenómeno se produjo en los trabajos de Johnson y col. (1983) en humanos, los sujetos que consumieron copos de maiz tostados excretaron compuestos parecidos, que al ser cromatografiados vieron que eran de alto peso molecular y ligantes de zinc. Según Rendelman, (1987) estos compuestos se comportaban como polímeros aniónicos formando complejos moderadamente estables con algunos cationes, de tal forma que al introducirlos en dietas para animales, podrían afectar su biodisponibilidad.

Los resultados obtenidos en trabajos experimentales realizados con ratas alimentadas oralmente con dietas que contienen productos de la reacción, muestran elevadas excreciones urinarias de cationes: entre ellos el zinc, suele ser el más comúnmente señalado (Furniss y col, 1986, 1989; Fairweather-Tait y Symms, 1989; Hurrell, 1990), mientras que el calcio, el hierro y el cobre parecen menos modificados (Hurrell, 1990).

Cuando Aspe (1992) preparó dietas que contenían caseína calentada a 150°C en presencia de azúcares reductores y se las administró a ratas, observó una influencia discretamente negativa sobre la disponibilidad de calcio que se ejercía preferente o exclusivamente a nivel metabólico. Esto se puede relacionar con las premelanoidinas que han debido formarse. También la eficacia metabólica del hierro disminuye lo cual se traduce en pérdidas globales de la biodisponibilidad del elemento. En lo que respecta al zinc, el tratamiento en presencia de glucosa-fructosa indujo una serie de cambios que incidieron negativamente en la utilización del zinc. La biodisponibilidad del zinc dietético estaba negativamente afectado por la formación de melanoidinas que comprometían incluso al zinc endógeno.

En humanos, Johnson y col (1983) y Lykken y col. (1986) no encontraron cambios en las eliminaciones urinarias de hierro, cobre y zinc, aunque si que observaron diferencias

en lo que respecta a la retención de ^{65}Zn y la distribución de peso molecular de las sustancias ligantes de Zn de la orina.

El incremento de la zincuria se ha atribuido a las premelanoidinas que podrían quelar al zinc en el intestino o después de su absorción y ser excretadas en la orina (Furniss y col. 1989); aunque también se especula que puedan tener un efecto directo sobre los procesos reabsortivos del riñón. (Furniss y col., 1989, Stegink y col., 1977). Sin embargo, en opinión de los distintos autores, estas pérdidas urinarias no conducen a cambios en los niveles tisulares del zinc y coinciden al señalar que la biodisponibilidad del elemento no se modifica, lo cual explican al considerar que la eliminación de zinc por la orina es una ruta metabólica minoritaria de excrección en comparación con la fecal (Hurrell, 1990; Fairweather-Tait y Symss, 1989).

Además, Furniss y col. (1989) proponen que la homeostasis del elemento podría ser mantenida por pequeños cambios adaptativos en las pérdidas de zinc por heces, así como aumentando la absorción, y/o disminuyendo la excrección de zinc endógeno.

En ensayos "in vitro" ha podido verse que las muestras más oscurecidas ligaban más zinc y tras la administración oral a voluntario, se comprobó que la mejores absorciones del elemento se producían a partir de los productos menos coloreados, lo que achacaron a que los derivados de la reacción de Maillard fijaban el zinc y consecuentemente lo hacían menos disponible para la absorción (Lydden y col., 1986). Aunque Hurrell (1990) en un estudio similar realizado en ratas no encontró influencia alguna de estos compuestos sobre la excrección fecal de ningún mineral, tras el análisis crítico que realiza sobre los resultados de diversos autores, concluye que las premelanoidinas, absorbidas, son las responsables de las elevadas excreciones urinarias de zinc, mientras que las melanoidinas, no absorbibles, pueden disminuir su paso a través de la barrera intestinal y en consecuencia, aumentar su excrección fecal. Adrian (1974) ha mostrado como las premelanoidinas solubles en agua reducen la digestibilidad proteica y afectan la utilización de los aminoácidos absorbidos.

2.3.3.1.1.3. Vitaminas

Aunque este punto ha sido poco estudiado existen evidencias de que las premelanoidinas pueden reaccionar y destruir ciertas vitaminas. Así, se han encontrado pérdidas moderadas de vitamina B₆ y tiamina en leches en polvo almacenadas a 60°C. La tiamina tiene un grupo amino y la vitamina B₆ o piridoxal un grupo aldehído y ambos podrían teóricamente participar en reacciones tipo Maillard. Al aumentar la temperatura a 70°C se produce una dramática destrucción de tiamina, B₆ y B₁₂ y ácido pantoténico que transcurre paralelamente con la degradación de la lactulosil-lisina y la aparición de productos de la reacción avanzada de Maillard, con lo que las vitaminas podrían haber reaccionado con las premelanoidinas formadas (Ford y col., 1983).

La formación de LAL ha sido exhaustivamente estudiada por Finot (1983). Se ha observado en ensayos con ratas que su ingestión provoca una lesión en el riñón conocido como citomegalia y por lo tanto es un problema toxicológico y no nutricional. La citomegalia sin embargo no se ha visto que la LAL haya sido inducido la citada lesión en otras especies animales como el conejo, perro o mono, e incluso su efecto es reversible en ratas. Sin embargo, es preciso que se fijen límites para este compuesto en fórmulas infantiles. (Hurrell y col. 1989).

2.3.3.1.2. Formación de sustancias antinutritivas y tóxicas

Otro aspecto negativo de la reacción de Maillard es la posible formación de sustancias antinutritivas e incluso tóxicas. Adrian (1974) indicó, por primera vez que las premelanoidinas podrían deprimir el crecimiento. Además añadiendo premelanoidinas a una dieta carente de proteína vio que, aunque el nitrógeno podría ser asimilado y retenido por el organismo, esto no beneficiaba al estado fisiológico de la rata, sino que lo agravaba. Se producía hipertrofia del hígado y también de riñón.

Bleumink y Young (1968) indicaron la influencia de la reacción de Maillard en

fenómenos alérgicos. En la leche, la alergenidad se atribuye a la β -lactoglobulina y su reactividad, sin calentamiento, es baja. Sin embargo cuando reacciona con lactosa durante un proceso térmico, su capacidad alérgica se desarrolla considerablemente. La determinación de fluorescencia y lisina disponible indicaron claramente que se había producido una reacción de Maillard. En nuestro laboratorio, con caseína y glucosa y caseína, glucosa y fructosa se ha comprobado que el calentamiento modificaba la respuesta inmune cuando se utilizaba como fuente de proteína para la rata (Marcos y col. 1991).

2.2.2.1.3. Formación de sustancias mutagénicas

En la reacción de Maillard se forman numerosos productos intermediarios, como las reductonas y osonas, que son altamente reactivos y parecen producir efectos fisiológicos sobre los organismos vivos. Al estudiar sus propiedades bioquímicas se ha observado que entre sus numerosas actividades está la capacidad de romper ácidos nucleicos, la mutagenicidad de la reductona triosa, sus productos de condensación con aminoácidos y ácido ascórbico (Sugimura y col. 1977, Shinohara y col. 1974).

Shinohara y col. (1980, 1983) estudiaron la mutagenicidad de mezclas de glucosa con aminoácidos calentados a 100°C. Los resultados demostraron que la mutagenicidad dependía del tipo de aminoácido y de las condiciones de la reacción. También Mauron (1981) observó que se producía la formación de mutágenos al cocinar hamburguesas de carne de ternera a más de 200°C. Otros trabajos también indican que la corteza en la carne frita y en el pescado broiled también presentan actividad mutagénica (Sugimura y Nagao 1979, Kasai y col. 1980, Kasai y col. 1981).

Omura y col. (1984) observaron que la reacción de Maillard originaba diversos mutágenos débiles a partir de 20 aminoácidos con azúcares a 100°C. Estudió la mutagenicidad a través del test Ames con *Salmonella tryphimurium* TA 100 y TA 98. De acuerdo con lo anteriormente citado, la actividad mutagénica variaba con la naturaleza del aminoácido o el azúcar, el valor de pH siempre se incrementaba al elevar la temperatura.

Según Mauron (1985) en las etapas iniciales de la reacción de Maillard, cuando aún no hay formación de color, no se forman mutágenos. La mutagenicidad aparece con la formación de color y aumenta paralelamente a la formación de premelanoidinas, pero disminuye al final de la reacción cuando se producen los pigmentos negros melanoidinas.

2.3.3.2. Consecuencias favorables

Cuatro años antes de que Maillard descubriera la reacción que lleva su nombre, Ling había visto el efecto favorable que el calentamiento producía en el aroma de los alimentos. Cuando la reacción se conoció, despertó un gran interés entre los investigadores, al principio dirigido a la formación de color y aroma (Namiki, 1988).

Hodge y col. hicieron varias revisiones sobre el origen y la formación de aroma y color en el alimento (Hodge, 1967; Hodge y col. 1972). La calidad nutritiva de un alimento no depende de las cualidades organolépticas, los alimentos que apetecemos contienen grandes cantidades de compuestos de bajo peso molecular que contribuyen a dar buen sabor y , al ser normalmente derivados de Maillard, son fuente de aromas y sabores que desea el consumidor.

Las pentosas, como es sabido, son más susceptibles a la reacción de Maillard que las hexosas y, como han visto Kirigaya y col. (1968) y Lingnert y Eriksson (1980), inducen antioxidantes más enérgicos que la glucosa en su reacción con aminoácidos.

Entre los aminoácidos la arginina, histidina y cisteína mostraron la actividad antioxidante más fuerte (Kirigaya y col. 1968).

Otra consecuencia beneficiosa de esta reacción es la capacidad antioxidante de sus derivados, formados por glucosa, fructosa o xilosa y los aminoácidos arginina, cisteína , ácido glutámico, histidina, lisina o valina fue estudiada por Lingnert y Eriksson (1980). Observaron que la histidina y lisina formaban antioxidantes potentes con cualquier azúcar, mientras que la arginina sólo lo hacía con xilosa y el ácido glutámico no mostraba actividad en ningún

caso. La capacidad antioxidante incrementa con la formación de color en las primeras etapas, pero alcanza un máximo y decrece si continúa el calentamiento (Lingnert y Eriksson, 1981).

La utilidad de esta capacidad de formación de antioxidantes es especialmente importante en el procesado de alimentos. Lingert y Eriksson (1981) vieron que la adición de una mezcla de histidina y glucosa en una galleta tipo "cookie" antes del horneado era un antioxidante eficaz y su actividad se incrementa paralelamente.

Algo que hay que tener en cuenta, al analizar los resultados obtenidos por los diferentes investigadores sobre la capacidad antioxidantes de los derivados de Maillard, es la dependencia del pH inicial, tiempo y relación molar entre las sustancias reaccionantes. Beckel y Waller (1983) vieron que, en la reacción de arginina-xilosa, los mejores resultados se obtenían con la relación molar 1:1, temperatura de 100°C, tiempo entre 10-20 horas y un pH inicial de 5.

En lo que se refiere a la reacción de Maillard en relación con los lípidos, estos tras su autooxidación producen compuestos carbonilos, que pueden reaccionar con compuestos amino para formar productos de alto peso molecular.

Un tercer efecto beneficioso fue observada por Einarsson y col. (1983) quienes encontraron que los productos de la reacción de Maillard obtenidos entre la arginina y xilosa así como entre histidina y glucosa tenían un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacterial. Posteriormente, Einarsson (1987) con mezclas de arginina-glucosa, arginina-xilosa e histidina-glucosa, estudió el efecto del tiempo, temperatura y pH sobre la formación de compuestos antibacterianos. Encontró que eran más dependientes del aminoácido que del azúcar. El pH óptimo era 9, como habían encontrado Lingnert y Eriksson (1981), para la mayor actividad antioxidante. El incremento de la temperatura produjo una formación más rápida de color y de sustancias inhibitorias. En definitiva, la formación de compuestos antibacterianos sigue la cinética general de la reacción de Maillard.

2.4. EFECTOS DEL CALENTAMIENTO DOMESTICO: MICROONDAS

El procesamiento por microondas se conoce hace más de cuarenta años. Las microondas son emitidas por un dispositivo electrónico, denominado magnetrón que convierte la energía eléctrica de baja frecuencia en un campo electromagnético que emite energía radiante de alta frecuencia (Fernández, Artacho, 1994). Debido a que las frecuencias de las microondas en el espectro electromagnético se sitúan entre la radiación infrarroja y las ondas de radio, se acordó que la frecuencia de las microondas comerciales fuera de 2450 en la mayoría de los países (por ejemplo España) ó 915 MHz para evitar interferencias (Giese, 1992). A 2450 MHz las microondas penetran hasta 10 centímetros en el alimento y a 915 MHz penetran hasta 30 centímetros (IFT, 1989) y por lo tanto el calor se genera al mismo tiempo en la superficie y en el interior del alimento, hasta dicha profundidad. La capacidad que tiene un alimento para absorber las microondas viene determinado por sus propiedades dieléctricas, y su capacidad de disipar el calor es función del calor específico y de los coeficientes de conductividad (Metaxas y Meredith, 1983, Mohsenin, 1984).

En los métodos de calentamiento convencionales el calor se aplica al exterior del alimento y se transfiere al interior por conducción, principalmente. Sin embargo, las microondas calientan a través de dos mecanismos: rotación dipolar y polarización iónica (Decareau y Peterson, 1986, Berteaud y Delmonte, 1993). La rotación dipolar se produce cuando las moléculas polares (agua, proteínas, carbohidratos) intentan alinearse con el campo electromagnético, la fricción intermolecular que resulta debido a la rotación produce calor y rompe los puentes de hidrógeno débiles. Por su parte, la polarización iónica tiene lugar en muestras que contienen iones tales como electrólitos, los iones positivos experimentan una migración electroforética hacia el polo negativo y los iones negativos hacia el polo positivo, durante este desplazamiento colisionan con otras moléculas e iones y esto genera calor (Yeo et al, 1991). Como consecuencia, resulta una característica importante de las propiedades físicas de las microondas y de sus interacciones: la rapidez con que se produce el calentamiento y su heterogeneidad comparado con el calentamiento convencional.

Harrison (1980), resumió los factores que afectan al tiempo de calentamiento por microondas de un alimento en los siguientes puntos: a) su temperatura inicial, cuanto más alta sea más rápido será el calentamiento para calentarlo; b) su densidad y homogeneidad, cuanto más denso sea el alimento se necesita más tiempo y cuanto más homogéneo sea, mayor y más igualada será la absorción de las microondas por el mismo y como consecuencia el proceso tardará menos; c) su forma, si es regular se calentará más deprisa que si es irregular; d) su cantidad, normalmente existe una relación lineal entre la cantidad de alimento y el tiempo de calentamiento. Una de las aplicaciones más prácticas del horno microondas es la preparación de biberones, sobre lo cual trata esta memoria.

Las ventajas que el calentamiento en hornos microondas presenta respecto a otros más tradicionales son: limpieza, ahorro de energía, control preciso del proceso y los tiempos de iniciación y terminación son más cortos (Decareau, 1985). Por estos motivos el uso de microondas en la industria alimentaria, en los servicios de catering y en el ámbito doméstico se han ido incrementado rápidamente. Hoy en día se emplean para: descongelar, calentar, recalentar, blanquear y cocinar.

Sin embargo una de las principales desventajas del calentamiento por horno microondas radica en que en no se pueden obtener alimentos ni tostados ni crujientes (Fernández, 1994). Ello se debe fundamentalmente a que la temperatura que se alcanza en la superficie del alimento es inferior a la que se precisa para que se desarrolle la reacción de Maillard, lo cual afecta negativamente a la calidad organoléptica resultante. Por esto el horno microondas se usa a menudo como utensilio para calentar y recalentar, más que como una herramienta para cocinar a no ser que se le acople un sistema de grill. Otro aspecto señalado como inconveniente del procesamiento con microondas es que sea menos efectivo en destruir microorganismos que el convencional debido a que el tiempo necesario para alcanzar la temperatura deseada es corto y en el interior del alimento ésta no es homogénea (Dahl et al 1978, Ockerman y Crespo, 1977). Estos aspectos negativos del empleo de microondas deben ser conocidos y compensados por sus ventajas y además conseguir mantener la calidad nutricional del alimento.

2.4.1. Efectos nutritivos:

Jonsson (1989) indicó que no parecía que existiera ningún efecto especial *per se* en los alimentos debidos a las microondas, sino que las pérdidas en el valor nutritivo se debían a los efectos de la elevación de temperatura, tiempo de cocción y al empleo de agua durante el calentamiento, tal como sucede con los tratamientos convencionales. Este último punto ya había sido destacado por diversos autores, así Thomas y col. (1949) y Mabesa y Baldwin, (1979) señalaron que cuando los vegetales se preparan en agua, el tiempo de cocción y la cantidad de agua empleada son factores determinantes de la retención de nutrientes.

Ciertamente, con el microondas los alimentos se exponen menos tiempo a temperaturas elevadas, por lo que cabe pensar incluso que exista un menor riesgo de pérdidas de nutrientes esenciales sensibles al calor, y por lo tanto un aumento del valor nutritivo del producto cocinado. No obstante, este es un punto muy discutido y en la bibliografía se encuentran datos contradictorios como indican Pineda y col. (1994) en su revisión.

De forma similar, la pérdida de nutrientes por lixiviación parece más atenuada cuando el procesamiento se realiza por microondas respecto al tradicional, ya que los tiempos de cocción son más cortos (Chung y col. 1981, Kahn y Livingston, 1970).

2.4.1.1. Proteínas

De la revisión bibliográfica realizada por Cross y Fung (1982) se deduce que el calentamiento por microondas puede ayudar a conservar la proteína total en los alimentos. Así, el contenido en aminoácidos libres es mayor en la carne cocinada mediante sistemas clásicos que la cocinada por microondas. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Salama (1993), que indicó que el porcentaje de proteína era mayor en la pechuga y muslo de pollo cocinados en microondas que de forma convencional, lo que explicó por las mayores pérdidas de proteína soluble y formación de aminoácidos libres que se producen en el horno convencional.

Tsen (1980) pudo comprobar una mayor retención de lisina debida a una reducción de las interacciones aminoácido-azúcares (reacción de Maillard) durante la elaboración del pan en microondas respecto al horno convencional. El PER (protein efficiency ratio) fue más alto. En trabajos posteriores, Tsen y col. (1983) describieron que el pan horneado convencionalmente, cuya corteza estaba tostada, frente al pan horneado al microondas o al vapor, con corteza más clara, al ser administrados a ratas presentaban un PER de 0.32 y 0.90, respectivamente. La reacción de Maillard que desencadenaba solo en el primero de los casos era responsable de la disminución del valor nutritivo de este alimento. Jonsson (1989) obtuvo resultados semejantes y los atribuyó a que en la cocción con microondas no se produce la reacción de pardeamiento y como consecuencia la disponibilidad de los aminoácidos permanece alta, especialmente la de la lisina.

Con sistemas modelo se ha comprobado la racemización de aminoácidos por calentamiento en microondas en condiciones drásticas (Chen et al, 1989). Así bajo las condiciones experimentales aplicadas por Lubec et al (1989) se detectó la presencia de D-prolina y cis-3 y cis-4 hidroxiprolina en formulas infantiles tras ser calentadas mediante microondas. Se sabe que la D-prolina es neurotóxica y que las formas cis de los aminoácidos pueden inducir cambios estructurales, funcionales e inmunológicos si se incorporan a las proteínas. La isomerización de los aminoácidos afecta negativamente al valor nutritivo de las proteínas, por ejemplo creando enlaces peptídicos resistentes a las enzimas proteolíticas (Friedman et al 1981, Bunjapamai et al 1982, Tovar y Schwass, 1983; Friedman y Gumbmann, 1984). Por estas razones las autoridades sanitarias recomendaron no emplear los hornos microondas para calentar las formulas infantiles.

Fue a partir de 1991, cuando empezaron a esclarecerse las ideas con respecto a este tema. Fay et al (1991) llevaron a cabo un ensayo en que sometían a distintas fórmulas infantiles a tratamientos más o menos intensos y largos, dentro del margen de las condiciones domésticas y posteriormente determinaron la proporción de D-amino ácidos en cada caso. No observaron ninguna diferencia entre las fórmulas tratadas y sin tratar. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Marchelli y col. (1992) quienes estudiaron la presencia de

enantiómeros D, tanto en aminoácidos libres o formando parte de una proteína, en distintas muestras de formulas infantiles sometidas a ambos tipos de calentamientos en condiciones domésticas. Detectaron un porcentaje muy pequeño de formas D/D+L sin que existieran diferencias significativas entre las formulas tratadas y sin tratar.

Jonker y Plenninks (1992) realizaron un estudio comparativo del valor nutritivo de soluciones de caseína calentadas con microondas y convencionalmente, en animales de experimentación. Las condiciones, que simulaban condiciones domésticas, fueron similares en ambos casos: $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos. Los resultados no mostraron diferencias en el valor nutritivo de dichas proteínas entre los dos tipos de tratamientos. Por lo tanto, la alarma que surgió en relación con la posible racemización de aminoácidos carece de sentido cuando se reproducían condiciones domésticas.

2.4.1.2. Hidratos de Carbono

En la desecación por microondas de zumos de frutas con objeto de obtener concentrados, el contenido en azúcares permanece invariable (Rosenberg et al, 1987).

Algunos autores emplean la presencia de aldehídos como un parámetro indicador de la degradación de los alimentos por procesamiento térmico. Dworsschak (1976) propone al hidroximetilfurfural como índice de calidad y valor nutricional en los alimentos infantiles. Burton (1984) también consideró este aldehído, junto con otros parámetros, como un buen indicador de la calidad de la leche tratada térmicamente. Así, estudios realizados por Fernández Márquez y col. (1992) comparando la desecación de leche en polvo en un horno microondas frente a una estufa convencional muestran que se obtiene un mayor contenido en hidroximetil-furfural con el primer método.

Como ya se ha dicho, los alimentos cocinados en un horno microondas a menudo carecen del sabor y textura tan apetecible que presentan cocinados convencionalmente. Yeo

et al (1991) atribuye este hecho a que el tiempo de cocción sea corto y la temperatura que se alcanza sea baja, y por lo tanto, a que no se induzca la reacción de Maillard, que origina muchos compuestos responsables de las características organolépticas del producto. Yin (1995) hizo una comparación cualitativa entre panes horneados por métodos convencionales frente a hornos no convencionales, entre ellos el microondas, y observó que debido a el calor específico, al coeficiente de conductividad y al tiempo de horneado mucho más corto con el horno microondas, resulta un producto sin corteza con una textura más dura, más gruesa pero menos firme. El autor atribuyó estas características del producto final a que la gelatinización del almidón es insuficiente, a los cambios que se generan en el gluten, y a la rápida formación de gases y vapores en el interior del pan.

Los compuestos que se forman durante la cocción con microondas son: tiazol, 2,5-dimetiltiazol, 4,5-dimetiloxazol, 2-metilpiridina y 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona. La presencia de cantidades más grandes de pirina en las muestras sometidas a microondas indica que se produce muy poca fragmentación de azúcares durante la irradiación, probablemente debido a que poca energía está implicada. Sin embargo en el calentamiento convencional se forman: 2-metil-pirazina, 2,6-dimetilpirazina, 2-furanometanol, y 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona, pirazinas y furanos, que contribuyen a mejorar la palatabilidad de un alimento. Las cantidades más bajas de estos compuestos en la cocción con microondas se pueden deber a que su bajo índice de formación o a pérdidas por volatilización o destilación en el agua (Yeo, 1991).

Los estudios llevados a cabo por Ji (1992) tenían como objetivo ver que papel juega el calentamiento por microondas, frente al convencional, en la formación de pirazinas. Para ello empleó un modelo constituido por glucosa, glicina y una base. Los resultados obtenidos mostraban claramente que el sistema de calentamiento, el tiempo y la temperatura de cocción influían determinantemente en la formación de pirazinas y su distribución.

2.4.1.3. Lípidos

Los efectos del tratamiento térmico con microondas sobre la grasa han sido ampliamente estudiados. Se ha planteado la posible oxidación de los lípidos, racemización de ácidos grasos a formas trans u otras formas de deterioro. En algunos casos estos fenómenos han sido comparados frente a formas de calentamiento tradicionales.

Lorenz (1976) realizó estudios sobre la composición lipídica de ternera, pollo y huevos calentados de forma convencional o por microondas, y observó que se producían pequeñas diferencias en el contenido total de grasa y composición en ácidos grasos, pero no detectó cambios conformacionales inducidos por las microondas. Sus trabajos fueron confirmados por los de Mai y col (1980), que tenían como fin esclarecer si la cocción con microondas causaba la isomerización de ácidos grasos insaturados u otro tipo de alteración en el patrón de los ácidos grasos y dieron resultados negativos, es decir no existía evidencia de alteraciones químicas o de isomerización. Sin embargo, Maga y col. (1977) describieron que la cocción en microondas inducía la isomerización cis a trans de los ácidos grasos insaturados de las patatas.

Pikul y col. (1984), King y Bosch (1990) y Salama (1993) demostraron más recientemente que el deterioro lipídico que puede producirse en el calentamiento por microondas es siempre menor que el encontrado en el calentamiento convencional. Ya en 1993, Schiller y col. vieron que la clara de huevo calentada en horno convencional sufría una oxidación dos veces mayor, medida por el test del TBA, que calentada en microondas y Angelo y Baily (1987) atribuyeron esta menor oxidación lipídica durante el calentamiento por microondas a una inhibición producida por los antioxidantes derivados de la reacción de Maillard, formados durante el proceso. (esto último no lo veo muy claro)

El calentamiento en horno microondas puede diferir, significativamente, en sus efectos sobre los componentes del alimento, del calentamiento convencional. Zamora e Hidalgo (1992) en un sistema modelo formado por una mezcla de lisina y 4-5-epoxi-2-heptanal

calentado en microondas por diferentes períodos de tiempo obtuvieron resultados que sugerían que los microondas eran capaces de acelerar las reacciones entre aminoácidos y lípidos oxidados. Desafortunadamente, en este trabajo no se compararon estos resultados con los que podrían haberse obtenido si el calentamiento se hubiera hecho también en horno convencional.

Existe cierta información sobre los efectos del calentamiento en microondas de aceites. En ellos se observa que, al igual que con técnicas convencionales de calentamiento, la alteración del aceite está íntimamente relacionada con la composición en ácidos grasos insaturados, la presencia de antioxidantes y las temperaturas alcanzadas en el proceso (Yoshida et al, 1990).

Yoshida et al (1993) observó que el índice de oxidación aumentaba en algunos casos cuando los aceites tenían un alto contenido de ácidos grasos insaturados, pero era relativamente más bajo frente al correspondiente ácido graso saturado. El hecho de que este índice sea más elevada con las microondas puede ser debido a que sencillamente la radiación hace que se incremente la temperatura de la reacción. Sin embargo, parece que existe un efecto adicional en el microondas que hace que la reacción se acelere más de lo correspondiente a la temperatura únicamente.

Una de las diferencias más notables entre las fórmulas infantiles y la leche materna es el contenido en ácidos grasos poliinsaturados, siendo X veces mayor en la primera. Por esto hoy en día existe la tendencia de enriquecer las fórmulas con este componente lipídico buscando mejorar su calidad nutricional. Se ha estudiado la estabilidad de los ácidos grasos poliinsaturados de pescados cocinados en horno microondas en distintos pescados frescos con un contenido en grasa bajo, medio y alto. El efecto de la cocción fue mínimo y no se detectaron diferencias en los lípidos totales entre las muestras cocinadas y sin cocinar y en particular los ácidos grasos poliinsaturados no se vieron afectados y mantuvieron su composición y contenido de ácidos grasos poliinsaturados original (Hearn y col, 1987).

2.4.1.4. Minerales

A diferencia de lo que ocurre con las vitaminas, los minerales son estables a las temperaturas que se aplican en todo tipo de calentamientos domésticos. Por tanto, la pérdida de minerales en el caso que nos ocupa de calentamiento por microondas se puede dar únicamente por su difusión en el agua desde el interior del alimento hacia el exterior (Finot, 1993).

La cantidad de agua y el tiempo de cocción son factores determinantes en la retención de estos micronutrientes (Thomas y col., 1949, Mabesa y Baldwin, 1979). A menor tiempo de cocción y menor cantidad de agua cabe esperar que el procesamiento con microondas permita una mayor retención de minerales.

En este sentido, Baldwin y col. (1974) hallaron que en el interior de carnes que se cocinan se producía una difusión de agua desde el centro hacia la corteza, con la consiguiente migración de los nutrientes hidrosolubles, tal como minerales, vitaminas y aminoácidos libres y en consecuencia las gotas de exsudado presentaban una mayor concentración de estos nutrientes. Por ello y debido a que ese exsudado no suele consumirse con el alimento se consideró que en general los métodos tradicionales de cocinado favorecían una mayor retención de minerales, mientras que el empleo de microondas podría producir ciertas pérdidas (Baldwin, 1976). Así, la carne de ternera, cerdo y cordero cocinada en microondas parecía retener menos sodio, cloro, fósforo y hierro frente a las mismas carnes preparadas de forma convencional (Baldwin y col, 1976). No obstante, Korshgen y Baldwin (1978) observaron una menor retención de potasio en carnes cocinadas por métodos convencionales frente al microondas y Jonsson (1989) indicó que algunos minerales, tal como el potasio, daban retenidos en el alimento porque la cocción en microondas se lleva a cabo con una mínima cantidad de agua.

Klein y col. (1981) estudiaron los efectos del asado convencional y en microondas, sin agua, sobre los componentes nitrogenados y minerales de la patata cocinada entera.

Observaron que con el horno convencional disminuía significativamente el contenido de potasio, el mineral mayoritario, y de hierro, el elemento traza más abundante, de la parte externa incluyendo la piel y que aumentan en el centro de la patata lo que atribuyeron al daño que sufren las membranas de las células de la piel con la consecuente liberación de algunos minerales intracelulares. Ello, unido a la deshidratación que se va produciendo en la parte externa, tendería a incrementar la concentración de K y de Fe en la zona, y se originaría un gradiente de difusión de ambos minerales hacia el interior. Por otro lado, al asar patatas en el horno microondas en estos trabajos se produjo un aumento del contenido de potasio y calcio en el centro y sin embargo no se observaron efectos sobre el fósforo, magnesio ni de los minerales minoritarios. Estos cambios en los minerales aun no han sido explicados. En resumen en lo que respecta a asar patatas, parece que el calentamiento convencional es superior al microondas en cuanto a los minerales, especialmente cuando el tejido de la corteza no se consume.

2.4.1.5. Vitaminas

La pérdida de vitaminas, ha sido estudiada por muchos autores, en alimentos distintos y en diversas condiciones.

La estabilidad de las vitaminas hidrosolubles se ha estudiado en carnes, pescados, y vegetales. Las variaciones observadas entre el calentamiento por microondas y el convencional son debidas, como ya se ha indicado para los nutrientes, a las diferencias de temperatura final, la rapidez de calentamiento, las modificaciones en la transferencia de calor debido a la formación de corteza y al volumen de agua empleado en el proceso (Finot, 1993).

Los resultados de trabajos de investigación coinciden, en general, en atribuir un efecto beneficioso al procesamiento con microondas, debido a que el tiempo de cocción es reducido, no se emplea agua o se emplea poca y a que no se alcanzan temperaturas finales tan altas, como en otros calentamientos más tradicionales, disminuyendo en consecuencia la pérdida de vitaminas. En esta línea, Mudgett (1989) indicó que la retención de vitaminas es mayor en los

alimentos tratados por microondas respecto a otros métodos convencionales, debido a que el tiempo de cocinado es menor; Mabesa y col. (1979) llegó a la conclusión de que la retención de ácido ascórbico es mayor con el microondas ya que la cocción de muchos vegetales se puede llevar a cabo sin agua; y Jonsson (1989) coincidía en que la vitamina B₁ y C permanecen más en el alimento porque la cocción se lleva a cabo en una cantidad mínima de agua. No obstante, algunos resultados no son coincidentes. Así, se ha descrito que las vitaminas B₁ (Goldbith y col. 1968, Bowers y Fryer, 1972), B₂ (Van Zante y Johnsson 1970, Bowers y Fryer, 1972, Medrano *et al*, 1994) y cuatro formas de folato (Cooper y col., 1978) a excepción del 5-metil-tetrrahidrofolato, presentan una estabilidad similar tras el calentamiento por microondas o un calentamiento equivalente de tipo convencional efectuado en las mismas condiciones de pH, temperatura y tiempo. Asimismo, en fórmulas infantiles, Sigman-Grant y col. (1992) no observaron diferencias significativas en las pérdidas de vitamina B₂ y C.

Sin embargo, Uherová y col. (1993) observaron menores pérdidas de vitamina B₁ y B₆ al cocinar carne de cerdo y pollo en un horno microondas comparado con los hornos eléctricos convencionales y en un estudio más antiguo (Goldbith y col, 1968) se encontró que el calentamiento por microondas podía disminuir la proporción de tiamina en una solución tampón en relación a calentamientos tradicionales.

Se ha indicado, que el contenido en tiamina de la leche disminuye como consecuencia del calentamiento con microondas y vieron que este efecto era directamente proporcional a la temperatura final del producto e inversamente proporcional al contenido en grasa de la leche (Vidal-Valverde y Redondo, 1992). Es decir, la grasa actuaba como un factor protector, lo que también había sido descrito por Coulter y Thomas (1968) y por Leu y col. (1986) con respecto a otras vitaminas.

En lo que respecta a vitaminas liposolubles se han llevado a cabo menos estudios. Según Medrano *et al* (1994) el calentamiento mediante microondas, en condiciones domésticas, no afecta, o muy ligeramente, el contenido de α -tocoferol y retinol de la leche

de vaca, especialmente en el caso de leche entera. Esta consideración es importante puesto que la leche es una fuente importante de vitamina A y E en la población infantil.

Yoshida y col. (1970) estudiaron la posible pérdida de vitamina A producida en el calentamiento de diferentes aceites vegetales (colza, soja, maíz oliva y palma) por microondas e intentaron relacionarla con las propiedades químicas de dichos aceites. Obtuvieron que el contenido de esta vitamina disminuía sustancialmente en los aceites de colza, oliva y palma pero en los de maíz y soja se retenía un 90% y, por tanto, concluyeron que la reducción de tocoferoles no estaba necesariamente relacionada con las características de los aceites. Posteriormente, estos mismos autores encontraron que las pérdidas de tocoferoles se producían en el orden $\alpha > \gamma > \beta > \delta$ independientemente del tipo de aceite calentado (Yoshida y col. 1991) e incluso al tratar grasas animales con microondas (Yoshida, 1992).

2.5 EFECTOS DEL PROCESAMIENTO INDUSTRIAL

El objetivo que se persigue al procesar los alimentos es protegerlos y preservarlos, destruir microorganismos, inactivar enzimas, destruir inhibidores y sustancias tóxicas, mantener o mejorar sus propiedades organolépticas, aumentar su digestibilidad e incluso producir unas propiedades físicas y características estéticas deseables.

El conseguir estos objetivos primarios del procesamiento muchas veces implica que se den otros efectos secundarios; éstos pueden ser no deseados como la disminución en el valor nutritivo del alimento, o por el contrario positivos, como la mejora de su aceptabilidad.

El detectar y conocer estos cambios debidos al procesamiento, así como sus repercusiones nutritivas es de gran importancia en general y muy especialmente en determinadas etapas, tal como la infancia en la que la dieta presenta una composición muy restringida e incluso está constituida únicamente por leche de vaca o fórmula infantil.

2.5.1. Pasteurización

Se deben a Pasteur los principios del método de conservación que hoy lleva su nombre. Entre 1866 y 1876, estudiando las alteraciones del vino y de la cerveza, descubrió que un calentamiento moderado, sin sobrepasar la temperatura de 60°C, era capaz de evitar algunas alteraciones de los alimentos al dificultar el desarrollo de los microorganismos que las producen. Hasta 1880, este método no se aplicó a la leche. Un poco después se comprobó que la pasteurización, realizada de una determinada manera, era capaz de destruir también los gérmenes patógenos que frecuentemente contaminan la leche. A partir de ese momento la pasteurización no fue solo un procedimiento de conservación sino también de higienización.

2.5.1.1. Condiciones de la pasteurización. Métodos.

La pasteurización es un tratamiento térmico relativamente moderado que tiene como

fin preservar el producto, en nuestro caso la leche, durante varios días. Ello se debe a la inactivación de enzimas y a la destrucción de microorganismos sensibles al calor, causando cambios mínimos en las características sensoriales y en el valor nutritivo de la leche (Fellows, 1988).

Se entiende por leche pasteurizada la leche natural entera o desnatada sometida a un calentamiento uniforme a una temperatura comprendida entre 72 y 78°C, durante no menos de quince segundos, que asegura la destrucción de los gérmenes patógenos y la casi totalidad de la flora microbiana, sin modificación sensible de la naturaleza fisicoquímica, características y cualidades nutritivas de la leche.

Según la directiva 92/46/CEE de la Unión Europea del 16 de junio de 1992 la leche pasteurizada debe haberse obtenido mediante un tratamiento que utilice una temperatura relativamente alta durante un corto lapso de tiempo (como mínimo 71,7°C durante 15 segundos o cualquier combinación equival) o un procedimiento térmico que utilice diferentes combinaciones de tiempo y temperatura para conseguir un efecto equivalente.

Se pueden distinguir dos grandes tipos de métodos:

La *pasteurización baja* se define como el calentamiento a 63°C durante 30 minutos. Es un método lento y discontinuo, pero presenta la ventaja de no modificar las propiedades fisico-químicas de la leche. No se coagulan las albúminas ni las globulinas y el estado de los glóbulos de grasa permanece inalterado.

La *pasteurización alta* se define como el calentamiento a 72°C durante 15 segundos. El método es rápido y continuo, pero modifica ligeramente las propiedades de la leche, si bien los aparatos modernos reducen este inconveniente. Las albúminas y las globulinas sufren siempre una coagulación parcial. En los países anglosajones la *pasteurización alta* se conoce como procedimiento "high temperature short time" (H.T.S.T.).

Además, de acuerdo a la directiva anteriormente indicada la leche pasteurizada debe de tener las siguientes características:

1° Reaccionar negativamente a la prueba de la fosfatasa y positivamente a la de la peroxidasa. No obstante, se permite la elaboración de leche pasteurizada que reaccione negativamente a la prueba de la peroxidasa siempre que lleve una etiqueta con una indicación del tipo *pasteurización alta*.

2° Enfriarse inmediatamente tras la pasteurización y alcanzar lo antes posible una temperatura que no exceda de 6°C.

3° No contendrá sustancias farmacológicamente activas en autoridades.

La leche pasteurizada se suele someter en la central lechera a las siguientes manipulaciones:

- Limpieza previa por medio de centrifugación o filtración.
- Refrigeración inmediata a una temperatura igual o inferior a 6°C.
- Envasado en recipientes limpios e higienizados y cerrado que asegura la protección contra contaminaciones y adulteraciones.

La leche pasteurizada debe ser conservada durante el tiempo que durante su transporte y comercialización a una temperatura inferior a 6°C, debiendo ser vendida al consumidor dentro de las setenta y dos horas siguientes al día siguiente al envasado. Además, en el envase se indicará la conveniencia de mantenerla en refrigeración.

2.5.1.2. Efectos de la pasteurización sobre el valor nutritivo de la leche

La pasteurización se puede considerar como un tratamiento suave que produce cambios mínimos en las características nutritivas y sensoriales de los alimentos (Fellows, 1988). El compuesto más afectado en la leche es la vitamina C, cuyas pérdidas llegan a un 20 por ciento del contenido original del producto (Ford y col, 1969; Harper, 1976). Sin embargo, estas pérdidas no pueden imputarse por entero a la pasteurización. La leche de vaca en cuanto es expuesta a la luz sufre pérdidas de esta vitamina con gran rapidez, por una reacción

fotoquímica en la que la riboflavina actúa como sensibilizador: en primer término esto da lugar a la formación de ácido dehidroascórbico, forma oxidada de la vitamina C, biológicamente activa todavía, pero muy inestable al calor. Es principalmente esa forma la que se pierde al pasteurizar la leche. Eliminando el oxígeno de la leche antes de pasteurizarla, se evita en gran medida la pérdida de ácido ascórbico durante el tratamiento por calor.

La leche de mujer contiene generalmente más vitamina C que la de vaca, búfalo o cabra (Powers, 1997) leches que cuando se emplean en lactantes, deben de complementarse con esta vitamina. Sólo excepcionalmente la leche de vaca constituye un aporte apreciable de vitamina C en las dietas mixtas. Así, en el Reino Unido durante la segunda guerra mundial, gracias a una ración especial diaria de 1,1 litros de leche, algunas madres lactantes obtenían de este alimento hasta un tercio de toda la vitamina C ingerida.

La tiamina, que es la otra vitamina termolábil de la leche y la vitamina B₁₂ pierden un 10 por ciento en la pasteurización (Fellows, 1988). Por si misma, la vitamina B₁₂ es termorresistente y debería soportar sin pérdida no sólo la pasteurización, sino incluso la esterilización que es más drástica. A pesar de ello, dicha vitamina se reduce durante la pasteurización y es prácticamente destruida por la esterilización. Su labilidad se debe a la reacción mutua con la vitamina C en presencia de oxígeno. De ahí que la eliminación del oxígeno antes de tratar la leche protege no sólo a la vitamina C, sino también a la B₁₂ (Schaafsma, 1995). La leche de mujer contiene una cantidad mucho menor de tiamina y de vitamina B₁₂ que la de vaca (Powers, 1997) por ello, las pérdidas que sufren estas vitaminas en el proceso de pasteurización son de poca importancia para la alimentación infantil.

Renner, (1979) detectó el porcentaje de 5 a 15% de desnaturalización respecto al total de proteínas séricas en la leche pasteurizada. Uno de los primeros productos de la reacción de Maillard, el hidroximetilfurfural está presente en una concentración de aproximadamente 1µmol/L (Renner, 1983). Sin embargo, juzgar por los experimentos realizados en ratas, las pérdidas anteriormente indicadas son muy leves y el valor biológico de las proteínas de la leche pasteurizada disminuye solo muy ligeramente, (Mauron, 1985).

Aunque en conjunto la utilización nutritiva de la proteína de la leche no se afecta apenas por la pasteurización, la alteración de determinadas proteínas, como las inmunoglobulinas, puede tener más importancia. Así, Lyster (1979) observó que las inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM son heterogéneas con respecto a su estabilidad térmica y se desnaturalizan parcialmente por la pasteurización, igual que la proteína ligante de hierro, la lactoferrina. Estas proteínas son menos estables que la mayoría de las proteínas séricas.

Los demás nutrientes de la leche no sufren prácticamente cambio alguno con el tratamiento de pasteurización.

Una prueba de que la leche pasteurizada mantiene un valor nutritivo adecuado es la que ofrecen ciertos experimentos realizados en niños en los que no pudo distinguirse, desde el punto de vista nutritivo, la leche de vaca pasteurizada de la cruda. (CITA)

La pasteurización presenta la ventaja de que previene la lipólisis de la leche materna una vez enfriada, lo cual se produce fácilmente debido a la elevada actividad lipásica que presenta. Sin embargo, la leche materna que tiene que ser almacenada durante algún tiempo no precisa ser pasteurizada puesto que sus propiedades antimicrobianas inhiben la actividad de cualquier microorganismo patógeno. Además, la pasteurización no solo elimina los organismos patógenos, sino que también altera el mecanismo bacteriostático de manera que la leche se vuelve más susceptible a "echarse a perder". La leche materna puede conservarse con seguridad durante 72 horas a 4-6°C. Si se precisa almacenar durante más tiempo, debe ser congelada a -20°C sin que esto suponga ninguna pérdida significativa de su valor nutritivo. (Agel y col., 1982, Bjórksten y col., 1980, Evans y col., 1978).

2.5.2. Esterilización

Esta técnica, utilizada por primera vez en Suiza y desarrollada en 1889, tiene por objeto la conservación indefinida de la leche por destrucción completa de los gérmenes

presentes en ella, tanto las formas vegetativas como esporuladas.

Durante mucho tiempo, la esterilización de la leche consistía en un calentamiento a 115-120°C en autoclave durante 15 a 20 minutos. Es evidente que un tratamiento tan drástico tiene el peligro de provocar modificaciones en la calidad del producto que en la práctica se han demostrado. Aparece un color oscuro y un gusto especial a cocido que lleva asociada una alteración del equilibrio proteico y mineral. Además, se destruyen la mayor parte de las vitaminas. Por eso, a partir de 1950, se han tratado de poner a punto otros métodos menos dañinos.

Según las normas fijadas por la Unión Europea (1992), la leche esterilizada cumplirá los siguientes requisitos:

- Haber sido calentada y esterilizada en envases o recipientes herméticamente cerrados, permaneciendo intacto el dispositivo de cierre.
- Tener, en caso de controles aleatorios, una conservabilidad tal que no sea perceptible ninguna alteración después de una permanencia de 15 días en un envase cerrado a una temperatura de +30°C. Siempre que resulte necesario también podrá preverse una permanencia de 7 días en un envase cerrado a una temperatura de 55°C.
- La producción de leche esterilizada podrá llevarse a cabo a partir de la leche cruda que haya sido sometida en otro establecimiento a una termización o un tratamiento térmico.
- No contendrá sustancias farmacológicamente activas en cantidades superiores a los límites establecidos por las autoridades.

El precalentamiento antes citado puede ser sustituido por una pre-esterilización a no menos de 135°C durante dos segundos como mínimo, seguida de enfriamiento hasta la temperatura de envasado.

2.5.2.1. Esterilización en botella

La esterilización de la leche líquida entera por el calor se hace habitualmente en

botellas, mediante un procedimiento discontinuo o continuo. En ambos casos, la leche puede pre-esterilizarse a temperatura comprendida entre 120°C y 135°C durante unos pocos segundos y homogenizarse a 33°C-85°C para evitar la separación de la grasa en el producto terminado. Después se envasa a 60°C-70°C en botellas calientes de vidrio o recipientes metálicos, e incluso, más recientemente, en botellas de plástico. Estas botellas o recipientes se tapan herméticamente y se calientan durante períodos de 20 minutos a una hora hasta temperaturas de 120°C para conseguir que la leche del interior del recipiente o botella alcance, por lo menos, una temperatura de 115°C durante 15 minutos.

2.5.2.2. Efectos de la esterilización sobre el valor nutritivo de la leche

La esterilización en envase induce la hidrólisis de carbohidratos y lípidos, pero estos nutrientes siguen siendo disponibles y el valor nutritivo de los alimentos sometidos a este tratamiento no sufre importantes daños (Fellows, 1988).

Este tipo de tratamiento térmico, relativamente prolongado y drástico, trae consigo que la leche esterilizada en botella pierde un 30 por ciento de tiamina, un 50 por ciento de vitamina C y casi toda la vitamina B₁₂ que tenía antes del tratamiento. La vitamina A y la riboflavina no sufren con el tratamiento y permanecen estables durante el almacenamiento en la oscuridad, a la temperatura ambiente, pero, como es de suponer, disminuyen apreciablemente con la luz (Schaafsma, 1995).

Renner (1979) indica que la esterilización de la leche envasada induce un 80-100% de desnaturalización de las proteínas séricas, según las condiciones aplicadas, aunque el valor biológico de las proteínas solo disminuye ligeramente. Además de la desnaturalización proteica se produce la caramelización de azúcares y la reacción de Maillard ambos procesos responsables del color oscuro característico de la leche esterilizada. A su vez, la reacción de Maillard entre la proteínas y la lactosa origina el consiguiente bloqueo de la lisina, que se calcula que puede llegar al 10-15%. Por todo ello, incluso algunos autores han llegado a indicar que la leche sometida a esterilización no debería ser administrada a bebés (Pien 1972;

Secretin, 1981; Ek y Magnus, 1980).

La digestibilidad de las proteínas de la leche se ve perjudicada cuanto la leche es sometida a temperaturas drásticas durante un período largo, sea 180°C durante 80 minutos (Klostermeyer y col. 1975; Alais y col. 1978, Beikov y col. 1981), sin embargo según la normativa anteriormente indicada estas condiciones no son normales ni indicas para la esterilización de la leche.

En fórmulas infantiles líquidas esterilizadas convencionalmente, por la reacción de la lisina con fosfato de serina, se forma lisinoalanina (Fritsh, Klstermeyer, 1981, Hurrell y Finot, 1983). Este compuesto está presente también en las fórmulas UHT en una concentración de 160-370 mg/kg de proteína cruda mientras que en las fórmulas esterilizadas en envase alcanza 410-1030 mg/kg, Finot (1983). También Langhendries y col., 1992 obtuvieron valores más altos de lactulosil alanina en fórmulas infantiles esterilizadas convencionalmente frente a la misma sometida a UHT, aunque niños alimentados con estos dos tipos de fórmulas no presentaron diferencias en cuanto al contenido de productos de la reacción de Maillard excretados a través de la orina.

2.5.3. Esterilización a temperatura ultraelevada (UHT)

Este tipo de leche, conocida más comúnmente como leche UHT (ultra high temperature), es la leche, entera o desnatada, sometida a un proceso de calentamiento a una temperatura de 135-150°C durante dos a ocho segundos, que asegura la destrucción de todos los microorganismos y la inactividad de sus formas de resistencia (esporas), siendo envasada posteriormente en condiciones asépticas.

2.5.3.1. Métodos de esterilización UHT

Desde el punto de vista tecnológico dos son los sistemas UHT: el sistema directo y el indirecto. En el primero se inyecta directamente vapor en leche precalentada, alcanzándose

casi instantáneamente la temperatura de 135-150°C, que es mantenida unos segundos (dos a seis). Más tarde, por expansión directa, se elimina el vapor adicionado. En el segundo de los métodos, el vapor no llega a entrar en contacto directo con la leche, estando siempre separados por placas de acero inoxidable.

Si se comparan ambos métodos existen ventajas e inconvenientes. Los procedimientos de calentamiento directo permiten preparar leches que sufren durante el tratamiento modificaciones mínimas debido a la gran rapidez del intercambio térmico. Estudios comparativos realizados en Australia (Zadon, 1969) demuestran que la proporción de proteínas solubles desnaturalizadas durante el calentamiento directo es menor que en los procedimientos indirectos. Por otra parte, el calentamiento directo asegura una desoxigenación total de la leche, lo cual es favorable para su conservación. Sin embargo, las instalaciones de calentamiento directo tienen un precio de compra y funcionamiento más elevado que las de calentamiento indirecto, así como la necesidad de efectuar la homogeneización asépticamente. Por su parte, los procedimientos de calentamiento indirecto tienen como principal inconveniente la formación de depósitos en las superficies de intercambio de calor con la consiguiente perturbación de la transferencia térmica y, a menudo, la necesidad de aumentar la diferencia de temperatura entre la leche y el fluido calefactor lo que supone una menor rentabilidad. La colocación en el circuito de un desaireador a vacío en el procedimiento indirecto asegura una desoxigenación satisfactoria de la leche.

Según la normativa de la Unión Europea (1992), la leche UHT debe cumplir las siguientes exigencias:

- Haberse obtenido mediante calentamiento en flujo continuo de la leche cruda a una temperatura elevada durante un corto lapso de tiempo (como mínimo +135°C durante, por lo menos, un segundo), con el fin de destruir todos los microorganismos y sus esporas. Después se debe proceder a su envasado aséptico en un recipiente opaco, o que el embalaje convierte en opaco, de modo que se reduzcan a un mínimo las transformaciones químicas, físicas y organolépticas.
- Tener una conservabilidad tal que , en caso de controles aleatorios, no sea perceptible

alteración alguna al cabo de 15 días, mantenida en un envase cerrado a una temperatura de +30°C. Siempre que resulte necesario, podrá preverse también una permanencia de siete días en un envase cerrado a una temperatura de +55°C.

- En caso de que el procedimiento de tratamiento UHT de la leche se aplique por contacto directo de la leche y del vapor de agua, éste será obtenido a partir de agua potable y no podrá dejar posos de sustancias extrañas en la leche ni afectarla negativamente. Además, la aplicación de este procedimiento no modificará el contenido de agua de la leche tratada.

- No contendrá sustancias farmacológicamente activas en cantidades superiores a los límites fijados por las autoridades.

La leche tratada a temperatura ultraelevada goza de todas las ventajas de la leche pasteurizada o esterilizada en forma convencional y no tiene ninguno de sus inconvenientes. Por consiguiente, es lógico considerar que puede ser la leche del futuro, que sustituya a los dos tipos que se encuentran actualmente en el mercado.

2.5.3.2. Efectos de la esterilización UHT sobre el valor nutritivo de la leche

Por sí mismos, los métodos de esterilización a temperatura ultraelevada preservan mejor las cualidades nutritivas del alimento que los de esterilización en el envase. Si se envasa el producto asépticamente, sin ulterior tratamiento, igualará en sabor y en propiedades nutritivas a la leche pasteurizada por el método continuo de pasteurización alta, sobre todo si se elimina el aire de la leche, puesto que la vitamina C y la vitamina B₁₂ se conservan entonces intactas. Por tanto, son obvias las ventajas prácticas que supone suministrar una leche líquida con igual color, sabor y valor nutritivo que la pasteurizada con una vida media mucho más larga (Fellows, 1988)

Weeks and King (1985) demostraron que la absorción intestinal y el depósito femoral de Ca no era distinto entre la leche pasteurizada HTST y la esterilizada UHT.

Burton (1988) indica que las pérdidas de lisina disponible son hasta de un 2% en la

leche pasteurizada y de hasta un 6,5% en la leche UHT. Según Adrian (1972), la cantidad de lisina que se pierde en la leche UHT es de 1-4% y hay muy poca diferencia entre el proceso directo e indirecto. Sin embargo ninguno de estos tratamientos causaron una descenso de la digestibilidad y del valor biológico en ratas, debido a que la lisina de la proteína láctea está en exceso para los requerimientos de este animal.

Las proteínas séricas de la leche se desnaturalizan en el procesamiento UHT en mayor o menor medida dependiendo de la relación tiempo-temperatura. Los sistemas de calentamiento directo desnaturalizan un 50-75% del total de las proteínas séricas frente a los indirectos que afectan al 70-90% (Renner, 1979). La desnaturalización de la β -lactoglobulina produce la liberación de grupos SH, responsables del sabor de la leche calentada. Se piensa que la inyección directa de vapor provoca una menor desnaturalización que el calentamiento clásico en tubos porque el vapor que penetra en la leche produce la dilución de sus componentes (Dill y col., 1964).

No obstante, este efecto de la desnaturalización proteica puede considerarse positivo, ya que se ha observado que las proteínas de la leche desnaturalizadas se digieren más fácilmente que las nativas debido a que la estructura proteica es menos compacta haciendo que sea más accesible a las enzimas. Es decir, la proteína de la leche pasteurizada y UHT se utiliza mejor que la de la leche cruda (Mauron, 1985). Otra explicación por la que la leche calentada presenta una mayor digestibilidad es porque el calentamiento inactiva el inhibidor de la tripsina presente en la leche (Swaisgood y col., 1979; Renner, 1981). Tan solo cuando la leche se somete a tratamientos térmicos intensos se puede producir la destrucción del inhibidor de la tripsina, que estaba disminuido. Estos mismos autores indican que los niños pequeños presentan menos problemas de digestión cuando toman leche UHT de vaca porque las proteínas están ligeramente desnaturalizadas y precipitan en forma de una dispersión más fina en el medio ácido del estómago.

El procedimiento UHT se está aplicando incluso para la obtención de fórmulas infantiles. Anon (1968) observó que los niños alimentados con leche UHT ganan más peso

más rápidamente que aquellos alimentados con leche pasteurizada y explicó que puede ser debido a que la transferencia de aminoácidos al suero sanguíneo sea favorecido, hecho que observó en otros ensayos con cerdos pequeños.

El hidroximetilfurfural, uno de los primeros productos de la reacción de Maillard, en la leche UHT por el sistema indirecto alcanza concentraciones de 6-18 $\mu\text{mol/l}$ y en el tratamiento directo 2-12 $\mu\text{mol/l}$. Pero ya que el umbral sensorial superior para el HMF es de 16 $\mu\text{mol/l}$, en la leche UHT no se detectan cambios de sabor. Sin embargo, se ha indicado que hay poca relación entre los valores de HMF y de lisina disponible, de manera que no se pueden deducir conclusiones claras en lo que respecta al daño proteico. Además, en el caso de la leche UHT, por ser un alimento líquido, la reacción de Maillard apenas tiene lugar debido a que el agua la inhibe (Renner, 1979; Renner y Dorguth, 1980).

Formulas infantiles elaboradas con leche de vaca y sometidas a UHT resultaron ser tan eficientes en niños prematuros como fórmulas hechas a partir de leche o suero de leche en lo que respecta a su ingesta energética, aumento de peso, consistencia de heces y parámetros químicos de la sangre y suero. (Ziegler et al, 1969). Sin embargo en este ensayo no solamente era distinto el tratamiento térmico sino también las fórmulas empleadas.

Otros experimentos llevados a cabo en bebés y niños pequeños mostraron que la leche UHT presentaba el mismo valor nutritivo que la leche pasteurizada. Una pérdida en el valor proteico solo se produce cuando se aplican condiciones extremas de calentamiento con fines experimentales (Finot y col., 1977; Klostermeyer y Fritsh, 1981).

El tratamiento UHT no causa cambios físicos o químicos en la grasa de la leche que tengan consecuencias nutricionales adversas. Al compararse con la leche cruda la leche UHT, presenta menos ácidos grasos poliinsaturados (33% ácido linoleico, 13% de ácido linolénico y 7% de ácido araquidónico, Pol y Groot (1960), y en total hasta un 30% menos de ácidos grasos libres (Withycombe y Lindsay, 1969).

En experimentos con cerdos pequeños, la leche entera UHT indujo una lipólisis más rápida de los triglicéridos en el estómago que la leche pasteurizada. Este efecto puede ser debido en parte a la modificación de las membranas de los glóbulos de grasa por la homogeneización, o al calentamiento sufrido durante el calentamiento (Timmen y Precht, 1984).

En lo que se refiere a minerales, se produce un movimiento reversible de calcio, magnesio, citrato e iones fosfato entre las micelas de caseína y el suero de la leche durante el procesamiento UHT y durante el almacenamiento. Este hecho puede ser debido a la disminución de la cantidad de calcio soluble en la leche inmediatamente después del tratamiento térmico. Sin embargo, no se produce una pérdida de la utilización nutritiva de minerales achacable a la esterilización UHT. En este sentido, Henry y Toothill (1960) demostraron que la disponibilidad de calcio en ratas permanece inalterada. Así mismo, Pelet y Donath (1974) observaron en ensayos con niños que la retención de calcio y potasio era mayor con la leche UHT que con la leche pasteurizada, mientras que la retención de fósforo era similar en los dos casos.

El efecto del procesamiento UHT sobre las vitaminas supone una pérdida de un 10 - 20% sobre el contenido vitamínico de la leche y por lo tanto tiene escasa repercusión nutricional en dietas mixtas. Como se ha indicado, el método UHT indirecto produce pérdidas ligeramente mayores que el directo (Sharma, 1980; Zadow, 1980; Anderson, 1982). Las pérdidas más altas de vitamina C, tiamina, cianocobalamina y ácido fólico por el tratamiento indirecto pueden ser reducidas considerablemente a través de la desgasificación de la leche (Töter, 1979; 1980; Lund, 1982;). Por esta razón, Cameron (1978) aconsejó que el oxígeno debería ser eliminado durante la elaboración de alimentos infantiles. Se ha sido detectado una pequeña pérdida de tiamina como resultado del procesamiento UHT. La vitamina B₆ también se ve ligeramente afectada. Después de 6 meses de almacenamiento de la leche UHT el contenido de vitamina E se ve reduce ligeramente, mientras que la concentración de ácido ascórbico disminuye dependiendo del contenido de oxígeno de la leche (Renner, 1983).

2.5.4. Deshidratación

La deshidratación es el procesamiento empleado para la obtención de leche en polvo, cuyo aspecto, composición y estructura físico-química son variables dependiendo de las condiciones durante su preparación. El producto resultante debe de presentar un humedad del 4% o menos, y mediante este procedimiento se consigue que la leche entera tenga una vida media de seis meses y si el polvo esta hecho a partir de leche descremada, puede durar hasta tres años (Scott, 1989).

2.5.4.1. Procedimientos de deshidratación

Pueden diferenciarse los siguientes:

- Método de los cilindros o rodillos o procedimiento Just-Hatmaker
- Método de nebulización o spray

MProcedimiento de Just-Hatmaker.-

El aparato de deshidratación lleva dos cilindros muy próximos entre si calentados inferiormente por vapor que giran lentamente en sentido inverso. La leche cae entre los dos cilindros y se reparte uniformemente por sus dos superficies. La deshidratación es muy rápida y la leche forma una película que desprende una cuchilla por raspado. El vapor de agua es aspirado por una campana situada encima de los cilindros. En este procedimiento, el tratamiento térmico tan brutal al que se somete la leche modifica la estructura físico-química de la misma, por lo que es preferible obtener leche en polvo mediante el procedimiento de nebulización.

Procedimiento de la nebulización.-

Consiste en pulverizar muy finamente la leche hasta que forme una niebla en el interior de una vasta cámara barrida por una corriente de aire caliente. La deshidratación es instantánea y la leche en polvo cae en la parte inferior de la cámara. Por la cámara circula una corriente

de aire filtrado a una temperatura próxima a los 150-160°C. Esta corriente pasa cerca del dispositivo de pulverización de la leche. Además existe un movimiento turbulento que facilita el descenso del polvo a la base de la cámara, por cuyo orificio de salida es aspirada una mezcla de aire y polvo.

El método de desecado por congelación, es una alternativa cara (Scott, 1989).

Desde el punto de vista técnico, la leche resultante está estructuralmente poco modificada. Dada la extrema finura de las gotitas pulverizadas en la cámara, la desecación es muy rápida y el calentamiento de la leche es limitado por la vaporización casi instantánea del agua.

El embalaje y la conservación del polvo plantean difíciles problemas. El peligro de enranciamiento subsiste a pesar de la pasteurización a alta temperatura. Por otra parte, la oxidación de la grasa puede producirse bajo la influencia de ciertos factores: luz, calor, acidez, presencia de metales catalizadores (hierro y sobre todo cobre) y presencia de oxígeno. Este último es el más importante y hoy se ha generalizado el envasado en una atmósfera de nitrógeno o de gas carbónico.

2.5.4.2. Efectos de la deshidratación de la leche sobre el valor nutritivo de la leche

En la bibliografía se ha descrito distintos resultados en cuanto a los efectos de la deshidratación sobre el valor nutritivo de la leche (Fellows, 1988), estas variaciones se pueden atribuir a la variedad de los procesos de preparación, la temperatura y el tiempo de secado, y a las condiciones de almacenamiento. Uno de los componentes de la leche más afectados son las proteínas solubles, estas se desnaturalizan en mayor o menor grado según la intensidad y duración de los tratamientos térmicos que sufren a lo largo de la fabricación. Teniendo en cuenta la multiplicidad de los tratamientos, es difícil evitar completamente la

desnaturalización. Sin embargo, en la preparación de las leches en polvo llamadas de baja temperatura, que presentan un contenido mínimo de un no debe afectar a más del 10% de las proteínas soluble, En el caso de la fabricación de leches en polvo de alto calentamiento se desnaturalizan prácticamente la totalidad de estas proteínas mediante un calentamiento apropiado (90°C-15 a 20 min). Al mismo tiempo, el polvo se enriquece en grupos sulfidrilos, capaces de proteger la materia grasa contra la oxidación. La caseína es poco sensible al calor, en cambio las micelas de fosfocaseinato sí lo son. Por lo tanto, es conveniente utilizar temperaturas tan bajas como sea posible cuando se desea preparar un polvo de buena reconstitución.

Mediante el tratamiento por rodillos se obtiene un producto que no es fácilmente soluble. Las proteínas séricas quedan desnaturalizadas y puede producirse pardeamiento por la reacción de Maillard. Con el método de deshidratación en spray la desnaturalización proteica se reduce, como ya se ha indicado, y sólo se produce un pardeamiento ligero y algo de coalenscencia de los glóbulos de grasa.

El estado de la materia grasa en el polvo es un factor muy importante para apreciar la calidad del producto. Es necesario evitar cualquier alteración del glóbulo graso que conduzca a la liberación de la grasa libre. La leche en polvo Hatmaker presenta siempre una importante desestabilización de la fase grasa debido a la explosión de los glóbulos grasos al entrar en contacto con los cilindros calefactores. En la leche entera los glóbulos de grasa presentan coalescencia. Este fenómeno no se observa en la desecación por atomización. Además, en este caso, previamente se pulveriza la fase grasa de la leche mediante una enérgica homogeneización para obtener en el polvo una fina repartición de los glóbulos.

En el caso de la leche en polvo descremada cuyo contenido en grasa es muy bajo, las cantidades de vitaminas liposolubles son también muy pequeños; sin embargo, estas leches normalmente se suplementan con vitaminas A y D, hasta concentraciones semejantes a las presentes en la leche entera. Por el contrario, el contenido de vitaminas hidrosolubles en la leche en polvo descremada reconstituida es muy similar al de la leche original (Scott, 1989).

Por último, la cantidad de agua que permanece en el polvo es un factor importante para su conservación. Cuando es superior al 5% se empieza a producir la cristalización de la lactosa, con la serie de transformaciones que la acompañan: malos olores, coagulación, aumento de la acidez, disminución de la solubilidad, la reacción de Maillard, etc. Sin embargo, si el polvo se almacena en un paquete herméticamente cerrado y en un ambiente frío la reacción de Maillard se reduce al mínimo. El contenido de lisina es relativamente estable hasta un año de almacenamiento en condiciones de baja humedad y temperatura de 37°C (Rolls y Porter, 1973; Womack y Holsinger, 1979). Del mismo modo, no parece que en estas condiciones haya pérdidas significativas en la calidad proteica y el valor nutritivo. No obstante, las vitaminas en la leche en polvo almacenada en condiciones desfavorables son bastante vulnerables y su destrucción también parece estar vinculada a la formación de productos avanzados de la reacción de Maillard procedentes de la degradación de la lactulolisina. Se ha demostrado que las vitaminas y los grupos amino libres pueden reaccionar con la lactosa directamente, formando compuestos inactivos desde el punto de vista biológico (Ford y col , 1983).

Los estudios llevados a cabo por Scott y Bishop, (1986) en la leche en polvo descremada demostraron que bajo condiciones adecuadas de envasado y almacenamiento, el efecto sobre el contenido de vitaminas es prácticamente nulo en su fecha de venta. Por el contrario, el alto contenido de grasa de la leche entera en polvo hace que sea susceptible a oxidación, con la subsiguiente descomposición de los productos de oxidación y producción de compuestos responsables del mal sabor (compuestos carbonilos, lactonas, aldehídos y metilcetonas). Sin embargo, parece que si el almacenamiento se efectúa en condiciones adecuadas la concentración de cetonas en la leche reconstituida que era inferior al umbral de sabor y no es suficiente para provocar un rechazo por mal sabor para su detección por palatabilidad (Fellows, 1988)..

No obstante, este tratamiento produce grandes cambios en la composición de aminoácidos de las proteínas de la leche. La lisina se pierde en un 5% en la leche deshidratada

mediante spray y de un 3 a 15% en la leche sometida al método de cilindros. La disponibilidad de lisina en el primer método es de un 90 a 92% y en el segundo de un 60 a 95%. Además también se han observado pérdidas de cisteína, metionina, treonina, y serina (Renner, 1983).

El contenido de HMF de la leche deshidratada por el método spray es de 7 $\mu\text{mol}/100$ g y de 12 $\mu\text{mol}/100$ g en el método de rodillos (Renner, 1983).

2.6. FORMULAS INFANTILES PARA LACTANTES

La superioridad de la leche humana frente a la alimentación artificial es incuestionable por motivos nutricionales, inmunológicos así como psicológicos. Las autoridades sanitarias velan por que ninguna información insinue ni haga creer que la alimentación con biberón es equivalente o superior a la lactancia materna. Sin embargo, en aquellos casos en que la lactancia materna no es suficiente o no es posible, los preparados para lactantes se utilizan para satisfacer las necesidades nutritivas de los lactantes durante los cuatro o seis primeros meses de vida.

2.6.1. Tipos y directrices

Entre las reglamentaciones vigentes referidas a fórmulas infantiles se encuentra la directiva relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación de la Comisión de las Comunidades Europeas (91/321/C.E.E.) del 14 de mayo de 1991, recogida en la legislación española en el Real Decreto 1408/1992 del 20 de noviembre (B.O.E. 13/1/1993) y más recientemente en el Real Decreto 72/1998 del 23 de enero (B.O.E. 4/2/1998). Se indican los requisitos de composición básica de estos productos, definiciones, condiciones de etiquetado y algunas normativas referentes a su comercialización, resaltando la importancia que desempeña la información en la elección de la alimentación infantil con el fin de favorecer y proteger la lactancia materna. Dicha normativa distingue dos tipos de preparados para lactantes, definidas como a continuación se indica :

- Preparados para lactantes: "los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes durante los primeros cuatro a seis meses de vida que satisfagan por sí mismos las necesidades nutritivas de esta categoría de personas".
- Preparados de continuación: "los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes de más de cuatro meses de edad que constituyan el principal elemento líquido de una dieta progresivamente diversificada de esta categoría de personas".

Así mismo, la Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (ESPGAN) diferencia entre fórmulas de inicio, para los primeros cuatro a seis meses de vida, y fórmulas de continuación, a partir de esta edad. Sin embargo, la Asociación Americana de Pediatría (AAP) sólo contempla un único producto que denomina fórmula infantil. El Codex

Pediatría (AAP) sólo contempla un único producto que denomina fórmula infantil. El Codex Alimentarius (volumen 4, 1994) de la FAO y la OMS, define una única fórmula para lactantes y entiende por lactantes a niños no mayores de doce meses de edad.

Además de los dos tipos de fórmulas indicadas, se han desarrollado otras especiales para niños prematuros o de bajo peso al nacer, intolerantes a las proteínas o a la lactosa de la leche, con malabsorción de grasas, con reflujo gastroesofágico, enriquecidas con hierro etc.

Respecto al etiquetado, la primera de las citadas normativas señala que los preparados para lactantes son adecuados para el niño desde su nacimiento pero que a partir de los cuatro meses sólo deben ser parte de una dieta diversificada, refiriéndose en particular a las necesidades de hierro que no quedan cubiertas. Aparece la composición, expresada como la cantidad media de los macronutrientes, cada sustancia mineral y vitamina por cada 100 mililitros del producto listo para el consumo, así como las instrucciones relativas a la preparación del producto para conseguir una correcta alimentación en el caso de que la fórmula sea en polvo, y una advertencia sobre los riesgos para la salud que resultan de una preparación inadecuada. A pesar de ello, no existe ninguna indicación concreta sobre como llevar a cabo el calentamiento doméstico.

En los Anexos de la misma figuran las fuentes proteicas y otros ingredientes alimenticios, cuya adecuación para la alimentación especial de los lactantes desde el nacimiento ha sido determinada mediante datos científicos generalmente aceptados. Atendiendo a la fuente proteica, se diferencian proteínas elaboradas a partir de proteínas de la leche de vaca, sin modificar o bien modificadas (alteración de la proporción proteínas del suero:caseína) y preparados elaborados a partir de soja únicamente o de una mezcla con proteínas de la leche de vaca. La denominación "Leche para lactantes" y "Leche de continuación" queda restringida a los alimentos elaborados totalmente a partir de las proteínas de la leche de vaca. En todos los casos se permite la adición de aminoácidos para mejorar el valor nutritivo de las proteínas y únicamente en la proporción necesaria para este fin. Cuando la relación proteínas del suero:caseína, que en la leche de vaca es de 50:50, es rebajada para aproximarse a la leche humana, se hace a expensas de añadir suero desmineralizado. En los

preparados de continuación no se procede a dicho ajuste, ya que en la leche materna se observa un incremento progresivo de la relación caseína:proteínas de suero.

Debido a que esta tesis se ha realizado utilizando como material exclusivamente preparados para lactantes, en la cuadro 1 se halla resumida la composición básica (valor mínimo y máximo) de dichos preparados cuando se reconstituyen de acuerdo con las instrucciones del fabricante expresados en g/100 g según la directiva 91/321/CEE y en g/100 kilojulios disponibles de acuerdo con el Codex Alimentarius, 1994:

Cuadro 1.

	Mínimos-Máximo	Mínimos-Máximo
Energía:	250-315	
Proteínas:		0.43*
Leche vaca sin modificar	0.56-0.7	
Leche de vaca modificada	0.45-0.7	
Soja únicamente o mezclada leche vaca	0.56-0.7	
Lípidos:		0.8-1.5
	0.8-1.5	
Acido láurico	hasta 15% total materia	
Acido mirístico	hasta 15% total materia	
Acido linoleico	70-285	70
Carbohidratos:	1.7-3.4	
Lactosa	0.85-S.E.	
Sacarosa	hasta 20% total	
Almidón pretostado o gelatinizado	S.E.- 2	
Sustancias minerales:		
Sodio (mg)	20-60	5-15
Potasio (mg)	60-145	20-50
Cloro (mg)	50-125	14-35
Calcio (mg)	50-S.E.	12-S.E.
Fósforo (mg)	25-90	6-S.E.
Magnesio (mg)	5-15	1.4-S.E.
Hierro (mg)	0.5-1.5	0.25-S.E.
Zinc (mg)	0.5-1.5	0.12-S.E.

Revisión Bibliográfica

Yodo (μg)	5-S.E.	1.2-S.E.
Soja o mezcla leche vaca		
Hierro	1-2	0.25-S.E.
Zinc	0.75-2.4	0.12-S.E.
Vitaminas:		
A (U.I.)	60-180	60-120
D	1-2.5	10-25
Tiamina	40-S.E.	10 μg -S.E.
Riboflavina	60-S.E.	14 μg -S.E.
Nicotinamida	250-S.E.	60 μg -S.E.
Acido pantoténico	300-S.E.	70 μg -S.E.
B ₆	35-S.E.	9 μg -S.E.
Biotina	1.5-S.E.	0.4-S.E.
Acido fólico	4-S.E.	1 μg -S.E.
B ₁₂	0.1-S.E.	0.04 μg -S.E.
C	8-S.E.	1.9mg-S.E.
K	4-S.E.	1 μg -S.E.
E	0.5/g de AG poliinsaturado--	0.7U.I./g**

* La calidad de la proteína no será inferior al 85% de la caseína; **referido a g de ácido linoléico; S.E. : sin especificar.

Todas las citadas directivas señalan la superioridad de la lactancia materna, que el producto ha de utilizarse por consejo de personas cualificadas, y que no están permitidas imágenes o textos que idealicen el uso de estos preparados. Por último, velan por el material informativo y educativo destinado a las mujeres embarazadas, para que aclare las ventajas y superioridad de la lactancia materna, así como la preparación y persecución de la misma, el posible efecto negativo sobre la lactancia materna de la alimentación parcial con biberón, la dificultad de rectificar la decisión de no amamantar y una serie de indicaciones sobre la manipulación y utilización correcta de estos alimentos destinados a un colectivo tan vulnerable.

Las fórmulas infantiles en polvo y las fórmulas concentradas deben reconstituirse correctamente antes de ofrecérselas al bebé. La densidad energética indicada por el fabricante se consigue añadiendo el número prescrito de cucharillas de la fórmula en polvo a un determinado volumen de agua o diluyendo la fórmula infantil concentrada en la misma cantidad de agua. Sin embargo, son escasos los estudios realizados sobre la densidad

energética de las fórmulas preparadas en casa. Una persona con experiencia pondría en la cucharilla la cantidad prevista, con un error de un 5%, pero éste sería de un 10% si carece de experiencia (Mettler, 1982). Por tanto, las diferencias en densidad energética de un sustitutivo de leche materna pueden ser debidas a una hipo o hiperdilución intencionada. Se ha señalado que una dilución excesiva es frecuente en países no industrializados (Jelliffe y Jelliffe, 1978; McComaas, 1988; Veraldi, 1988) y en familias con bajo nivel adquisitivo en países industrializados (McJunkin y col. 1987), mientras que la tendencia a concentrar los biberones se da ocasionalmente en países industrializados.

Al preparar una fórmula infantil en forma de líquido concentrado, debe volcarse el volumen apropiado de concentrado directamente del envase (normalmente lata) al biberón, añadiendo una cantidad igual de agua fría o templada. Cuando se parte de un producto en polvo, se debe introducir el volumen adecuado de agua en el biberón y seguir después las indicaciones del fabricante respecto a la cantidad de polvo a añadir. Si no se dispone de un servicio público de agua controlada, deberá utilizarse agua embotellada o hervida. En este caso es muy importante emplear agua de mineralización baja, para no incrementar la carga osmótica del alimento. Es preferible, preparar un solo biberón cada vez, aunque algunos fabricantes en sus etiquetas señalan cómo preparar el volumen necesario para todo el día. Preparada la fórmula infantil debe ser consumida en seguida o refrigerada hasta el momento de su empleo. Una vez abierta la lata de fórmula infantil en forma de líquido concentrado debe ser conservada en un lugar seco, de preferencia en una nevera, y la lata de polvo debe mantenerse perfectamente cerrada (Fomon, 1995).

Los fabricantes de fórmulas infantiles para lactantes han acumulado datos sobre los márgenes de pérdidas a prever para diferentes nutrientes durante el procedimiento específico de manufactura, y es preciso ajustar su composición inicial para compensar esas pérdidas. Tras el envasado de una leche artificial, la concentración de la mayoría de los nutrientes se mantiene inalterada. Sin embargo, para algunos de ellos disminuye lentamente con el tiempo. Por ejemplo, en la forma líquida concentrada, la pérdida de vitaminas A y C tras su procesamiento y envasado es de escasa cuantía, mientras que sí se pierde una parte apreciable

de las mismas en las fórmulas en polvo, debido a la inevitable cantidad de oxígeno presente en el envase (Cook, 1989). Se ha descrito que el contenido de hierro de una fórmula infantil líquida no disminuye durante el período de vigencia del producto, pero, debido a la lixiviación del hierro del envase, su cantidad puede aumentar hasta 2 mg/l (Dallman, 1989).

2.6.2. Composición nutritiva de las fórmulas infantiles

La leche materna es aceptada como el alimento ideal para niños hasta 5 ó 6 meses, pues asegura el crecimiento y desarrollo óptimo (ESPGAN, 1982). Sin embargo, la composición de la leche materna varía de madre a madre, de un día a otro e incluso durante la toma de forma que se hace muy difícil conocer la concentración de cada nutriente en la leche humana.

Teniendo en cuenta que la lactancia materna es superior, las alternativas que existen para alimentar a los niños desempeñan un papel muy importante cuando la primera no es posible, deseada o suficiente. Desde el principio de la historia, la leche de vaca sola y posteriormente sometida a algunas modificaciones ha sido el principal sustituyente. A finales del siglo XIX se iniciaron los estudios dirigidos a asemejar la composición de los preparados para lactantes a la de la leche humana y hoy en día el objetivo ya no es mimetizar la composición de la leche humana sino conseguir efectos fisiológicos semejantes a los que producen la lactancia materna (Goedhart y Bindels, 1994).

2.6.2.1. Energía

La densidad energética media de la leche humana madura se toma como referencia para establecer las necesidades energéticas de los lactantes, y por lo tanto es la guía para establecer el contenido energético que deben presentar las fórmulas infantiles. El cálculo de este valor se hacía a partir del análisis de macronutrientes contenidos en la leche humana extraída por medios mecánicos o manualmente, y aplicando el factor de conversión de Atwater. De esa forma se obtuvo un valor energético de 700 kcal/l (Departamento de Salud y Seguridad Social, 1977). Sin embargo, según Lucas y col. (1990), este método implica una

sobreestimación, puesto que la leche obtenida por los métodos indicados presenta más grasa que si es extraída por succión. Posteriormente, mediante marcaje con isotópos se ha hallado que la leche materna contiene unas 530 kcal/l y 580 kcal/l en la sexta semana y el tercer mes, respectivamente. Esto significa que los preparados para lactantes presentan un contenido energético muy alto y explicaría porqué los niños alimentados artificialmente experimentan un incremento de peso más rápido que los que crecen con leche materna (Prentice y col., 1988). A continuación se recogen en el cuadro las recomendaciones energéticas vigentes (Ros, 1998).

Cuadro 2. Recomendaciones Energéticas vigentes (kcal/100 ml)	
ESPGAN	64 - 72
CEE	60 - 75
AAP	60 - 80

2.6.2.2. Proteínas

Al aporte de proteínas proporcionado por la leche de mujer es muy bajo, 0.9-1 g/100 ml. Años atrás se sobreestimaba el contenido proteico de la leche humana, pues se incluía en esta fracción el nitrógeno no proteico, que constituye entre el 20 y el 25% del nitrógeno total. Actualmente se acepta que la leche materna contiene 8-10 g de proteína/l (Hambraeus y col., 1978; Harzer y col. 1986). En las últimas décadas se han disminuido los niveles de proteína de las fórmulas infantiles para asemejarlos a los de la leche materna, ya que los niños que consumían fórmula presentaban una concentración en plasma de urea y determinados aminoácidos demasiado elevados, lo que indicaba un alto estrés metabólico innecesario (Järvenpää y col. 1982ab.; Janas y col. 1985). Las recomendaciones actuales para este macronutriente se indican a continuación (tabla 3).

ESPGAN	1.2 - 1.9
CEE	1.2 - 1.8
AAP	1.2 - 3.1

Por otra parte, en ningún estudio con fórmulas infantiles con bajos niveles de proteína se ha conseguido reproducir la concentración de aminoácidos plasmáticos de niños alimentados con leche humana (Picone y col. 1989). Así, en un ensayo en el que el contenido de proteína era de 11-13 g/l y variando la relación caseína:proteínas séricas, los niños presentaban un crecimiento y status nutricional proteico parecido al de niños lactantes alimentados al pecho, sin embargo sus concentraciones de nitrógeno ureico en sangre y en orina eran significativamente más bajas (Räihä y col. 1986a,b; Picone y col. 1989; Lönnerdal & Chen, 1990). Estos resultados no fueron iguales a los obtenidos por Donovan y Lönnerdal (1992), tal vez debido a que no emplearon la misma fórmula que difería en su contenido proteico, debido a lo cual concluyeron que existen otros factores que condicionan los niveles de aminoácidos.

Según Heine y col. (1986) los problemas relacionados con las diferencias en los aminoácidos plasmáticos entre los lactantes amamantados y aquellos alimentados con fórmulas a base de leche de vaca no se pueden resolver simplemente mediante la elección de otras proporciones entre las proteínas séricas de la leche y la caseína. Una de las opciones para compensar el bajo valor biológico del componente proteico de las fórmulas podría ser su enriquecimiento con α -lactoalbúmina o aminoácidos libres, que posibilita disminuir la concentración proteica de las fórmulas infantiles hasta concentraciones más próximas a las de la leche materna y permite mantener al mismo tiempo un elevado valor biológico debido a la alta concentración de aminoácidos esenciales conseguir rebajar el contenido de proteína de las fórmulas infantiles hasta niveles semejantes a los de la leche humana es importante para disminuir la carga renal de solutos a la vez que proporciona un balance aminoacídico más

seguro y disminuya la posibilidad de hiperaminoacidemia en lactantes inmaduros (Janas, L.M. y col.1987; Järvenpää y col. 1982a; Järvenpää y col. 1982b)

En Europa (91/321/CEE) se diferencian los preparados elaborados a partir de proteínas contenidas en la leche de vaca, sin modificar o modificada (alteración de la proporción proteínas del suero/caseína), o a partir de proteínas de soja únicamente o de una mezcla con proteínas bovinas; el componente proteico se obtiene a partir de leche desnatada y caseína hidrolizada (Sarwar y col., 1989).

No obstante, las proporciones son variables, ya que en lo que respecta a la relación proteínas de suero:caseína existe mucha controversia y no se llega a establecer un valor óptimo, las niveles que hoy en día recomiendan la ESPGAN, AAP y CEE se reflejan en la cuadro 4. Por un parte, la relación caseína:proteínas séricas disminuye continuamente desde los primeros días: 10:90 hasta 45:55 en la leche madura (Harzer y col. 1986; Kunz y Lönnnerdal, 1992). Por otra, se ha demostrado que los índices de crecimiento en niños alimentados con fórmulas en las que predomina la caseína o proteínas séricas apenas difieren (Harrison y col. 1987; Janas y col. 1987; Lönnnerdal y Chian, 1990). Sin embargo, las fórmulas en las que las proteínas séricas son mayoritarias, presentan dos ventajas importantes: facilitan la formación de un "cuajo" más suave y fino que se traduce en un mayor vaciado gástrico (Nakai y Li-Chan, 1987) y origina una flora fecal más parecida a la de los niños amamantados (Balmer y col. 1989).

Cuadro 4. Recomendaciones caseína/seroproteínas vigentes (g/100 ml)	
ESPGAN	40:60
CEE	50:50
AAP	-

Por otro lado, es bien conocido que en la caseína bovina la β -caseína es mayoritaria mientras que en la caseína humana predomina la α -caseína. Esto afecta al tiempo de tránsito intestinal y al vaciado gástrico, como se ha indicado anteriormente, por lo que es de esperar que este hecho tenga ciertas repercusiones fisiológicas, incluyendo las derivadas del papel de la caseína en la absorción de minerales y la inmunorregulación (Migliore-Samour y Jollès, 1988; Daniel y col. 1990).

Las seroproteínas están formadas fundamentalmente por α -lactoglobulina, lactoferrina y seroglobulinas. La lactoferrina además de ser una subunidad del sistema lactato sintetasa, posee importantes propiedades relacionadas con la absorción intestinal del hierro (Davidson y Lönnnerdal, 1988) también presenta actividad bacterioestática y es capaz de estimular la proliferación de la mucosa intestinal (Iyer y Lönnnerdal, 1993). Sin embargo, los ensayos clínicos en niños alimentados con fórmulas infantiles suplementadas con lactoferrina no siempre han proporcionado resultados coincidentes. Así, en algunos estudios en los que se utilizó lactoferrina bovina, el incremento en la absorción de hierro no llegó a detectarse (Fairweather-Tait y col. 1987; Schulz-Lell y col. 1991), bien porque el receptor de la lactoferrina específico de la especie (suponiendo que dicho receptor este implicado en el transporte de hierro) o porque la composición de la fórmula elegida no fuera la apropiada. Por el contrario, posteriormente, Chierici y col. (1992) describieron que niños alimentados con una fórmula infantil enriquecida con lactoferrina presentaban niveles de ferritina más altos que aquellos que tomaban la fórmula control; y Davidson y col. (1994) observaron que la absorción de hierro en la leche humana disminuía al eliminar de ella la lactoferrina. Teniendo en cuenta estos resultados, Iyer y Lönnnerdal (1993) indican que la lactoferrina puede intervenir en el metabolismo del hierro actuando como regulador de la absorción de este elemento cuando los almacenes de hierro son adecuados, o como promotor de su absorción en estados de deficiencia.

La leche materna presenta un alto contenido de L-carnitina, necesaria para el transporte de los ácidos grasos de cadena larga y otros ácidos orgánicos a través de la membrana (Borum, 1987), ya que partir del nacimiento en que el niño cambia su metabolismo energético

basado en glucosa, como principal fuente energética, por la grasa. Dado que el recién nacido tiene reservas limitadas de L-carnitina debe asegurarse un aporte exógeno, así se ha observado que lactantes alimentados con fórmulas hechas a base de soja (que contienen poca o nada de carnitina) no fueron capaces de mantener un nivel normal de esta pseudovitamina, y manifestaron cambios bioquímicos subclínicos relacionados con la regulación de la oxidación de ácidos grasos en el hígado y cetogénesis, hipertrigliceridemia, etc. Sin embargo, se desconocen las consecuencias fisiológicas a largo plazo que pueda contraer la no suplementación. Es especialmente delicado el caso de los niños pretérminos que pueden presentar una depleción rápida si no son alimentados por vía intravenosa con una solución no suplementada con este aminoácido (Combs, 1992).

Como ya se ha indicado, la leche humana contiene una cantidad considerable de componentes nitrogenados no proteicos: aminoácidos libres, siendo los cuatro más abundantes ácido glutámico, taurina, alanina y serina, y nucleótidos. Algunos de éstos componentes nitrogenados participan en la síntesis de aminoácidos no esenciales y otros están implicados en el desarrollo del recién nacido, tales como la taurina y los nucleótidos. La taurina, el aminoácido libre más abundante, ha sido ampliamente estudiado, en especial su papel en los niños prematuros (Okamoto y col., 1984). Parece que desempeña funciones esenciales dado su presencia en diversos tejidos, como en el músculo del corazón, la retina y el cerebro. El bulbo olfatorio presenta niveles particularmente altos de este aminoácido, así como de ácidos grasos poliinsaturados. También está implicada en la formación de ácidos biliares y de sus conjugados, como por ejemplo los que forman con el colesterol. La leche de vaca contiene un nivel muy bajo de taurina que se pierde durante el procesamiento. Aunque la taurina puede ser sintetizada a partir de la metionina, y se regula a través de su eliminación urinaria, esta vía no es suficiente para cubrir las necesidades del niño que recibe lactancia artificial (Rassin y col., 1983), haciendo que este aminoácido se considere esencial. Esto también ocurre con la histidina hasta los seis meses y con la cistina (precursor de la taurina) en el recién nacido, sobre todo si este es prematuro.

Diversos trabajos (Tyson y col. 1989; Wasserhess y col., 1993; Zamboni y col. 1993) indican que la suplementación de fórmulas infantiles con taurina tiene efectos en la síntesis de colesterol, la excreción de ácidos biliares, grasas y la absorción de vitamina D, así como en la región auditiva del cerebro en niños prematuros, aunque no todos los investigadores opinan que dicha suplementación deba realizarse (Bijeveld, 1987). A pesar de que no existe una convicción absoluta de que la taurina sea un aminoácido esencial, muchas fórmulas comercializadas hoy en día están enriquecidas con este aminoácido.

La leche humana contiene cantidades significativas de nucleótidos (Gil y Sánchez-Medina, 1982; Janes y Picciando, 1982). Se han descrito sus efectos sobre el sistema gastrointestinal, sobre el crecimiento y función hepática en animales (Uauy y col., 1990; Bustamante y col. 1994; Novak y col., 1994), así como su influencia sobre el status de ácidos nucleicos en niños (Gil y col. 1986b y DeLucchi y col. 1987). En algunos trabajos se ha observado que incrementan el crecimiento de las bifidobacterias (Gil y Sánchez-Medina, 1982), aunque no en todos los casos (Balmer y col. 1994). Por otro lado, de los ensayos de Sánchez-Pozo y col. 1994 se desprende que la suplementación con nucleótidos incrementa significativamente las concentraciones de lipoproteínas plasmáticas en niños prematuros, pero no en recién nacidos a término. Otro aspecto muy interesante es la propiedad que presentan los nucleótidos dietéticos de estimular la inmunidad celular en niños, sin afectar la incidencia ni severidad de infecciones (Carver y col. 1991). Recientemente se ha descubierto que niños alimentados con preparados enriquecidos con nucleótidos que viven en un ambiente contaminado presentaban menos episodios de diarrea respecto a los que tomaban la fórmula equivalente no enriquecida (Brunner y col. 1994), lo que podría estar relacionado con los efectos beneficiosos sobre el sistema gastrointestinal que se han indicado anteriormente.

Las fórmulas infantiles enriquecidas con nucleótidos, éstas han sido comercializadas en España y en Japón durante años, y después se han introducido en Estados Unidos. Sin embargo, sobre esta suplementación también existe controversia y algunos autores indican que es preciso determinar su eficacia, seguridad, niveles óptimos de suplementación y la población a la que debe ser dirigida antes de recomendar la suplementación rutinaria de las fórmulas

infantiles con nucleótidos (Quan y Barnes, 1990). En el apartado correspondiente a proteínas del Codex Alimentarius (1994) no alude a la necesidad de enriquecer las fórmulas infantiles con nucleótidos, pero si se indica que podrán añadirse aminoácidos esenciales.

2.6.2.3. Grasa

La grasa además de ser una fuente de energía, aporta ácidos grasos esenciales que son un vehículo para las vitaminas liposolubles y hormonas. Los lípidos de los alimentos naturales están constituidos en su mayor parte por triglicéridos o grasas neutras. Las grasas animales están formadas mayoritariamente por ácidos grasos saturados, no esenciales, mientras que las grasas vegetales son ricas en ácidos grasos poliinsaturados incluyendo el ácido linoleico (18:2, n6) y el ácido linolénico (18:3, n3) que son precursores de todos los demás y por tanto se consideran esenciales.

El 98% de los lípidos de la leche de mujer son triglicéridos y su coeficiente de absorción depende del grado de saturación de los ácidos grasos, del tamaño y de la estructura molecular, absorbiéndose mejor los poliinsaturados, los de cadena corta y los esterificados en posición 2 (Hernández, 1993).

En lo que respecta a este nutriente en los preparados para lactantes, generalmente la mayoría se obtienen a partir de aceites vegetales o mezclas de éstos con grasa láctea; posteriormente se les añade vitaminas y elementos traza (Hurrell, 1989). La grasa de las leches artificiales más consumidas en Estados Unidos procede de una mezcla de soja y cacahuete o de oleína de palma, aceite de soja, aceite de cacahuete y aceite de cártamo rico en ácido oleico. En los preparados para lactantes y fórmulas pretérmino especialmente enriquecidas en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, se añade un extracto de aceite de pescado o de la yema de huevo.

Los ácidos grasos de cadena larga de 20 y 22 átomos de carbono son importantes componentes estructurales de los fosfolípidos de membrana, particularmente abundantes en

el sistema nervioso central y en los fotorreceptores de la retina, además, son precursores de eicosanoides (British Nutrition Foundation, 1992). El ácido docosahexanoico (DHA) constituye un 0.3% de los lípidos totales de la leche humana madura y el ácido araquidónico (AA) un 0.5%. Estos niveles son más altos en el calostro y leche de madres de prematuros (Rönneberg y Skara, 1992; Foreman-van Drongelen y col. 1994), por lo cual parece que el suplemento de ácidos grasos de cadena larga es especialmente favorable en este colectivo. Tanto el ESPGAN (1991) como la Fundación de Nutrición Británica recomiendan suplementar las fórmulas para prematuros hasta niveles similares a los de la leche humana.

Los triglicéridos de la leche humana, como se ha apuntado anteriormente, presentan alta especificidad de posición (Martin y col, 1993), especialmente importante es el caso del ácido palmítico que constituye el 22% de los lípidos totales; un 70-75% de este ácido está esterificado en la posición β del glicérido. Sin embargo, el ácido palmítico de los aceites vegetales empleados en la fabricación de fórmulas infantiles está esterificado en las posiciones α (Freeman y col. 1965). Carnielli y col. (1994) evaluaron los efectos de dichas diferencias estructurales en dos grupos de niños prematuros. Aunque la absorción total de grasa no varió en los niños alimentados con la fórmula que contenía el ácido palmítico esterificado en la posición β fueron capaces de absorber una mayor cantidad de este ácido que los que consumieron el ácido palmítico esterificado en las posiciones α . Además, también se observó que en los primeros la retención de calcio era mayor (Goedhart y Bindels, 1994).

Filer y col. (1969) también quisieron estudiar la influencia de la estructura de los triacilgliceroles sobre la absorción de ácidos grasos, pero en neonatos a término. El trabajo reveló que la fórmula infantil que contenía manteca, rica en ácido palmítico esterificado en posición β , facilitaba una mayor absorción de todos sus ácidos grasos, especialmente de ácido palmítico y esteárico.

El colesterol forma parte de las membranas celulares, siendo además precursor de hormonas gonadales y adrenales y de ácidos biliares. Más recientemente se le atribúan propiedades antioxidantes (Smith, 1996). Es bien conocido que los niños alimentados con

leche materna tienen niveles de colesterol total plasmático y LDL colesterol plasmático, así como una relación LDL:HDL, más alta respecto a los niños que toman fórmula infantil (Jooste y col, 1991, Kallio y col. 1992, Hayes y col. 1992). Estas diferencias son debidas fundamentalmente a que la leche humana contiene entre 100 y 150 mg/l de colesterol mientras que este componente no se incluye en los preparados para lactantes. Se desconoce por el momento el efecto a largo plazo de la carencia de colesterol en las fórmulas infantiles, pero lo lógico indica que si éstos tratan de mimetizar la leche humana quizá deberían también aportar colesterol. La regulación del metabolismo de este lípido durante la infancia es un tema de gran actualidad (Sánchez-Muniz y col., 1997; Wrong y col., 1993).

2.6.2.4. Hidratos de carbono

La lactosa es el azúcar de la leche de todos los mamíferos, está formada por glucosa y galactosa unidas por un enlace β -1-4-glucosídico y constituye el 7-8% de la leche de mujer. La dextrinomaltoza está formada por polímeros de glucosa, procedentes de la hidrólisis del almidón, con bajo peso molecular. Estos dos azúcares se utilizan para aumentar el contenido de hidratos de carbono de la leche de vaca (48 g/L) asemejándolo a la leche de mujer (74 g/L) también con el objeto de diluir el contenido proteico y mineral, como ya se ha citado anteriormente. Por otro lado, la presencia de azúcar en la leche es responsable de su osmolaridad, por lo que los disacáridos tienen la ventaja sobre los monosacáridos de proporcionar doble cantidad de energía con la misma carga osmótica.

Cuadro 5. Recomendaciones de hidratos de carbono (g/100 ml)	
ESPGAN	5 - 8
CEE	5 - 9.8
AAP	7 - 8.4

Las recomendaciones vigentes para este componente de las fórmulas se recogen en el cuadro 5. La ESPGAN recomienda que los hidratos de carbono se aporten al lactante durante el primer año como disacáridos, en forma de lactosa los seis primeros meses, admitiendo la adición de dextrimaltosa a partir del cuarto mes. La sacarosa debe quedar excluida durante los primeros meses.

El mecanismo por el que la lactosa estimula la absorción del calcio no está bien definido. Parece ser que la hidrólisis relativamente lenta de la lactosa en el intestino delgado es un factor importante. La lactosa de la leche humana se digiere menos rápidamente que la de las leches adaptadas para lactantes (Heine y col. 1977), lo cual podría ser debido a que cuando este disacárido se encuentra en presencia de concentraciones relativamente elevadas de iones fosfato (y quizá también sean responsables otros componentes de las leches artificiales) se transformada de su forma β en α ; y la α -lactosa es más rápidamente hidrolizada y por esto la lactosa de la leche humana puede resultar más eficaz para mejorar la absorción mineral que la de las fórmulas infantiles. Además, un mayor porcentaje de lactosa de la leche humana que de las fórmulas artificiales para lactantes puede alcanzar el colon para proporcionar sustrato al crecimiento de las bacterias bífidas. Pahwa y Mathur (1982) observaron que una preponderancia de flora bífida incrementa la absorción de diversos minerales, entre ellos el calcio. Aunque se sabe que la β -lactosa puede convertirse en α -lactosa durante el procesado de las leches artificiales para lactantes, la posibilidad de que la lactosa de la leche humana mejore la absorción mineral más que la lactosa de los preparados para lactantes todavía no se ha explorado (Fomon, 1995).

La glándula mamaria también sintetiza oligosacáridos. Se han identificado más de 100 estructuras de oligosacáridos en la leche humana (Kunz y Rudolff, 1993) que suponen un 27% del total de hidratos de carbono en el calostro, disminuyendo hasta un 19% en el día 30 y hasta un 15 - 16% en el día 60.

Los oligosacáridos que contienen N-acetilglucosamina estimulan el crecimiento de las bifidobacterias. Otra posible función de los oligosacáridos de la leche humana es aportar ácido

siálico al lactante. Las especies mamíferas tiene capacidad de sintetizar ácido siálico a partir de azúcares simples y fosfoenolpiruvato, pero esta capacidad de síntesis no se conoce bien en neonatos (Carlson, 1985). Las fórmulas infantiles en las que predominan las proteínas séricas y las caseínas contienen respectivamente 50-70 y 10-30 mg/l de oligosacaridos derivados de ácido siálico.

El aporte de fibra no es necesaria en niños menores de un año dado su alto volumen para un escaso valor calórico, que podría conducir a malnutrición además ha sido ampliamente descrito que la fibra perjudica la absorción de algunos minerales (Hernández, 1993).

2.6.2.5.Minerales

Los elementos minerales se encuentran en concentraciones mucho más altas en la leche de vaca que en la de mujer (0.7 g/100ml frente a 0.2 g/100ml) por lo que es necesario reducir su contenido para evitar una sobrecarga en las fórmulas sobre todo de sodio y fosfatos. Años atrás dicha reducción se realizaba añadiendo carbohidratos a la leche de vaca pero esto tenía el inconveniente de que también se reducía la concentración de otros nutrientes indispensables y además se habían elevado excesivamente los hidratos de carbono. Posteriormente, se han ido desarrollando técnicas de desmineralización y fraccionamiento de los componentes de la leche. En la actualidad la elaboración de fórmulas infantiles se lleva a cabo partiendo de leche descremada a la que se le añade caseína hidrolizada, suero, sales minerales y vitaminas.

Para ajustar la carga de minerales de la fórmula infantil el suero, que se obtiene en la fabricación del queso, se desmineraliza aplicando técnicas como el intercambio iónico con resinas, electrodiálisis, ultrafiltración, ósmosis inversa e incluso filtración con gases. Con el intercambio iónico se pierden proteínas, nitrógeno no proteico, ácidos orgánicos y elementos traza (de Boer y Robbertsen, 1981; Jonsson y Olson, 1981; Nestlé 1985 página 253, libro blanco). Con la electrodiálisis el potasio, sodio y cloro pueden reducirse hasta en un 90%, sin embargo, la pérdida de calcio, magnesio y fosfatos no superan un 50% (de Boer y Robbertsen, 1981). También se producen pequeñas pérdidas de nitrógeno no proteico, ácidos orgánicos y

elementos traza, pero al final de ambos métodos el contenido de minerales se ajusta reemplazando aquellos que han sido eliminados y que son necesarios para el niño. Por último, el suero que se obtiene tras los pasos anteriores se deshidrata o se mezcla directamente con leche entera o descremada.

Pero no solamente es preciso tener en cuenta las cantidades de los distintos elementos a la hora de confeccionar una fórmula infantil, sino que estas tienen que ser biodisponibles. Por ejemplo, el fósforo presente en las leches fabricadas a base de proteínas de soja aisladas tiene baja disponibilidad; esto se compensa añadiendo una cantidad generosa de fósforo, lo cual obliga a mantener una concentración relativamente elevada de calcio, para mantener el índice calcio/fósforo.

Es bien sabido que el calcio y el fósforo de la leche materna se absorbe mejor que si proviene de las fórmulas infantiles (Fomon et al., 1963). Este hecho se compensa aumentando las concentraciones de ambos minerales, en el caso del calcio hasta 530 mg/l frente a 300mg/l en la leche materna.

Las normativas de la ESPGAN, CEE y AAP coinciden en recomendar una relación Ca/P de 1,2-2 para fórmulas infantiles, también Hurrell y col., (1989) considera que dicho rango el óptimo. En la leche materna dicha relación es mayor (en el calostro) o igual a 2 (leche de transición o madura) (Harzer y col., 1986; Pajarón y col., 1995). En la leche de vaca esta relación es menor, situándose en 1.2-1.3:1 (George y Lebenthal, 1981; Hurrell y col., 1989; Renner y col., 1989). Las fórmulas de hoy en día se ajustan a una relación de 1.5:1 ó 2:1. La absorción de calcio disminuye en presencia de concentraciones altas de P debido a que se forma fosfato cálcico insoluble (Widdowson, 1965; Barltrop y col. 1977).

Se ha demostrado que la absorción de Ca no depende únicamente del contenido de fósforo, sino también del de lactosa y vitamina D (Tsang et al., 1977; DeLuca, 1980). Ziegler y Fomon (1983), confirmaron que la lactosa, así como una mezcla de sacarosa e hidrolizado de almidón, potencia la absorción de calcio, y además la de magnesio y manganeso, en

fórmulas infantiles. En presencia de lactosa, la absorción de calcio aumentó un 50% y la de magnesio un 20%. También la retención de fósforo se incrementó un 10%. Se cuida de que todos estos factores positivos ejerzan su influencia en los bebés alimentados con sustitutivos de leche materna.

Otro factor importante a considerar es la distribución del calcio en la fórmula infantil, se estima que un 55% del Ca de una fórmula infantil elaborada a partir de leche de vaca y suero desmineralizado procede de la leche, y de esta fracción, un 12% está unido a la caseína, de modo que todo el calcio restante procede de sales de calcio añadidas, normalmente citrato cálcico y fosfato cálcico. En este punto los preparados para lactantes y de continuación difieren sustancialmente de la leche materna que presenta un 40% del calcio total unido a proteínas séricas (Fransson y Lönnerdal, 1983).

A semejanza del calcio, el magnesio de los preparados para lactantes es menos disponible que el de la leche de mujer, por lo tanto las RDA correspondientes a este mineral son de 50 mg al día durante los seis primeros meses aunque la leche materna tan solo aporta entre 18 y 28 mg/día. La leche de vaca contiene tres veces más magnesio que la leche humana por lo que también es preciso ajustar el contenido de este mineral. Se ha indicado que la fuente de magnesio no afecta su absorción (Lönnerdal y col, 1993) sin embargo otros estudios señalan diferencias en la absorción dependiendo de la fuente de este mineral (Lindberg y col., 1990; Fine y col., 1991).

Como ya ha sido indicado en la introducción, existen dos tipos de factores que influyen la biodisponibilidad mineral: los exógenos, entre ellos los constituyentes dietéticos, los efectos derivados del procesamiento y los endógenos relacionadas con cada individuo. Los factores primeros contemplan "la disponibilidad para ser absorbido" y dependerán de la mezcla precisa de compuestos que afecta a la especie química o que forma un complejo con el mineral en el tracto intestinal. En este sentido la leche, como punto de partida de elaboración de las fórmulas infantiles, es un líquido complejo rico en nutrientes y en componentes no nutritivos cuya composición no es constante. Además de las diferencias en concentración entre

la leche de vaca y la de mujer la estructura de las fracciones de la leche es distinta, existen factores no-nutricionales que contiene la leche materna que están ausentes o en cantidades muy pequeñas en la leche de vaca y que por lo tanto no van a estar presentes en las fórmulas infantiles. Todas estas diferencias afectan a la digestibilidad y absorción de los nutrientes y en definitiva a la biodisponibilidad de los micronutrientes.

En general, se puede decir que los elementos traza de las fórmulas infantiles son menos disponibles frente a los de la leche materna. Por esto, como medida preventiva para asegurar una nutrición adecuada es necesario aumentar la concentración de estos componentes muy por encima de su contenido en la leche de mujer. A menudo las fórmulas infantiles presentan un mayor contenido de elementos traza que el que indica la etiqueta (Hurrell, 1989) y además no se tiene en cuenta el contenido de minerales del agua que se emplea en su reconstitución. Picciano (1985) ha publicado una tabla que recoge la composición de la leche mujer y el de las fórmulas líquidas americanas.

Cuadro 6.

Elemento traza	Leche madura de mujer (por litro)	Fórmula infantil (por litro)
Hierro (mg)	0.1-1.6	1.1-17
Cinc(mg)	0.14-4	3.7-12
Yodo (μ g)	30-70	30-150
Cobre (μ g)	90-630	500-2000
Manganeso (μ g)	1.9-27.5	70-2000

Las fórmulas especiales para prematuros están aún más enriquecidas puesto que estos niños nacen con un almacén de minerales en el hígado muy pequeño en comparación con los niños a término, debido a que el principal cúmulo se produce durante los tres últimos meses de embarazo.

El amplio margen que presenta el hierro en cuadro 6 se debe a que la ESPGAN (1977) no considera preciso enriquecer las fórmulas con hierro antes de los tres meses, con lo cual las fórmulas infantiles americanas presentan un contenido de 12 mg/L y las europeas de 5-8 mg/L. Sin embargo, la biodisponibilidad del hierro de una fórmula infantil es menor que la del de la leche humana habiéndose estimado la absorción en 5-10% y 50%, respectivamente (Saarinen y col., 1977; McMillan y col. 1977). La lactoferrina que está presente en altas concentraciones en la leche humana parece ser la responsable de esa elevada absorción del hierro. No obstante, parece que intervienen otros factores, ya que al calentar la leche humana esta proteína se destruye en gran medida y sin embargo la absorción de hierro permanece alta (McMillan y col, 1976).

La leche de vaca es una fuente muy escasa de hierro, niños alimentados con esta leche a partir de los 6 meses hasta los 12 disponen de unas reservas escasas de este mineral e incluso pueden presentar una deficiencia que no se plantea en los niños alimentados con una fórmula infantil durante el mismo período (Ziegler, 1989). Existe acuerdo unánime sobre los peligros de la alimentación de bebés menores de un año con leche de vaca (Wharf y col. 1997; Dallman, 1990; Vaquero, 1998).

Los principales inhibidores del hierro no hemo son el calcio, determinadas proteínas, el fitato, el manganeso algunos polifenoles (Fomon, 1995). El cuadro 7 contempla dos de estos inhibidores, así como las cantidades en que son aportadas por leches naturales y adaptadas.

Cuadro 7. Cantidades en que son aportadas inhibidores del hierro no hemo en leches de vaca y preparados para lactantes (Fomon, 1995)

	Calcio		Proteínas	
	mg/ml	Ingesta (mg)	g/dl	Ingesta (g)
F. I. leche vaca	47	85	1.5	2.7
Leche entera vaca	115	207	3.2	5.8
Leche 2%	130	234	3.5	6.3

* Todos los valores corresponden a una toma de 180 ml.

Una proporción relativamente alta del hierro de la leche de vaca está unido a la caseína (Hegenauer y col., 1979; Lönnerdal, 1990). Probablemente esta unión interfiera en la absorción del metal, ya que Hurrell y col. (1989; 1990) observaron que la hidrólisis de la caseína y de las proteínas séricas disminuía el efecto inhibitor y además, el elevado contenido de calcio de la leche de vaca también contribuye a reducir la absorción del metal (Dallman, 1990).

Desde que Walravens y Hambridge (1976) observaron que fórmulas enriquecidas en Zn inducían un mayor crecimiento en niños de 6 meses de edad, se han incrementado los niveles de este mineral en estos alimentos. El Zn de los preparados para lactantes también presenta una menor biodisponibilidad que el de la leche de mujer. Además, Cousins y Smith (1980) han indicado que una alta concentración de proteína en las fórmulas inhibe la absorción de Zn, y Hurrell (1989) sugiere que concentraciones altas de hierro también pueden producir este efecto negativo.

El zinc de la leche humana está fundamentalmente en la fracción sérica, y cantidades menores se encuentran en la grasa y en la caseína, mientras que en la leche de vaca, casi todo está unido a la caseína, resultando las fórmulas infantiles con una distribución del zinc más similar a la de la leche de vaca (Sandström y col., 1983). Existen dos teorías que explican la mayor biodisponibilidad de zinc de la leche humana respecto a la de vaca: 1) La unión de una parte importante de Zn a un ligando de bajo peso molecular (quizá citrato) puede facilitar su transporte a través del tracto gastrointestinal o puede evitar que sea secuestrado por otras sustancias que reducirían su disponibilidad (Hurley y col. 1977; Eckhert y col., 1977) 2) La unión de una fracción importante del zinc de la leche vaca a la caseína (que está presente en una concentración 10 veces mayor que en la leche de mujer (Hambreus, 1977) puede hacer que este elemento quede atrapado en el cuajo de la caseína, en el estómago, y que no llegue a digerirse por completo en el intestino delgado, y como consecuencia una parte considerable sería disponible para su absorción (Blakeborough y col. 1983, 1986; Harzer y Kauer, 1982; Lönnerdal, y col., 1980).

Alegria y col. (1997) estudiaron la disponibilidad de zinc en fórmulas infantiles suplementadas con distintas sales de zinc y obtuvieron los mejores valores de la dializabilidad con gluconato y óxido de zinc en fórmulas elaboradas a partir de productos lácteos respecto a los productos de soja. En las fórmulas infantiles a base de proteína de soja puede tener cierta relevancia la concentración de fitatos, un potente inhibidor de este mineral (Sandström, 1997), a pesar de que el calcio y el fitato forman un complejo muy poco estable, diversos estudios apuntan a que el factor principal que determina la solubilidad del fitato, e indirectamente la del zinc, en el lumen intestinal es la relación entre el calcio dietético y el fitato.

La "digestión intestinal" óptima de cationes se da cuando la relación metal:fitato es muy baja o muy alta (Graf, 1983). Esta hipótesis está estrechamente relacionada con el concepto "medio catiónico total" desarrollada por Byrd y Matrone (1965) para la disponibilidad mineral, según el cual la capacidad que un cierto mineral tiene de entrar en su vía de absorción dentro del epitelio mucoso, o bien de interaccionar con determinados componentes de la dieta (favoreciéndose o inhibiéndose su absorción), depende de la concentración en que se encuentren presentes en el lumen los otros cationes que pueden competir por la misma ruta de absorción o interaccionar con el mismo compuesto dietético. Es interesante destacar que el zinc y el hierro compiten por los mismos lugares de absorción en la mucosa intestinal (Solomons y Jacob, 1981; Solomons y col., 1983). Una relación de hierro:zinc de 2:1 reduce la absorción de zinc notablemente en humanos. Sin embargo, no se observó ningún efecto sobre la absorción de zinc cuando se ingería conjuntamente hierro hemo con zinc inorgánico. Sin embargo, Solomons y Jacob (Solomons y Jacob, 1981) señalan que alimentando a bebés con fórmulas suplementadas con hierro la absorción de zinc se puede deprimir en gran medida. En ensayos con animales se ha visto que otros minerales también interactúan con la utilización de zinc, entre éstos está el calcio, cobre, cadmio, selenio, molibdeno y mercurio (Davis, 1974; Becker y Hoekstra, 1971; Solomons y col., 1983).

Los niños nacen con unas considerables reservas de cobre en el hígado, sin embargo niños prematuros alimentados con fórmulas infantiles con un bajo contenido de cobre

muestran deficiencia de cobre (Al-Rashid y Spangler, 1971; Ashkenazi y col., 1973). y niños de seis meses de edad alimentados con leche de vaca y harina de maíz mostraron deficiencias de este elemento (Naveh y col. 1981). La concentración de cobre en la leche humana oscila entre 90 y 600 $\mu\text{g/L}$, sin embargo las fórmulas, especialmente las pretérmino, contienen más: 500-2000 $\mu\text{g/L}$ las fórmulas americanas y 75-300 $\mu\text{g/L}$ las europeas. Se sabe poco en lo que respecta a la biodisponibilidad de este mineral. Haschke y col., 1986) observaron que la absorción de cobre disminuye en lactantes cuando se les administra altas concentraciones de hierro y ejerce un efecto negativo altas concentraciones de zinc en determinados mecanismos (Turnlund, 1994).

2.6.2.6. Vitaminas

Las necesidades de vitaminas fueron establecidas en el Codex Alimentario y no modificadas por las recomendaciones de la ESPGAN en 1977. El National Research Council en la 10ª edición de las RDA de 1989, las modifica ligeramente, las publicaciones más recientes hablan en términos de valores de referencia dietarias, según las cuales las recomendaciones de ingestas de vitaminas diarias vienen dadas por rangos (Powers, 1997).

Las concentraciones de vitaminas de la leche materna se han tomado como criterio para establecer las ingestas adecuadas para el niño, sin embargo la leche materna es deficitaria en vitamina D y vitamina K en los primeros días (los niveles de ambas están estrechamente relacionadas con la ingesta de la madre) en los primeros días (Fomon, 1995) y por el contrario la β -caroteno está presente en cantidades sustanciales en el calostro, 2.13 mg/L en el día 1 y disminuye notablemente, hasta 0.4 mg/L en el día 5 (Goedhart y Bindels, 1994), debido a estos cambios de composición, a la influencia de las estaciones y a las diferencias de biodisponibilidad de las vitaminas de la leche materna respecto al de las fórmulas el criterio anteriormente indicado parece no estar del todo justificado y sería preciso tener en cuenta aspectos fisiológicos (Powers, 1997).

Como ha sido más ampliamente tratado en otros capítulos de esta memoria los micronutrientes aquí tratados son quizá el componente alimenticio más afectado por el calentamiento, y posteriormente por el almacenamiento, siendo las más lábiles la vitamina A, C y la tiamina por ello la mayoría de las vitaminas presentes en las fórmulas son añadidas durante su elaboración (Hurrell y col., 1989).

Una fórmula adaptada cubre todas las necesidades si el lactante recibe como mínimo 750 ml al día.

2.6.3. Formas de presentación y efectos nutritivos de los distintos procesamientos

La manera más común de comercializar los preparados para lactantes es en polvo, que más tarde deben reconstituirse con agua. Otra forma es como líquido, concentrado o listo para tomar. El procesamiento industrial que se aplica para la fabricación de cada uno de estos tipos no debería variar los niveles de nutrientes presentes en el producto final, no obstante, esto no suele ser así, y por ejemplo en el caso de las vitaminas termolábiles es necesario considerar las pérdidas que se producen durante el tratamiento térmico y añadir las cantidades adicionales durante la elaboración de la fórmula (Hurrell y col., 1989).

Durante la fabricación de fórmulas infantiles en polvo, antes de mezclar generalmente se desmineraliza el componente proteico; este paso implica la pérdida de nutrientes (elementos traza, vitaminas hidrosolubles, carbohidratos, aminoácidos y pequeños péptidos). La mezcla se lleva a cabo en forma acuosa en tanques con agitación mecánica, a continuación se homogeniza, se concentra por evaporación y finalmente se pasa a polvo por nebulización.

En el caso de las fórmulas líquidas se pueden esterilizar por calor según el método UHT (aproximadamente 150°C durante 3 segundos) y posteriormente se envasa asépticamente o se esteriliza por el método convencional en el propio envase (10-15 minutos a unos 115°C). No obstante, los tratamientos térmicos aplicados, tanto para los preparados en polvo, como

para los líquidos, varían considerablemente, por lo que se patentiza la necesidad de investigar los efectos del procesamiento sobre la biodisponibilidad de sus aminoácidos y la calidad de las proteínas, así como las repercusiones de sus posibles alteraciones sobre otros nutrientes como los minerales.

Las fórmulas infantiles contienen mayores cantidades de proteína que la leche humana para asegurar que el niño recibirá aportes adecuados de aminoácidos de una fuente cuya digestibilidad se supone menor (Lönnerdal y Chen, 1990). Sin embargo, la digestibilidad de las proteínas sometidas a tratamiento térmico podría ser relativamente elevada, por lo que es posible que la concentración de proteínas de las fórmulas sea innecesariamente alta. Pero en este aspecto sería necesario diferenciar entre los distintos tratamientos térmicos aplicados a las fórmulas infantiles, según el informe de una Consulta de Expertos FAO/OMS (1989), los datos relativos a la calidad y utilidad de las proteínas de los productos lácteos infantiles han llevado a pensar que los preparados líquidos son quizá de menor calidad que los productos en polvo de esos mismos fabricantes, posiblemente a causa del mayor calor requerido en el proceso de elaboración. Sin embargo, la literatura científica sobre este tema es muy escasa.

Experimentos *in vivo*, en lactantes y en animales de experimentación, han demostrado que la digestibilidad de las proteínas es menor en las formulas esterilizadas en su envase que en los productos en polvo o en los tratados mediante UHT (Keith y Bell, 1988; Sarwar, 1989). Como la capacidad digestiva de los recién nacidos es relativamente inmadura, con bajos niveles de secreción de ácido clorhídrico y con limitación de la actividad de la pepsina y de los enzimas pancreáticos, algunos productos de reacción formados durante el procesamiento pueden ser difíciles de digerir. Además, las proteínas y los péptidos no digeridos provenientes de las fórmulas pueden captar minerales traza y de esta forma limitar su absorción, por consiguiente conseguir una mayor digestibilidad proteica en las fórmulas infantiles probablemente producirá en los niños que las toman un incremento en el transporte de minerales y oligoelementos (Lönnerdal, 1989).

Sarwar y col. (1989) valoró la digestibilidad de la proteína y aminoácidos de fórmulas infantiles líquidas obtenidas por esterilización convencional y en polvo a través de un estudio de balance en ratas destetadas. Sus resultados indicaban que las digestibilidades de la proteína, lisina, metionina y cisteína en las fórmulas líquidas eran hasta un 13% más bajas que las de su homólogo en polvo. También encontró que la eficacia proteica de la forma líquida era un 25% inferior a la del polvo y que los índices de biodisponibilidad de la lisina, metionina y cistina eran más bajos en la fórmula líquida.

Por lo que respecta a la posible alteración de los hidratos de carbono durante el procesamiento que se aplica a las formulas infantiles, la degradación de la lactosa por isomerización originando lactulosa es cuantitativamente más importante que a través de la reacción de Maillard.

La lactulosa, que ya ha sido tratada, se relaciona con el deterioro del color, gusto y olor de la leche (Andrews, 1986). A diferencia de otros azúcares de la leche no es hidrolizado y absorbido en el intestino delgado (Dahlqvist y Gryboski, 1965), sino que llega al ciego y ahí es fermentado por la microflora dando lugar a ácidos y gases, especialmente hidrógeno.

En 1957, Petuely observó que la lactulosa tenía un efecto estimulante sobre el crecimiento de bifidobacteria de la flora intestinal de los lactantes (Mc Gillivay y col., 1959) y también le atribuyó propiedades laxantes. Bush (1970) también señaló que se daba el efecto laxante siempre que se administrara en cantidad suficiente. Hendrickse y col. (1977) tuvieron que elevar las dosis de lactulosa producían episodios de diarrea en niños alimentados con fórmulas infantiles. Años más tarde, Nagendra y col. (1992), corroboró el crecimiento de bifidobacterias, y en trabajos posteriores (Nagendra, 1994) indicó que la adición de 0.5 a 1.0% de lactulosa a fórmulas infantiles administradas a ratas no modificó la absorción ni retención de nitrógeno, calcio, fósforo ni hierro.

Se han llevado a cabo pocos estudios sobre la lactulosa en fórmulas infantiles. Las fórmulas esterilizadas son las que presentan un mayor contenido (Hurrell, 1989). Al comparar

la formación de lactulosa en leche de vaca y fórmulas infantiles sometidas a los mismos tratamientos térmicos, se observa que la conversión de lactosa a lactulosa es mayor en los preparados para lactantes (Hurrell, 1989). Este hecho según indica Hurrell no implica que el alimento infantil haya sido sometido a un tratamiento más severo, sino más bien a su composición: parece que además del pH, la concentración de fosfatos y citratos son factores determinantes en la formación de lactulosa (Martínez-Castro y col, 1986). En 1977, se halló una concentración de lactulosa media de 250 mg/dl en las leches adaptadas en líquido e indetectable en las fórmulas en polvo (Hendrickse, 1977; Hendrickse y col., 1977). En un estudio ulterior realizado por otros investigadores, la concentración de lactulosa en fórmulas infantiles líquidas a base de leche oscilaba entre 340 y 442 mg/dl cuando se exponían a 120°C durante 15 a 20 minutos, y entre 54 y 78 mg/dl cuando se procesaban en biberones de plástico a 180°C durante pocos segundos e inmediatamente se enfriaba (Beach y Menzies, 1983). Ya en esta década Nangpal y col. (1990) indicaron que el contenido de lactulosa era mucho más bajo en las formas en polvo que en las líquidas y Rossi y Pompei (1991) describieron que la lactulosa en fórmulas sometidas a UHT (140°C, 24 s) alcanzaba concentraciones de 1020 mg/l y que este valor se incrementaba hasta 1280 mg/l cuando se sometía a esterilización en botella.

Además, algunos autores han indicado que el almacenamiento de estas fórmulas infantiles líquidas, tanto esterilizados convencionalmente como por UHT, puede incrementar aún más la concentración de lactulosa (Bernhart y col., 1965; Vekker, 1988).

El contenido de furosina es generalmente más alto en las preparaciones en polvo porque la reacción de Maillard es más intensa en alimentos con bajo contenido en humedad (Labuza y Saltmarch, 1981).

En estudios recientes, Henle y col. (1995) observaron que en las fórmulas infantiles se alcanzaban valores de 930-1890 mg de furosina por 100 g de proteína en las formas en polvo y de 730 a 1250 mg/100 g de proteína en las líquidas.

Las pérdidas de lisina vía la reacción de Maillard son mayores en las fórmulas adaptadas que en la leche de vaca porque el contenido de lactosa es mayor. Puesto que el nivel inicial de lisina en las fórmulas sin procesar es de 8.5 g/16 g N en las que predomina la caseína, y de más de 9 g/16 g N en las que predominan las proteínas séricas, la concentración de lisina que queda tras el procesamiento sigue siendo superior a la que presenta la leche de mujer (6.7 g/16 g/N) (Hurrell y Finot, 1983).

La reacción de Maillard en las formas en polvo generalmente no va más allá de la etapa inicial en la que se forma lactulosil-lisina. Sin embargo, en las formas líquidas la reacción puede proseguir a etapas avanzadas. En las formulas especiales que contienen glucosa en lugar de lactosa esta reacción tiene mucha más importancia debido a la mayor reactividad de este azúcar. También son de considerar las fórmulas que contienen proteínas parcialmente digeridas puesto que los grupos α -amino pueden reaccionar con la lactosa. Se ha señalado que la concentración de lisinoalanina (LAL), que procede de la reacción de la lisina con la serina fosfato, alcanza en las fórmulas líquidas UHT concentraciones de 160-370 mg por kg de proteína cruda y de 410-1030 mg/kg en las fórmulas esterilizadas en su envase. Finot (1993) en ensayos con ratas observó que la ingesta de LAL inducía alteración renal con citomegalia, aunque era reversible y no se vio que se produjera en otros animales de experimentación.

Los estudios realizados en humanos son muy limitados. Fomon y Owen (1962) indicaron que el crecimiento y el balance de nitrógeno no estaban deprimidos en lactantes a término alimentados con una fórmula infantil a base de leche sobrecalentada. Estudios posteriores llevados a cabo en niños prematuros valoraron la pérdida de lisina a través de la formación de productos de la reacción de Maillard y LAL en fórmulas infantiles líquidas esterilizadas mediante UHT y convencionalmente, obteniendo una pérdida de lisina de un 6.2% y 15.6%, respectivamente; la excreción urinaria de productos de la reacción de Maillard era del 1.3% y 3.9% de la cantidad ingerida, respectivamente; y la formación de LA era de 6.2 a 9.3% en la fórmula UHT y esterilizada, respectivamente. No obstante, estos valores no afectaron la excreción urinaria de microproteínas ni provocaron daños en el riñón (Langhedries y col., 1992).

Material y Métodos

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Diseño experimental

Estudio de los efectos del calentamiento doméstico por microondas frente al tradicional al baño María de varios tipos de leche de vaca y fórmulas infantiles, y del calentamiento implicado en el procesamiento industrial de fórmulas infantiles sobre la biodisponibilidad mineral.

Dicho estudio se lleva a cabo mediante ensayos de biodisponibilidad *in vitro*, empleando diálisis, y otros en rata, mediante técnicas de balance y composición tisular.

Experimento I

Estudio de la influencia del calentamiento al baño María o por microondas de la leche de vaca entera y descremada sobre la biodisponibilidad mineral.

Experimento II

Estudio del efecto del calentamiento al baño María o por microondas de una fórmula infantil en polvo y líquida sobre la biodisponibilidad mineral.

Experimento III

Estudio del efecto del tratamiento industrial implicado en la preparación de fórmulas infantiles sobre la biodisponibilidad de los minerales y digestibilidad proteica.

3.2. EXPERIMENTO I

3.2.1. Muestras utilizadas

Se emplearon leche de vaca UHT entera y descremada de la misma marca comercial. El contenido mineral según análisis se especifica en la tabla 1..

Tabla 1.- Composición mineral de las leches empleadas según análisis

	CALCIO (mg/100ml)	MAGNESIO (mg/100ml)	FÓSFORO (mg/100ml)	HIERRO (μ g/100ml)	ZINC (μ g/100ml)	COBRE (μ g/100ml)
Entera	120.89 \pm 0.73	10.19 \pm 0.06	102.5 \pm 0.95	65.0 \pm 5.4	405.00 \pm 5.5	35.00 \pm 2.8
Descremada	106.21 \pm 2.00	10.65 \pm 0.33	98.6 \pm 0.63	57.5 \pm 7.5	395.0 \pm 12.5	40.0 \pm 5.0

Valores medios \pm desviación estándar de seis determinaciones.

3.2.2. Realización de los calentamientos

3.2.2.1. Calentamiento al baño María

Se utilizaron dos baños de agua termostatizados de agua (Selecta Unitronic 320). Las condiciones de calentamiento se establecieron realizando distintas pruebas para estandarizarlas. Se dispuso de alícuotas 100 ml de leche en botellas de vidrio que se metieron en el primer baño para controlar una temperatura inicial de 25°C, la cual se controló mediante un termómetro de vidrio. Posteriormente la mitad de las botellas se transfirieron a un segundo baño hasta alcanzar una temperatura final de 65°C. Se consideró el control "no calentado" el que se mantuvo a 25°C.

3.2.2.2. Calentamiento al microondas

Se realizó en un equipo MDS-2000 (2400 MHz, CEM Corporation, U.S.A.). Se puso a punto el equipo y también se llevaron a cabo distintas pruebas para estandarizar las condiciones de calentamiento: se efectuaron calentamientos a distintos tiempos, temperaturas y potencias del magnetrón, se emplearon distintos volúmenes de leche en las botellas de vidrio, variando tanto el número de botellas como su posición en el plato giratorio. Los ensayos se repitieron varias veces y se fijaron los parámetros para que la leche presentara una temperatura final de 65 ± 1 °C.

El calentamiento mediante microondas se efectuó una vez que las botellas se hallaban a 25°C. Las condiciones de calentamiento fueron: potencia del magnetrón al 100%, tiempo de 4 minutos y 30 segundos y presión 0. El control de la temperatura se llevó a cabo inmediatamente finalizado el calentamiento con un termómetro de vidrio tras removerse ligeramente.

3.2.3. Ensayos de digestión *in vitro*

Se llevaron a cabo en alícuotas de la leche de vaca entera y descremada: sin calentar, calentadas al baño María o al microondas.

La digestión *in vitro* y la diálisis de los elementos se realizó siguiendo la técnica de Miller y col. (1981), modificada por Vaquero y col. (1992). La técnica consta de dos fases: una de digestión gástrica y otra de digestión intestinal, las cuales tuvieron una duración de dos y tres horas respectivamente.

Para iniciar el proceso de digestión gástrica, se pesaron en un bote de polipropileno de 250 ml de capacidad, 225 g de cada muestra de leche. El peso de la muestra se eligió con el fin de que las concentraciones de los distintos minerales en las tres fracciones resultantes fueran detectables al final del proceso.

a) Digestión gástrica

El pH se ajustó a 2.0 con HCl 6M y a continuación se añadió una solución de pepsina, 1.6 g de pepsina (Sigma Chemical Co.; nr 7000, St. Louis, MO) en 10 ml de HCl 0.1M, en la proporción 0.5 g de pepsina por 100 g de muestra. Una vez añadido el enzima gástrico se incubó en un baño de agua con una agitación de 100 oscilaciones por minuto a 37°C durante dos horas, con objeto de imitar el proceso de digestión gástrica.

b) Determinación de la acidez

Transcurridas las dos horas de digestión gástrica se pusieron los botes en nevera durante media hora. La acidez del digerido gástrico se determinó tomando aproximadamente 20 g del mismo previa adición de 0.25 g de la solución de pancreatina y sales biliares por gramo de digerido gástrico. Para la valoración se utilizó una solución de NaOH 0.5M y se calculó el número de equivalentes de NaHCO_3 necesarios para que el pH de la mezcla fuese 7.5.

c) Digestión intestinal

Se tomaron tres alícuotas de 40 g del digerido gástrico que se colocaron en botes de plástico de 250 ml de capacidad, en cada uno de los cuales se introdujo un segmento de membrana de diálisis que permitía un paso máximo de partículas de 12000 Å (Bestl nr. 1063F09 Medicell International LTD tamaño: 9 36/32") y que contenía 50 ml de una solución de NaHCO_3 , cuya concentración era dependiente de la valoración de la acidez del digerido gástrico; los botes se colocaron durante media hora en el baño a 37°C y a 100 oscilaciones por minuto.

A continuación se añadió a cada uno de los tres botes 10 ml de una solución de pancreatina y sales biliares: 0.4 g de pancreatina (Sigma Chemical Co., nr. P-1750, St. Louis MO) y 2.5 g de sales biliares (Sigma Chemical Co., B-8756, St. Louis MO) en 100 ml

NaHCO₃ 0.1M y se incubaron en el baño de agua durante tres horas. Transcurrida cada hora de incubación intestinal se sacaba un bote del baño, se extraía la membrana de diálisis que se lavaba exteriormente con agua desionizada, y su contenido se recogía, controlándose el peso y el pH del dializado y separando alícuotas para la determinación de minerales.

En estos ensayos parecía interesante conocer si los elementos que no atravesaban la membrana quedaban en forma soluble o precipitados y saber su cuantía, ya que en otros trabajos observamos indicios de que *in vivo* algunas formas no dializadas podían absorberse (Aspe y col., 1992). Por ello, basándose en estos primeros resultados de nuestro grupo, Aguirre (1996) preparó una continuación del método original que sirvió para estudiar la fracción no dializada y cuantificar la porción soluble e insoluble, como se describe a continuación:

La fracción no dializada se pesaba y se controlaba su pH, a continuación se centrifugaba a 1000 g durante 15 minutos, separando por decantación el no dializado soluble y el precipitado. Una vez determinado el peso de ambas fracciones se adicionaba agua desionizada al precipitado, se homogeneizaba y se pesaba repartiendo su contenido en crisoles. También se tomaban alícuotas del no dializado soluble en crisoles.

Finalmente porciones de dializado, no dializado soluble y precipitado, se incineraban en una mufla a 450-500°C y las cenizas obtenidas se disolvían en una mezcla HCl/HNO₃/H₂O en una proporción 1/1/1, se diluían adecuadamente y se analizaban Ca, Mg, Fe y Zn por espectrofotometría de absorción atómica. El P se determinó por fotocolorimetría (AOAC, 1980).

Los resultados se expresan como porcentaje del elemento dializado, no dializado soluble o precipitado respecto al total presente al final de la digestión gástrica, y como elemento dializado por 100 ml de leche.

De utilizó material de plástico y desechable en la medida de lo posible y todo el material se lavó con HNO₃ 10N.

3.2.4. Ensayos *in vivo*

Se realizaron ensayos biológicos de balance de los minerales: calcio, magnesio, fósforo, hierro, cobre y zinc, en ratas Wistar de nuestro criadero de 16 días de edad, con un peso inicial de 30±0,6 g (media ± error standard), procedentes del mismo cruce. Se formaron 3 grupos constituidos por 12 animales, 6 machos y 6 hembras que consumieron como único alimento leche de vaca entera no calentada, calentada al baño María o por microondas. Los animales se alojaron de 6 en 6 en jaulas macrocolon que permiten la recogida por separado de heces y orina, así como la cuantificación de la ingesta. Los animales se situaron en una cámara termorregulada a 22±2°C con una humedad relativa entre el 50-70% y un fotoperiodo controlado de 12 horas.

Tras un período de adaptación de 24 horas, se procedió durante 6 días a la cuantificación de la ingesta y a la recogida de heces y orina para realizar el balance de minerales.

La recogida de orina se realizó sobre HCl al 0,5% (v/v). Se filtró a través de papel Whatman nº41 libre de cenizas, y se diluyó convenientemente con la misma solución ácida, congelándose posteriormente hasta su análisis. Las heces se desecaron, se pesaron y se homogenizaron y una parte se incineró para el análisis mineral.

El último día, la mitad de los animales de cada grupo se sacrificaron previa anestesia con Nembutal (pentobarbital sódico) (Laboratorios Abbott, Madrid) al 30% vía intraperitoneal, en dosis de 0,15ml/100g de peso. En estos animales se procedió a la extracción de sangre, mediante canulación de la carótida, que se recogió sobre tubos lavados con una solución ácida (HNO₃ 10 N) que se centrifugaron a 1000 g para la obtención de hematíes que se congelaron

para su posterior análisis. También se recogió una pequeña muestra con capilar heparinizado para realizar la determinación del hematocrito

Se separaron hígado, bazo y una porción de piel que se pesaron y se congelaron a -20°C hasta su análisis.

La sangre se centrifugó a 1000 g para la obtención del suero. Una vez separado éste, se lavó el coágulo con solución salina y se centrifugó de nuevo a la misma velocidad, operación que se realizó tres veces, para la obtención de los hematíes que, al igual que el suero, también se congelaron para su posterior análisis

La otra mitad de los animales de cada grupo se sacrificaron mediante dislocación cervical y se congelaron enteros a -20°C hasta el momento de la determinación de su contenido de nitrógeno y minerales.

Se procedió a la digestión ácida de estas ratas para lo cual se introdujeron individualmente en matraces erlenmeyer de 500 ml con 250 ml de HCl 6N alojados en un baño de agua termostatzado a 100°C que cuenta con un sistema de refrigeración acoplado para mantener los volúmenes de los matraces constantes. Cuando la muestra estaba totalmente digerida se filtró a través de papel Whatman nº 41 y se aforó a un volumen conocido con agua desionizada.

Todo el material utilizado en los ensayos in vivo se lavó con detergente enzimático "Tergazime" (Alconox) y HCl diluido. En la medida de lo posible se empleó material de plástico de polipropileno. El material quirúrgico fue de acero inoxidable.

3.2.4.1. Parámetros controlados

- Peso de las ratas en los días 1, 4 y 6.

- Ingesta líquida correspondiente a todo el período del experimento.
- Eliminación fecal de: calcio, fósforo, magnesio, zinc, hierro y cobre; y urinaria de calcio, fósforo, magnesio, zinc y hierro.
- Composición tisular y corporal de minerales:
 - Hígado: peso, hierro, zinc y cobre.
 - Bazo: peso, hierro y zinc.
 - Piel: hierro, zinc y cobre.
 - Hematíes: hierro, zinc y cobre.
 - Rata entera: peso, calcio, magnesio, fósforo, hierro, cobre y zinc.

3.2.4.2. Índices utilizados

- Índice hepatosomático:

$$I. H. S. = \frac{\text{Peso del hígado (g)}}{\text{Peso de la rata (g)}}$$

Para el estudio de los balances de minerales se han empleado los siguientes índices:

A) Absorción aparente: cantidad ingerida del mineral menos cantidad eliminada por heces.

$$\text{Absorbido} = \text{Ingerido} - \text{Fecal}$$

B) Utilización digestiva del mineral o coeficiente de digestibilidad aparente: porcentaje absorbido del ingerido.

$$\%A/I = \frac{(\text{Ingerido} - \text{Fecal})}{\text{Ingerido}} \times 100$$

C) Balance o retención aparente: cantidad absorbida del mineral menos la cantidad eliminada por orina.

$$\text{Retenido} = (\text{Ingerido} - \text{Fecal}) - \text{Orina}$$

D) Utilización metabólica: porcentaje del mineral retenido respecto del absorbido.

$$\%R/A = \frac{(\text{Ingerido} - \text{Fecal}) - \text{Orina}}{(\text{Ingerido} - \text{Fecal})} \times 100$$

E) Utilización nutritiva global: porcentaje del mineral retenido respecto del ingerido.

$$\%R/I = \frac{(\text{Ingerido} - \text{Fecal}) - \text{Orina}}{\text{Ingerido}} \times 100$$

3.2.4.3. Técnicas analíticas empleadas

En la leche de vaca se llevó a cabo el análisis de minerales. Las muestras se incineraron a 450-500°C y las cenizas se disolvieron en una mezcla ácida (HCl/HNO₃/H₂O en las proporciones 1/1/1) (Suprapur, Merck) diluyendo adecuadamente con agua desionizada (Mili-Q plus, Ultrapure Water System, Millipore, U.S.A.). Los elementos Ca, Mg, Fe, Zn y Cu se determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica (E.A.A.) en un aparato Perkin-Elmer 1100B (Norwalk, CT, USA). Se adicionó cloruro de lantano al 0,5% a las muestras y a los estándares de las determinaciones de calcio y magnesio para evitar posibles interferencias con sulfato y fosfato. El fósforo se cuantificó por colorimetría (A.O.A.C., 1980). Los estándares o soluciones de calibración para la determinación de calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc se prepararon con soluciones Tritrisol (Merk).

En las muestras biológicas se analizaron:

- Minerales por espectrofotometría de absorción atómica (E.A.A.):

* En orina: Ca, P, Mg, Fe y Zn .

* En heces: Ca, P, Mg, Fe, Zn y Cu

* En el filtrado de la disolución ácida diluida de las ratas: Ca, P, Mg, Fe, Zn y Cu.

* En el filtrado de las cenizas procedentes de hígado, hematíes y piel: Fe, Zn, Cu; y en el bazo: Fe y Zn.

-Hemoglobina en sangre fresca, por colorimetría mediante el método de la cianohemoglobina (Test-Combination Hemoglobin Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania).

- Hematocrito en sangre fresca, recogida sobre un capilar heparinizado, que se centrifugó a 1000 g. y se midió la proporción de paquete eritrocitario en el total de sangre.

- Nitrógeno: se determinó en la solución ácida de las ratas mediante el método de Kjeldal.

Para las determinaciones analíticas se utilizaron duplicados o muestras simples de los materiales biológicos. Las muestras se diluyeron apropiadamente para obtener concentraciones de análisis en el rango lineal de lectura.

Precisión y exactitud de los análisis realizados:

Para controlar la exactitud en la determinación de los distintos minerales se emplearon tres patrones externos diferentes:

- Hígado liofilizado (material de referencia certificado CRM 185, Community Bureau of Reference B.C.R., Bruselas, Bélgica) cuyos valores certificados son (media \pm desviación estándar): hierro: 214 ± 9 $\mu\text{g/g}$; cobre: 189 ± 6 $\mu\text{g/g}$; zinc: 142 ± 5 $\mu\text{g/g}$. Los valores obtenidos fueron: hierro: 211 ± 2 $\mu\text{g/g}$; cobre: 194 ± 6 $\mu\text{g/g}$; zinc: 142 ± 4 $\mu\text{g/g}$.

- Polvo de leche (material de referencia certificado CRM 63, Community Bureau of Reference B.C.R., Bruselas, Bélgica) cuyos valores certificados (media \pm desviación estándar) son: calcio: $12,6 \pm 0,3$ mg/g; magnesio: $1,12 \pm 0,03$ mg/g. Los valores

obtenidos fueron (media \pm desviación estándar): calcio: $12,8\pm 0,2$ mg/g; magnesio: $1,11\pm 0,03$ mg/g).

La precisión de los análisis minerales se controló también en los distintos materiales biológicos empleados en los diferentes ensayos, obteniéndose los siguientes Coeficientes de Variación interensayo (%):

MUESTRAS	Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn
LECHE	1.03	0.65	1.55	4.5	2.59	1.3
HECES	2.26	1.13	1.72	4.19	3.77	2.33
ORINAS	0.50	1.13	1.72	3.16	3.77	2.33

Los Coeficientes de Variación interensayo de las determinaciones de macronutrientes fueron: humedad: 1,75%; proteína: 4%; grasa: 4,2%.

3.3. EXPERIMENTO II

3.3.1. Muestras utilizadas

Se emplearon dos preparados para lactantes en forma de polvo y líquida procedentes del mismo fabricante. El contenido mineral según análisis se especifica en la tabla 2

Tabla 2.- Composición mineral de las formulas en polvo y líquida según análisis

	CALCIO (mg/100ml)	MAGNESIO (mg/100ml)	FÓSFORO (mg/100ml)	HIERRO (μ g/100ml)	ZINC (μ g/100ml)	COBRE (μ g/100ml)
Polvo	55.16 ± 0.07	5.06 ± 0.03	32.81 ± 0.12	446.31 ± 5.50	412.64 ± 4.51	57.17 ± 1.85
Líquida	53.55 ± 0.43	5.25 ± 0.07	33.52 ± 2.00	535.50 ± 30.33	390.05 ± 4.93	65.00 ± 2.76

Valores medios \pm error estándar. Para las determinaciones analíticas se utilizaron de 4 a 6 muestras de cada tipo de fórmula.

3.3.2. Realización de los calentamientos

Los calentamientos al baño María y microondas se realizaron, previa reconstitución al 12.7% de la fórmula en polvo, como se especifica en los apartados 3.2.2.1. y 3.2.2.2.

3.3.3. Ensayos de digestión *in vitro*

Se llevaron a cabo en la fórmula infantil en polvo reconstituida al 12.7% no tratada y tratada al baño María o microondas y la fórmula infantil líquida no tratada y tratada al baño María o microondas. El procedimiento descrito en el apartado 3.2.3 fue seguido de idéntica manera.

3.3.4. Ensayos con animales

Los ensayos biológicos de balances minerales se realizaron de manera idéntica a los descritos en el apartado 3.2.3., utilizándose en este caso 6 grupos de 12 animales (6 machos y 6 hembras) con un peso inicial de 30 ± 0.3 g (media \pm error estándar) que consumieron como único alimento las distintas fórmulas infantiles no tratadas o después de haber sido tratadas.

3.3.4.1. Parámetros controlados

Los mismos que los que especifican el apartado 3.2.4.1.

3.3.4.2. Índices utilizados

Los mismos que se definen en el apartado 3.2.4.2.

3.3.4.3. Técnicas analíticas empleadas

Se emplearon las mismas técnicas que se recogen en el apartado 3.2.4.3.

3.4. EXPERIMENTO III

3.4.1. Muestras utilizadas

Se emplearon cuatro fórmulas infantiles del mercado de la marca comercial A en polvo y líquida esterilizada convencionalmente (la misma que se utilizó en el experimento II) y en polvo y líquida UHT de la marca B. Los resultados analíticos correspondientes a la composición de minerales y nitrógeno de las fórmulas anteriormente indicadas se recoge en la tabla 3.

3.4.2. Análisis de indicadores térmicos

Con objeto de evaluar el daño térmico de los distintos tipos de fórmulas infantiles se determinó su contenido de lactulosa y furosina.

3.4.2.1. Lactulosa

Se analizó el contenido de lactulosa en las distintas formulas siguiendo el método propuesto por Olano y col. (1986) para la leche. Según este método 1 ml de leche se lleva hasta 10 ml con metanol con el fin de precipitar proteínas y grasa. Al cabo de una hora se filtran las muestras precipitadas, en el caso de la fórmula fue preciso esperar 48 horas. Después se filtran las muestras precipitadas y a 1 ml de la solución obtenida se e añade 1 ml de solución patrón interno, fenil- β -glucósido al 1% en metanol/agua (70:30). Posteriormente se evapora a sequedad en rotavapor a temperatura ambiente y a continuación se añade, 0,1 ml de N-trimetilsilil imidazol como agente derivatizante, manteniéndolas en una estufa a 65°C durante media hora para favorecer la reacción. Una vez que se enfrían se añaden 0,1 ml de hexano y 0,2 ml de agua y se inyectan en el cromatógrafo de 0,2 a 1 μ l de la fase orgánica.

Los análisis cromatográficos de los trimetilsilil derivados de los carbohidratos se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Sigma 3B (Perkin Elmer) equipado con detector

de ionización de llama, utilizando un columna microrellena con OV-17 al 2% sobre Volaspher A-2 120-140 mesh (Merck desionizado. Como gas portador se empleó nitrógeno a un flujo de 10 ml/min. La temperatura del inyector y del detector fue de 300°C y la temperatura del horno programada de 200 a 270°C, con una velocidad de calentamiento de 15°C/min, tiempo inicial de 2 minutos y tiempo final de 25 minutos. Los datos se recogieron en un integrador LCI-100 (Perkin Elmer).

4.1.2.2. Furosina

Para la determinación de furosina en las muestras de fórmulas infantiles se siguió el método de Delgado y col. (1992). El procedimiento a seguir es el siguiente: a 0,5 ml de leche se añaden 3 ml de HCl 7N, resultando una normalidad de 6. Esta mezcla se hidroliza a 110°C durante 24 horas en tubos de hidrólisis cerrados a vacío. Los hidrolizados obtenidos se evaporan a sequedad en rotavapor a 40°C. El residuo se disuelve en 0,5 ml de agua y se filtra a través de una membrana Anotec (Whatman) de 0,2 µm. El filtrado se pasa a través de un cartucho Sep-Pack C₁₈ (Millipore) previamente acondicionado con metanol y agua. Una vez eluida la muestra, se pasa una mezcla agua/acetonitrilo/ácido fórmico (95/5/0,2) para eluir la furosina que pudiera quedar retenida hasta un volumen final de 5 ml.

El sistema cromatográfico consistió en una bomba modelo 510 (Waters Assoc.), un inyector Rheodyne modelo 7125 con un bucle de carga de 20 µl y un detector de longitud de onda variable SM 4000 (LDC Analytical), conectados a un sistema de tratamiento de datos System Gold 7.11 (Beckman). Se utilizó una columna Spherisorb ODS2 (Phenomenex) de 250 x 4,6 mm y 5 µm de tamaño de partícula. Los análisis se realizaron en condiciones isocráticas a temperatura ambiente y a una longitud de onda de detección de 280nm. Como fase móvil se utilizó una solución de heptasulfonato 5 mM, y ácido fórmico al 0,2%, en agua/acetonitrilo 80:20.

El análisis cuantitativo de la furosina se llevó a cabo por el método del patrón externo y la recta correspondiente se realizó con disoluciones de patrón preparadas en el laboratorio

mediante la adición de patrón puro de furosina a hidrolizados de leche cruda. La furosina patrón se obtuvo a partir de la hidrólisis del compuesto de Amadori ϵ -N-(1 Desoxi-D-fructosil)-L-lisina, sintetizada en el laboratorio según el método de Finot y col. (1968).

3.4.3. Ensayos de digestión *in vitro* de las fórmulas

Las fórmulas en polvo se reconstituyeron según las indicaciones de sus etiquetas, coincidiendo que en ambas fuera al 12,7%. Los demás pasos se siguieron de manera idéntica a como se ha descrito en el apartado 3.2.3..

Del estudio estadístico de los resultados de los experimentos I y II se desprendió que la hora no influía significativamente sobre la diálisis de los distintos elementos, por lo que se omitió tomar muestras tras 1, 2 y 3 horas de digestión intestinal, como alternativa se tomaron 3 muestras transcurridas 2 horas. Esta modificación también se realizó considerando la estandarización y normalización del método que se estaba llevando a cabo a través de la Acción Concertada nº 10 del proyecto europeo FLAIR.

3.4.4. Preparación de las dietas

Se liofilizaron las fórmulas líquidas. Posteriormente se prepararon cuatro dietas a partir de la mezcla de una dieta semisintética AIN-76, que sigue las recomendaciones del American Institute of Nutrition (1977) para la rata (tabla 4 y 5), y cada una de las fórmulas anteriormente indicadas en la proporción 60:40 (AIN 76: fórmula). Dicha proporción fue utilizada al objeto de obtener una composición teórica de macromutientes de 16% de proteína, 14% de grasa y 69% de hidratos de carbono.

Como dieta control se utilizó la dieta AIN modificada al objeto de igualar las composiciones nutritivas de las dietas experimentales. Ello se realizó modificando las cantidades de proteína, grasa, calcio y fósforo (tabla 6 y 7). En la tabla 8 se recoge la composición analítica de minerales y nitrógeno de las dietas.

Tabla 3. Análisis de la composición de minerales y nitrógeno de las fórmulas

Formula	Ca (mg/100ml)	Mg (mg/100ml)	P (mg/100ml)	HIERRO (μ g/100ml)	ZINC (μ g/100ml)	COBRE (μ g/100ml)	NITROGENO (mg/100ml)
A Polvo	4241.5 \pm 1.07	397.5 \pm 0.03	2582.1 \pm 0.12	35100 \pm 5.50	32500 \pm 4.51	4500 \pm 1.85	242.06 \pm 2.0
A Liq. esteril.	4214.38 \pm 0.43	413.18 \pm 0.07	2638.02 \pm 2.00	41710 \pm 3.33	31090 \pm 4.93	5110 \pm 2.76	232.79 \pm 2.6
B Polvo	3745 \pm 0.98	478 \pm 0.09	2810 \pm 1.01	57630 \pm 4.52	57750 \pm 5.15	8980 \pm 3.05	251.21 \pm 0.44
B Liq. UHT	3657 \pm 1.79	370 \pm 0.10	2930 \pm 1.36	54350 \pm 2.36	57580 \pm 7.3	10650 \pm 2.85	239.01 \pm 3.48

Valores medios \pm error estándar de 4 determinaciones.

Tabla 4. Componentes de la dieta AIN-76

Componente	g/kg
Caseína	200
DL-Metionina	3
Almidón de maiz	150
Sacarosa	500
Fibra	50
Aceite de maiz	50
Corrector mineral	35
Corrector vitamínico	10
Bitartrato de colina	2

Tabla 5. Composición del corrector mineral de la dieta AIN-76

Componentes	g/kg de mezcla
Fosfato cálcico, dibásico (CaHPO_4)	500.0
Cloruro sódico (NaCl)	74.0
Citrato potásico, monohidrato ($\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	220.0
Sulfato potásico (K_2SO_4)	52.0
Oxido de magnesio (MgO)	24.0
Carbonato de manganesio (43-48% Mn)	3.5
Citrato férrico (16-17% Fe)	6.0
Carbonato de zinc (70% ZnO)	1.6
Carbonato de cobre (53-55% Cu)	0.3
Iodato potásico (KIO_3)	0.01
Seleniato sodico ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.01
Sulfato potásico de cromo [$\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$]	0.55
Sacarosa, en polvo fino	hasta 1000.0

Esta composición está basada en los requerimientos NAS-NRC para la rata. Se debe de incluir en un 3.5% en la dieta.

Tabla 6. Componentes de la dieta control

Componente	g/kg
Caseina	180.4
Almidón de maiz	89.167
Sacarosa	500
Celulosa	30
Aceite de maiz	140
Corrector mineral	35
Corrector vitamínico 3000050	10
DL-metionina	3
Bitartrato de colina	2

Tabla 7. Composición del corrector mineral de la dieta control

Componente	g/kg de mezcla
Carbonato calcio anhidro*	357
Fosfato cálcico, mono hidrato*	339
Cloruro sódico	74
Sulfato potásico	52
Oxido de magnesio	24
Carbonato manganésico	3.5
Citrato férrico	6
Carbonato de zinc	1.6
Carbonato de cobre	0.3
Iodato potásico	0.01
Selenuro de sodio	0.01
Sulfato potásico de cromo* 12H ₂ O	0.55
Sacarosa, en polvo fino*	142.02

* Estos componentes han sido ajustados según este experimento

Tabla 8. Composición analítica de minerales y nitrógeno de las dietas

Dieta	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	P (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	N (g/kg)	Humedad (%)
AIN-76	4810.4±5.6	570.2±3.2	5300.3±42.6	54.40±6.35	50.85±1.56	10.65±0.23	27.53±0.14	3.62
Control	4756.0±9.2	471.0±2.8	4550.8±36.6	54.44±2.32	44.72±0.32	15.32±0.09	25.85±0.13	3.12
A polvo	4516.1±7.8	481.4±5.9	4241.3±41.9	47.63±1.17	41.83±0.38	9.49±0.18	25.61±0.12	3.42
A Liq. est.	4508.2±7.4	502.0±0.4 ^c	4227.5±11.5	46.70±0.46	41.55±0.12	8.79±0.12	25.65±0.11	3.30
B polvo	4384.3±6.6	533.3±2.4	4304.7±63.8	55.69±0.41	53.10±0.40	9.59±0.15	25.89±0.06	3.33
B Liq. UHT	4349.1±11.8	490.0±12.6	4352.0±71.3	54.37±0.88	53.03±1.03	10.25±0.20	25.69±0.17	3.55

Valores medios ± error estándar de 4 determinaciones.

3.4.5. Ensayos de balance en animales

Se realizaron ensayos biológicos de balances de los minerales calcio, magnesio, fósforo, hierro, cobre y zinc, y nitrógeno en ratas Wistar del criadero del Instituto de Nutrición (CSIC-UCM), Madrid, seleccionadas en el momento del destete, con un peso inicial de $40 \pm 0,3$ g (media \pm error estándar), procedentes del mismo cruce. Los animales se distribuyeron en grupos, constituidos por 12 animales, 6 machos y 6 hembras, según la dieta que consumieron *ad libitum*. Además del grupo control, cuya dieta contenía cantidades de nutrientes equivalentes a las de los grupos que tomaron las dietas que incluían cada una de las fórmulas infantiles, se realizó un ensayo con ratas alimentadas con la dieta AIN-76 (American Institute of Nutrition, 1997), a fin de comparar el estado nutritivo general y la utilización nutritiva de los minerales de ratas alimentadas con la dieta control y la dieta que contiene sus ingestas recomendadas. Todos bebieron agua desionizada *ad libitum*. Las condiciones del ensayo (temperatura, humedad, recogida de heces y orina, etc.) se han descrito ya en el apartado 3.2.4.

Los ensayos constaron de un período experimental de 11 días, los primeros 4 días fueron de adaptación y en los 7 siguientes se realizó un balance de minerales y nitrógeno.

La recogida de orina y heces durante el balance, el sacrificio de los animales y el tratamiento de las muestras se describieron en el apartado 3.2.4.

3.4.5.1. Parámetros controlados

- Peso de las ratas en los días 1, 5, 8 y 11.
- Ingesta sólida correspondiente al período de adaptación (día 1 al 4) y al período experimental (días 5 al 11).

- Eliminación fecal y urinaria de los minerales calcio, magnesio, fósforo, hierro, cobre y zinc así como de nitrógeno durante el período de balance: días 5 al 11.

- Composición corporal:

- Hígado: peso, hierro, zinc y cobre.
- Bazo: peso, hierro, zinc y cobre.
- Piel: hierro, zinc y cobre.
- Suero: calcio, magnesio, hierro, zinc y cobre.
- Hematíes: hierro, zinc y cobre.
- Rata entera: peso, calcio, magnesio, fósforo, hierro, zinc , cobre y nitrógeno.

3.4.5.2. Índices utilizados

Los descritos en el apartado 3.2.4.2. más los que figuran a continuación:

- Eficacia alimentaria:

$$EA = \frac{\text{Incremento de peso por día (g)}}{\text{Sustancia seca ingerida por día (g)}}$$

- Eficacia proteica:

$$EP = \frac{\text{Incremento de peso por día (g)}}{\text{Nitrógeno ingerido por día (g)}}$$

- Índice hepatosomático:

$$I. H. S. = \frac{\text{Peso del hígado (g)}}{\text{Peso de la rata (g)}}$$

3.4.5.3. Técnicas analíticas empleadas

En las dietas se efectuaron los análisis descritos en el apartado 3.2.4.3., el resto de las técnicas se encuentran en el apartado 3.3.4.3. más los indicados a continuación:

- Humedad, por pérdida de peso en estufa a 105°C hasta peso constante (A.O.A.C., 1980).
- Proteína, mediante la determinación de Nitrógeno total por el método Kjeldahl, utilizando un analizador Kjeltec modelo Auto 1030 y conversión a proteína multiplicando por el factor 6,38 (A.O.A.C., 1984).
- Cenizas por incineración a 450-500°C (A.O.A.C., 1975).

3.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Todos los datos de los tres experimentos fueron sometidos inicialmente a un test descriptivo para estudiar su distribución. Se observó que cada una de las variables en el conjunto de la muestra seguía una distribución *cuasi* normal, por lo que se aplicaron pruebas paramétricas.

Ensayos *in vitro*

Al sumar las fracciones del elemento dializado, no dializado soluble y precipitado no siempre se obtuvo el 100% de recuperación. Por ello se procedió a transformar los datos de dializado, no dializado soluble y precipitado dividiéndolos por la recuperación obtenida.

En los experimentos I y II se analizó la influencia del tipo de leche o fórmula, tratamiento térmico y la hora, mediante ANOVA de 3 vías a través del modelo:

$$X_{ij} = x + T_i + Tr_j + H_t + T_i * Tr_j + T_i * H_t + Tr_j * H_t + \epsilon_{ijt}, \text{ donde:}$$

x = media

T_i = tipo

Tr_j = tratamiento

H_t = hora

$T_i * Tr_j$ = interacción tipo*tratamiento

$T_i * H_t$ = interacción tipo*hora

$Tr_j * H_t$ = interacción tratamiento*hora

ϵ_{ijt} = error debido al azar

Para todos los minerales, excepto para el calcio, se obtuvo que la hora no ejercía una influencia significativa, por ello se aplicó un modelo general de ANOVA de 2 vías (tipo, tratamiento térmico) considerando en el caso del calcio la hora como covariable.

$$X_{ij} = x + T_i + Tr_j + T_i * Tr_j + \epsilon_{ijt}$$

En el experimento III se analizó la influencia del tipo de fórmula, mediante ANOVA de 1 vía.

$$X_j = x + Tr_j + \epsilon_{ijt}$$

Ensayos *in vivo*

En los experimentos I y II las heces y la orina se procesaron en "pooles". Se han replicado los datos en el pool asumiendo que conformaba una normal de media la conocida y desviación estándar la obtenida por el resultado del contenido corporal de cada mineral en

el día 22 comprobándose que la media de los datos obtenida por generación no diferían estadísticamente de lo original. Se ha realizado en el programa SAS con una rutina de generación aleatoria llamada RANNOR.

El análisis de los datos correspondientes a los experimentos *in vivo* I y II se efectuó mediante ANOVA de una vía (tratamiento) y dos vías (tratamiento y tipo de fórmula), respectivamente.

Para el análisis de los datos obtenidos en la experiencia III se ha empleado ANOVA de una vía (tipo de fórmula).

El nivel de significación se ha establecido en el 5% y todo el tratamiento estadístico se ha llevado a cabo en un ordenador ALPHA 2100, sistema VAX/VMS, versión V5.5-2, empleando los siguientes programas BMDP (Biomedical Statistical Package, 1992):

- BMDP 2D: discriminante
- BMDP 7D: ANOVA de 1 y 2 vías
- SAS procedimientos: PROC UNIVARIATE
 PROC MEANS
 PROC GLM

Discusión de Resultados

TAB 9. - INGESTA ALIMENTARIA (ml)

GRUPOS	DIAS 1-4	DIAS 4-7
Vaca sin calentar	63	60
Vaca baño M ^a	61	61
Vaca microondas	59	61

Valores medios de 12 animales

TAB 10. - INGESTA ALIMENTARIA (ml)

GRUPOS	DIAS 1-4	DIAS 4-7
F. Polvo sin calentar	41	41
F. Polvo baño M ^a	42	45
F. Polvo microondas	42	41
F. Líq. sin calentar	30	36
F. Líquida baño M ^a	35	34
F. Líq. microondas	31	32

Valores medios de 12 animales

Resultados

TABLA 11.- EVOLUCION PONDERAL (g)

GRUPOS	DIA 1	DIA 4	DIA 7
Vaca sin calentar	30.34±0.46	34.77±0.69	41.52±0.95
Vaca baño M ^a	30.17±0.37	36.02±0.41	40.98±0.66
Vaca microondas	30.10±0.47	34.52±0.69	41.08±1.00

Valores medios de 12 animales ± error estándar.

No aparecieron diferencias significativas (ANOVA de 1 vía).

TABLA 12.- EVOLUCION PONDERAL (g)

GRUPOS	DIA 1	DIA 4	DIA 7
F. Polvo sin calentar calen	30.14±0.41	28.61±0.38	29.5±0.34
F. Polvo baño M ^a	30.10±0.41	27.88±0.32	29.53±0.51
F. Polvo microondas	29.93±0.41	29.95±0.74	31.08±1.87
F. Líq. sin calentar	30.10±0.37	26.79±0.37	26.69±0.43
F. Liquida baño M ^a	30.14±0.41	27.04±0.36	27.72±0.48
F. Líq. microondas	30.13±0.40	27.19±0.40	27.07±0.47

Valores medios de 12 animales ± error estándar.

No aparecieron diferencias significativas entre grupos (ANOVA de dos vías).

TABLA 13.- INDICE HEPATOSOMÁTICO

GRUPOS	
F. Polvo sin calentar	0.037±0.001
F. Polvo baño M ^a	0.036±0.001
F. Polvo microondas	0.036±0.003
F. Líq. sin calentar	0.036±0.002
F. Líquida baño M ^a	0.035±0.001
F. Líq. microondas	0.034±0.001

Valores medios de 6 animales ± error estándar.
No aparecieron diferencias significativas (ANOVA de 2 vías).

TABLA 14.- INDICE HEPATOSOMÁTICO

GRUPOS	
Vaca sin calentar	0.031 ±0.002
Vaca baño M ^a	0.032 ±0.002
Vaca microondas	0.032 ±0.001

Valores medios de 6 animales ± error estándar.
No aparecieron diferencias significativas (ANOVA de 1 vía).

TABLA 15. CALCIO DIALIZADO (%)

Tipo	Sin calentar			Baño María			Microondas		
	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
Vaca entera	16.5±0.1*	15.4±0.3	15.6±1.0	17.0±0.1*†	13.6±0.1	15.8±0.1	15.2±0.4*	15.9±0.1	15.5±0.6
Vaca descrem.	29.9±0.8†	30.2±0.5*	30.3±2.1*	29.2±3.6†	29.4±2.2*	29.7±1.6*	29.9±2.5†	30.0±2.7*	30.4±1.7*
Fórmula polvo	15.1±6.5*	13.4±5.5	11.7±3.3	15.6±1.6*	16.1±0.0	15.7±0.1	14.8±1.1*	15.6±1.3	15.3±1.4
Fórmula líquida	18.8±0.6*†	14.8±0.5	15.7±0.1	17.9±1.3*†	17.7±0.1	17.4±1.2	21.9±1.1†	18.3±1.2	16.4±0.9
Tipo	p=0.000								
Tratamiento	N.S.								
Hora	N.S.								
Tipo x Trat.	N.S.								

Los valores expresan las medias ± desviación estándar. La hora fue analizada como covariable.

Los símbolos, dentro de una columna, indican diferencias significativas debidas al tipo (p<0.05).

Las letras, dentro del mismo tipo y hora, indican diferencias significativas debidas al calentamiento.

TABLA. 16 CALCIO NO DIALIZADO SOLUBLE (%)

Tipo	Sin calentar			Baño María			Microondas		
	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
Vaca entera	62.9±3.4†	64.2±2.4‡	63.2±0.8†	60.67±0.08‡†	64.02±0.77‡	62.48±0.23‡	65.55±0.60†	64.85±0.25†	66.12±1.97‡
Vaca descrem.	62.1±0.7†	62.9±0.6‡†	62.5±0.9†	61.74±1.81‡	62.18±0.42‡	61.66±0.04‡	61.69±1.33†	62.05±1.62†	62.21±1.67‡†
Fórmula polvo	38.6±4.8*	43.0±3.9*	45.2±5.5*	40.51±1.94*	44.06±0.00*	46.71±0.03*	49.99±1.32a*	51.89±1.00a*	51.46±3.87*
Fórmula líquida	50.9±1.7*†	50.3±3.0*†	51.6±1.3*†	52.92±3.01†	52.14±3.32†	51.60±2.48†	49.52±2.75*	52.76±2.03*	56.15±1.57*†

Tipo	p=0.0000								
Tratamiento	p=0.0000								
Hora	p=0.0008 +								
Tipo x Trat.	p=0.0000								

Los valores expresan las medias ± desviación estándar. La hora fue analizada como covariable.

Los símbolos, dentro de una columna, indican diferencias significativas debidas al tipo (p<0.05).

Las letras, dentro del mismo tipo y hora, indican diferencias significativas debidas al calentamiento.

TABLA 17. CALCIO NO DIALIZADO PRECIPITADO (%)

Tipo	Sin calentar			Baño María			Microondas		
	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
Vaca entera	20.5±3.3†	20.4±2.2†	21.1±1.7†	22.4±0.2†	22.4±0.1†	21.7±0.4†	19.2±0.3†	19.2±0.2†	18.4±1.5*†
Vaca descrem.	8.3±0.1*	6.8±0.2*	7.2±1.2*	9.0±1.8*	8.4±1.9*	8.6±1.6*	8.4±1.2*	7.9±1.4*	7.3±0.5*
Fórmula polvo	46.2±1.7†	43.6±1.6c†	43.0±2.2f	43.9±0.3†	39.8±0.0b£	37.6±0.1†	35.1±0.4a£	32.5±1.0a†	33.2±5.3†
Fórmula líquida	30.2±2.1†	34.8±2.5†	32.6±1.2†	29.1±4.3†	30.2±3.4†	30.9±3.7	28.6±3.8†	28.9±3.2†	27.4±0.6††
Tipo	p=0.0000								
Tratamiento	p=0.0000								
Hora	p=0.032 -								
Tipo x Trat.	p=0.0000								

Los valores expresan las medias ± desviación estándar. La hora fue analizada como covariable.

Los símbolos, dentro de una columna, indican diferencias significativas debidas al tipo ($p < 0.05$).

Las letras, dentro del mismo tipo y hora, indican diferencias significativas debidas al calentam

TABLA 18. BALANCE DE CALCIO

GRUPOS	INGERIDO ABSORBIDO RETENIDO			%A/I	% R/A	% R/I
	(mg/período)					
Leche de vaca						
Sin calentar	142.61±6.31	122.78±6.31	120.19±6.31	85.96±0.60 ^b	97.86±0.10 ^a	84.12±0.68 ^a
Baño María	149.07±7.23	134.69±7.23	132.36±7.23	90.24±0.44 ^a	98.24±0.08 ^b	88.66±0.51 ^b
Microondas	141.79±6.89	124.14±6.89	121.27±6.89	87.39±0.67 ^b	97.64±0.14 ^a	85.34±0.77 ^a
ANOVA 1 vía						
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0004	p=0.0077	p=0.0007

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas, dentro de un mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento (p<0.05).

TABLA 19. BALANCE DE CALCIO

GRUPOS	INGERIDO	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(mg/periodo)					
Fórmula en polvo						
Sin calentar	45.45±0.86	44.25±0.86	43.45±0.86	97.35±0.04	98.17±0.03 ^b	95.58±0.07
Baño María	46.07±3.56	45.03±3.46	44.55±3.56	97.68±0.16	98.90±0.08 ^a	96.61±0.24
Microondas	46.75±4.28	45.52±4.28	44.81±4.28	97.22±0.28	98.34±0.17 ^b	95.64±0.44
Fórmula líquida						
Sin calentar	34.76±1.67	34.34±1.67	31.66±1.67	98.78±0.05 ^{b*}	92.10±0.36 ^{b*}	90.98±0.40 ^{b*}
Baño María	33.04±2.29	32.71±2.29	29.22±2.29	98.94±0.08 ^{b*}	89.03±0.87 ^a	88.10±0.93 ^{a*}
Microondas	36.83±2.44	35.93±2.44	33.46±2.44	97.5±0.15 ^a	92.96±0.45 ^{b*}	90.65±0.58 ^{ab*}
ANOVA 2 vías						
Tipo	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0001
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0001	p=0.0017	N.S.
Tipo x Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.002	p=0.0001	p=0.0013

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas, dentro de un mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento (p<0.05).

En los casos en que la interacción tipo x tratamiento es significativa * indica diferencias significativas, para el mismo tratamiento, debidas al tipo (p<0.05).

TABLA 20. IN VITRO P (%)

Tipo	DIALIZADO			N.D.S.			PRECIPITADO		
	N.C.	B.M*	MO.	N.C.	B.M*	MO.	N.C.	B.M*	MO.
Vaca entera	32±0.4a*	36.6±0.3b†	35.1±0.7b†	63.7±0.6c	58.9±0.3a*	60.9±0.5b*	4.2±0.4†	4.5±0.1†	4.0±0.3†
Vaca descrem.	42.4±0.2b*	29.6±0.2a*	31.6±0.4b*	64.1±0.3a	67.9±0.3c†	66.0±0.4b†	3.4±0.3a†	2.5±0.1*	2.4±0.1†*
Fórmula polvo	31.9±0.5*	32.4±0.5†	32.1±0.4*†	65.0±0.6	64.5±0.7†	65±0.4,†	3.1±0.2†	3.1±0.2*	2.9±0.1†
Fórmula líquida	34.5±0.3ab†	35.5±0.6b†	34.0±0.2a†	63.0±0.4b	60.8±0.6a*	63.9±0.1b†	2.5±0.2b	3.7±0.3a†*	2.1±0.2b*
<hr/>									
Tipo	p=0.000			p=0.000			p=0.000		
Tratamiento	N.S.			p=0.012			p=0.001		
Tipo x Trat.	p=0.000			p=0.000			p=0.001		

Los valores expresan las medias ± desviación estándar. La hora fue analizada como covariable.

Los símbolos, dentro de una columna, indican diferencias significativas debidas al tipo ($p < 0.05$).

Las letras, dentro del mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento.

TABLA 21.- BALANCE DE FOSFORO

GRUPOS	INGERIDO	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(mg/periodo)					
Leche de vaca						
Sin calentar	145.62±5.18	140.9±5.18	110.18±5.18	96.73±0.12 ^a	78.02±0.88 ^a	75.48±0.95 ^a
Baño María	149.23±1.85	146.06±1.85	119.48±1.85	97.87±0.02 ^b	81.78±0.22 ^b	80.05±0.24 ^b
Microondas	150.24±5.33	146.64±5.33	117.03±5.33	97.58±0.08 ^b	79.77±0.73 ^{ab}	77.75±0.78 ^a
ANOVA 1 vía						
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0001	p=0.0052	p=0.0020

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas, dentro de un mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento (p<0.05).

TABLA 22.- BALANCE DE FOSFORO

GRUPOS	INGERIDO	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(mg/periodo)					
Fórmula en polvo						
Sin calentar	26.52±0.66	26.04±0.66	23.08±0.66	98.18±0.04 ^b	88.59±0.28 ^b	86.98±0.31 ^b
Baño María	28.84±2.02	27.45±2.02	26.46±2.02	95.08±0.33 ^a	85.42±1.05 ^a	81.24±1.28 ^a
Microondas	26.43±6.88	25.55±2.88	21.72±2.88	96.39±0.55 ^a	83.56±2.66 ^a	80.62±2.98 ^a
Fórmula líquida						
Sin calentar	25.44±2.42	24.42±2.42	21.54±2.42	95.80±0.38 ^{b*}	87.61±1.21 ^b	83.96±1.49 ^b
Baño María	22.92±0.37	21.94±0.37	18.33±0.37	95.75±0.06 ^b	83.52±0.27 ^a	79.87±0.31 ^a
Microondas	22.42±1.04	21.14±1.04	17.87±1.04	94.14±0.25 ^{a*}	84.39±0.71 ^a	79.46±0.89 ^a
ANOVA 2 vías						
Tipo	p=0.0199	p=0.0149	p=0.0242	p=0.0001	N.S.	N.S.
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0001	p=0.0069	p=0.0019
Tipo x Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0001	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas, dentro de un mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento (p<0.05).

En los casos en que la interacción tipo x tratamiento es significativa * indica diferencias significativas, para el mismo tratamiento, debidas al tipo. (p<0.05).

TABLA 23. IN VITRO MG (%)

Tipo	DIALIZADO			N.D.S.			PRECIPITADO		
	N.C.	B.M.	MO.	N.C.	B.M.	M.O.	N.C.	B.M.	M.O.
Vaca entera	33.3±0.6 *†	34.0±0.3†	32.7±0.6	60.3±0.9*	59.2±0.3*	60.9±0.8 *	6.4±0.3‡	6.8±0.2‡	6.4±0.3‡
Vaca descrem.	31.9±0.6 *	31.6±0.4a*	32.2±0.4	65.1±0.5†	66.3±0.4‡	65.3±0.4‡	3.0±0.3b*	2.1±0.1a*	2.6±0.1ab*
Fórmula polvo	34.6±0.5* †	33.9±0.7†	31.3±0.4a	59.3±1.0	59.6±0.7 *	62.9±0.4a *	6.1±0.2‡†	6.4±0.2‡	5.8±0.3‡
Fórmula líquida	35.1±1b†	33.3±0.8ab*†	31.4±0.4a	59.6±1a*	62.2±0.8ab†	64.4±0.4b†	5.3±0.2a†	4.6±0.3†	4.2±0.1†
Tipo	p=0.016			p=0.000			p=0.000		
Tratamiento	p=0.000			p=0.000			p=0.034		
Tipo x Trat.	p=0.011			p=0.002			p=0.042		

Los valores expresan las medias ± desviación estándar. La hora fue analizada como covariable.

Los símbolos, dentro de una columna, indican diferencias significativas debidas al tipo ($p < 0.05$).

Las letras, dentro del mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento.

TABLA 24. BALANCE DE MAGNESIO

GRUPOS	INGERIDO	ABSORBIDO	RETENIDO	%A/I	% R/A	% R/I
	(mg/periodo)					
Leche de vaca						
Sin calentar	12.13±0.55	9.97±0.55	5.68±0.55	82.02±0.89 ^a	56.25±2.72	46.25±2.68
Baño María	12.91±0.51	11.25±0.51	6.57±0.51	87.03±0.53 ^b	57.95±1.95	50.49±1.95
Microondas	12.45±0.24	10.83±0.24	5.76±0.24	87.01±0.24 ^b	53.05±1.02	56.17±1.03
ANOVA 1 vía						
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0001	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas, dentro de un mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento (p<0.05).

TABLA 25. BALANCE DE MAGNESIO

GRUPOS	INGERIDO	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(mg/periodo)					
Fórmula en polvo						
Sin calentar	4.13±0.03	3.99±0.03 ^b	1.51±0.03 ^b	96.73±0.02 ^c	37.9±0.57 ^b	36.66±0.61 ^b
Baño María	4.28±0.06	3.55±0.06 ^a	1.18±0.06 ^{ab}	82.91±0.23 ^a	33.29±0.96 ^{ab}	27.61±1.01 ^a
Microondas	4.24±0.16	3.94±0.16 ^{ab}	1.06±0.16 ^a	92.87±0.24 ^b	26.35±3.01 ^a	24.51±2.86 ^a
Fórmula líquida						
Sin calentar	3.61±0.13	3.38±0.13 ^{b*}	1.50±0.13 ^b	93.47±0.26 ^b	44.04±2.46 ^{a*}	41.2±2.41 ^b
Baño María	3.66±0.08	3.48±0.08 ^b	0.71±0.08 ^a	94.99±0.12 ^{c*}	20.27±2.11 ^{b*}	19.27±2.03 ^{a*}
Microondas	3.37±0.10	2.92±0.10 ^{a*}	0.71±0.10 ^a	86.42±0.42 ^{a*}	23.85±2.80 ^{b*}	20.68±2.52 ^a
ANOVA 2 vías						
Tipo	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0045	p=0.0008	N.S.	N.S.
Tratamiento	N.S.	N.S.	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0001
Tipo x Tratamiento	N.S.	p=0.0007	N.S.	p=0.0001	p=0.0006	p=0.0140

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas, dentro de un mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento ($p < 0.05$).

En los casos en que la interacción tipo x tratamiento es significativa * indica diferencias significativas, para el mismo tratamiento, debidas al tipo. ($p < 0.05$).

TABLA 26. CONTENIDO Y CONCENTRACIÓN DE Ca, P, Mg y N CORPORAL TOTAL

GRUPOS	PESO	Ca		P		Mg		N	
	(g)	(mg)	(mg/g)	(mg)	(mg/g)	(mg)	(mg/g)	(g)	(g/g)
Leche de vaca									
Sin calentar	39.35± 1.15	271.82± 5.61	6.92±0.13	210.58±5.92	5.35±0.13	11.62±0.35	0.29± 0.0	1.0±0.02 ^a	0.03±0.03 ^b
Baño María	41.59± 0.57	273.00± 6.80	6.56± 0.16	225.79± 2.81	5.43±0.04	11.84±0.36	0.28 ± 0.0	1,1±0.02 ^b	0.03±0.03 ^b
Microondas	39.14± 0.96	271.23± 6.92	6.93±0.09	209.87±4.35	5.37± 0.12	11.53±0.24	0.29± 0.0	1,1±0.02 ^b	0.03±0.05 ^a
Tipo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.009	p=0.002

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas indican diferencias significativas debidas al calentamiento por ANOVA 1 vía (p<0.05).

TABLA 27. CONTENIDO Y CONCENTRACIÓN DE Ca, P, Mg y N CORPORAL TOTAL

GRUPOS	PESO	Ca		P		Mg		N	
	(g)	(mg)	(mg/g)	(mg)	(mg/g)	(mg)	(mg/g)	(mg)	(mg/g)
Fórmula en polvo									
Sin calentar	29.37±0.31	178.7±2.4	6.03±0.09ab	147.6±12.34	4.98±0.09	7.76±0.09	0.26±0.0	858.53±15.88	28.72±0.51b
Baño María	29.55±0.54	192.7±6.3	6.52±0.13b	158.31±4.88	5.35±0.08	7.81±0.23	0.26±0.0	799.67±24.47	27.05±0.5b
Microondas	31.85±1.46	189.3±6.4	5.97±0.17a	158.90±7.43	4.99±0.10	7.99±0.31	0.25±0.0	782.71±27.93	24.64±0.4a
Fórmula líquida									
Sin calentar	26.50±0.56*	188.2±4.2	7.11±0.19*	152.95±5.00	5.78±0.19b*	7.11±0.21*	0.26±0.0	758.49±23.62	28.61±0.5656*
Baño María	27.83±0.72	189.7±5.4	6.82±0.14	145.73±0.73	5.25±0.12a	7.12±0.17*	0.26±0.0*	738.61±13.89	26.58±0.41*
Microondas	26.83±0.49*	188.7±4.7	7.04±0.22*	149.50±2.57	5.57±0.06ab*	6.93±0.21*	0.26±0.0	759.15±21.68	28.30±0.77*
Tipo	p=0.000	N.S.	p=0.000	N.S.	p=0.000	p=0.000	N.S.	p=0.004	p=0.0438
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.000
Tipo x Tratami	p=0.003	N.S.	p=0.044	N.S.	p=0.000	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.000

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas indican diferencias significativas debidas al calentamiento por ANOVA 1 vía (p<0.05).

* Diferencias significativas entre tipos dentro del mismo tratamiento por ANOVA 1 vía (p<0.05)

TABLA 28. IN VITRO FE (%)

Tipo	DIALIZADO			N.D.S.			PRECIPITADO		
	S.C.	B.M ^a	MO.	S.C.	B.M ^a	MO.	S.C.	B.M ^a	MO.
Vaca descrem.	35.0±1.5b‡	40.4±1a‡	32.8±0.9b*	41.0±1.7*	40.5±1.2*	40.1±1.9*	24.1±0.6b*	19.1±0.8a*	27.1±1.7b*
Fórmula polvo	21.5±0.5b*	22.1±0.5b*	24.5±0.5a	69.5±0.8b‡	67.2±0.5ab‡	64.9±0.9a	9.0±0.6	10.7±0.5	10.6±0.7
Fórmula líquida	26.9±0.9‡	26.9±0.4‡	25.4±0.2	62.7±0.7‡	62.4±0.5‡	66.0±0.7	10.4±0.5ab	10.7±0.2b	8.7±0.7a
Tipo		p=0.000			p=0.000			p=0.000	
Tratamiento		p=0.001			N.S.			p=0.027	
Tipo x Tratamiento		p=0.000			p=0.000			p=0.000	

Los valores expresan las medias ± desviación estándar. La hora fue analizada como covariable.

Los símbolos, dentro de una columna, indican diferencias significativas debidas al tipo (p<0.05).

Las letras, dentro del mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento.

TABLA 29.- BALANCE DE HIERRO

GRUPOS	INGERIDO ABSORBIDO RETENIDO			% A/I	% R/A	% R/I
	(µg/periodo)					
Fórmula en polvo						
Sin calentar	376.39±17.32	353.86±17.32	345.35±17.32	93.94±0.28 ^a	97.56±0.12 ^b	91.66±0.39 ^a
Baño María	407.16±15.20	356.8±15.20	347.94±15.20	87.54±0.44 ^b	97.49±0.09 ^b	85.35±0.52 ^b
Microondas	355.59±19.53	317.82±19.53	307.36±19.53	89.21±0.58 ^b	96.64±0.21 ^a	86.23±0.75 ^b
Fórmula líquida						
Sin calentar	342.46±17.67	285.52±17.67	273.77±17.77	83.12±0.81 ^b	95.79±0.29 ^{c*}	79.64±1.16 ^{b*}
Baño María	335.12±13.41	302.81±13.41	280.87±13.41	90.27±0.44 ^{a*}	92.66±0.38 ^{a*}	83.66±0.75 ^{a*}
Microondas	359.87±13.17	294.71±13.17	278.46±13.17	81.76±0.69 ^{b*}	94.42±0.26 ^{b*}	77.22±0.85 ^{b*}
ANOVA 2 vías						
Tipo	p=0.0158	p=0.0010	p=0.0002	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0001
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0001
Tipo x Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0001

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas, dentro de un mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento (p<0.05).

En los casos en que la interacción tipo x tratamiento es significativa * indica diferencias significativas, para el mismo tratamiento, debidas al tipo. (p<0.05).

TABLA 30. IN VITRO ZN (%)

Tipo	DIALIZADO			N.D.S.			PRECIPITADO		
	S.C.	B.M ^a	MO.	S.C.	B.M ^a	MO.	S.C.	B.M ^a	MO.
Vaca entera	23.6±0.5	20.9±0.7†	19.3±1.5b	65.6±0.5*	65.4±0.4†	65.4±2.1*	10.8±0.5a*†	13.7±0.8ab†	15.3±1.2b*
Vaca descrem.	17.8±0.4a*	13.8±0.4a*	12.7±0.4a*	74.3±0.8a†	76.1±0.3ab‡	77.3±0.7b†	7.9±0.4a*	10.1±0.1b*	10.0±0.6b*
Fórmula polvo	20.5±1†	24.5±0.7a‡	19.9±0.2a†	66.6±1.6b*	62.9±0.6a*	70.1±0.5c†	12.8±1.3b†	12.7±0.5b†	10.0±0.5a*
Fórmula liq.	17.6±0.5a*	22.5±0.6a†‡	22.8±0.4b†	73.7±0.4c†	65.7±0.6a†	67.6±0.3b†	8.7±0.4a*	11.8±0.2c*†	9.6±0.3b*
Tipo	p=0.0000			p=0.0000			p=0.0010		
Tratamiento	p=0.0090			p=0.0000			p=0.0020		
Tipo x Tratam.	p=0.0000			p=0.0000			p=0.0010		

Los valores expresan las medias ± desviación estándar. La hora fue analizada como covariable.

Los símbolos, dentro de una columna, indican diferencias significativas debidas al tipo (p<0.05).

Las letras, dentro del mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento.

TABLA 31.- BALANCE DE ZINC

GRUPOS	INGERIDO	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(µg/periodo)					
Leche de vaca						
Sin calentar	521.06±7.53	397.7±7.53	363.65±7.53	76.22±0.53 ^a	91.42±1.60 ^b	69.68±0.41 ^a
Baño María	487.62±37.82	346.07±37.82	304.45±37.82	70.06±2.34 ^b	87.19±1.44 ^a	61.26±3.03 ^b
Microondas	511.40±6.99	348.47±6.99	310.97±6.99	68.11±0.43 ^b	89.21±0.21 ^{ab}	60.77±0.53 ^b
ANOVA 1 vía						
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0025	p=0.0108	p=0.049

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas, dentro de un mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento (p<0.05).

TABLA 32.- BALANCE DE ZINC

GRUPOS	INGERIDO	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(µg/periodo)					
Fórmula en polvo						
Sin calentar	324.18±15.47 ^b	258.26±15.47	230.45±15.47	79.44±0.92 ^b	89.2±0.57 ^b	70.89±1.30 ^a
Baño María	402.40±17.79 ^a	267.44±17.79	244.59±17.79	66.11±1.55 ^a	91.24±0.61 ^b	60.38±1.79 ^b
Microondas	338.12±9.16 ^b	255.03±9.16	214.95±9.16	75.33±0.65 ^b	84.18±0.53 ^a	63.43±0.98 ^b
Fórmula líquida						
Sin calentar	264.71±25.81	174.35±25.81 ^{ab}	154.43±25.81 ^{ab}	63.99±3.83 ^{b*}	86.89±2.28 ^b	56.05±4.72 ^{b*}
Baño María	278.49±14.71	206.70±14.73 ^b	174.20±14.71 ^b	73.85±1.34 ^{b*}	83.86±1.14 ^{ab}	62.02±2.00 ^b
Microondas	244.02±14.23	125.22±14.23 ^a	99.15±14.23 ^a	50.49±2.00 ^{a*}	78.21±2.04 ^a	39.75±3.00 ^{a*}
ANOVA 2 vías						
Tipo	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0001
Tratamiento	p=0.0108	p=0.0321	p=0.0137	p=0.0006	p=0.0001	p=0.0002
Tipo x Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0001	N.S.	p=0.0002

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas, dentro de un mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento (p<0.05).

En los casos en que la interacción tipo x tratamiento es significativa * indica diferencias significativas, para el mismo tratamiento, debidas al tipo. (p<0.05).

TABLA 33.- BALANCE DE COBRE

GRUPOS	INGERIDO ABSORBIDO		% A/I
	(µg/periodo)		
Leche de vaca			
Sin calentar	190.78±4.58	61.53±4.58 ^a	32.05±1.64 ^a
Baño María	175.87±6.16	80.72±6.16 ^{ab}	45.52±2.14 ^b
Microondas	179.00±4.31	81.84±4.30 ^b	45.46±1.30 ^b
ANOVA 1 vía			
Tratamiento	N.S.	p=0.0213	p=0.0001

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas, dentro de un mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento (p<0.05).

TABLA 34.- BALANCE DE COBRE

GRUPOS	INGERIDO ABSORBIDO		% A/I
	(µg/periodo)		
Fórmula en polvo			
Sin calentar	138.38±9.90 ^a	90.02±9.90 ^b	64.11±2.65 ^c
Baño María	168.63±2.73 ^b	65.99±2.73 ^a	39.04±1.02 ^a
Microondas	174.06±2.69 ^b	96.88±2.69 ^b	55.61±0.66 ^b
Fórmula líquida			
Sin calentar	145.45±7.79	93.91±7.79	64.07±1.83 ^b
Baño María	129.38±5.47 [*]	86.87±5.47 [*]	66.85±1.39 ^{b*}
Microondas	149.66±2.64 [*]	85.46±2.64 [*]	57.03±0.76 ^a
ANOVA 2 vías			
Tipo	p=0.0005	N.S.	p=0.0001
Tratamiento	p=0.0073	p=0.0217	p=0.0001
Tipo x Tratamiento	p=0.0017	p=0.036	p=0.0001

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas, dentro de un mismo tipo, indican diferencias significativas debidas al calentamiento (p<0.05). En los casos en que la interacción tipo x tratamiento es significativa * indica diferencias significativas, para el mismo tratamiento, debidas al tipo. (p<0.05).

TABLA 35. CONTENIDO Y CONCENTRACIÓN DE Fe, Zn y Cu CORPORAL TOTAL

GRUPOS	PESO	Fe		Zn		Cu	
	(g)	(µg)	(µg/g)	(µg)	(µg/g)	(µg)	(µg/g)
Leche de vaca							
Sin calentar	39.35±1.15	608.27± 23.36b	15.45±0.34b	1002.08±27.50a	25.47± 0.30a	84.16±4.98	2.13± 0.09
Baño María	41.59±0.57	548.60±14.71ab	13.19±0.31a	1224.34±34.06b	29.43 ±0.68b	90.00±7.65	2.15±0.16
Microondas	39.14±0.96	536.09±13.32a	13.69±0.12a	984.10±17.49a	25.16± 0.27a	96.97±5.63	2.49±0.18
Tipo	N.S.	p= 0.025	p=0.000	p=0.000	p=0.000	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas indican diferencias significativas debidas al calentamiento por ANOVA 1 vía (p<0.05).

TABLA 36. CONTENIDO Y CONCENTRACIÓN DE Fe, Zn y Cu CORPORAL TOTAL

GRUPOS	PESO	Fe		Zn		Cu	
	(g)	(µg)	(µg/g)	(µg)	(µg/g)	(µg)	(µg/g)
Fórmula en polvo							
Sin calentar	29.37±0.31	672.00±23.72	22.66± 0.65	985.50±17.45	33.26±0.63	121.50±5.95	4.10± 0.21
Baño María	29.55±0.55	597.85±21.02	20.24±0.70	970.00± 43.23	32.80 ±1.18	105.83± 6.57	3.59± 0.24
Microondas	31.85±1.46	628.54±18.19	19.89±0.91	970.43±46.79	30.51 ± 0.82	120.45± 11.37	3.78± 0.29
Fórmula líquida							
Sin calentar	26.50± 0.56*	578.72±15.54*	21.86±0.62	921.96± 37.75	34.75±0.987	99.88 ± 8.00*	3.74 ±0.23
Baño María	27.83±0.72	620.83±19.25	22.69±0.86	876.66±24.17	31.53±0.72	90.83±5.31	3.27±0.20
Microondas	26.83±0.49*	593.41±1 8.17	22.11±0.58	900.00±30.87	33.57±1.20	96.66± 9.90	3.61± 0.37
Tipo	p=0.0030	p=0.0337	N.S.	p=0.0151	N.S.	p= 0.006	N.S.
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Tipo x Tratamiento	p=0.0030	p=0.0204	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

Letras distintas indican diferencias significativas debidas al calentamiento por ANOVA 1 vía (p<0.05)

* Diferencias significativas entre tipos dentro del mismo tratamiento por ANOVA 1 vía (p<0.05)

TABLA 37.- CONTENIDO Y CONCENTRACION DE HIERRO EN HÍGADO, BAZO, PIEL Y HEMATÍES

GRUPOS	HIGADO			BAZO			PIEL	HEMATIES
	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)
Leche de vaca								
No calentada	1.29 \pm 0.10	44.08 \pm 1.69	35.06 \pm 3.1	0.17 \pm 0.01	12.43 \pm 0.99	110.46 \pm 8.54	9.0 \pm 1.0	732.13 \pm 31.95
Baño María	1.36 \pm 0.10	44.54 \pm 5.1	32.99 \pm 2.17	0.15 \pm 0.03	17.23 \pm 2.53	120.84 \pm 7.12	7.38 \pm 0.31	734.71 \pm 20.37
Microondas	1.31 \pm 0.06	40.67 \pm 2.85	31.17 \pm 2.06	0.11 \pm 0.01	13.32 \pm 0.57	127.88 \pm 17.38	8.97 \pm 1.31	760.94 \pm 39.15
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales \pm error estándar.

No aparecieron diferencias significativas debidas al calentamiento por ANOVA 1 via ($p < 0.05$).

TABLA 38.- CONTENIDO Y CONCENTRACION DE HIERRO EN HÍGADO, BAZO, PIEL Y HEMATÍES

GRUPOS	HIGADO			BAZO			PIEL	HEMATIES
	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)
Fórmula en polvo								
No calentada	1.11 \pm 0.037	48.29 \pm 6.51	43.04 \pm 5.25	0.09 \pm 0.00	17.6 \pm 1.59	211.3 \pm 30.3	10.58 \pm 0.16	743.9 \pm 68.1
Baño María	1.07 \pm 0.05	49.79 \pm 7.06	45.50 \pm 4.34	0.09 \pm 0.00	17.88 \pm 2.66	208.0 \pm 32.6	13.79 \pm 1.42	761.3 \pm 17.2
Microondas	1.09 \pm 0.05	57.95 \pm 5.80	53.42 \pm 5.26	0.09 \pm 0.00	16.58 \pm 2.74	193.19 \pm 31.1	10.71 \pm 0.7	782.2 \pm 46.2

Fórmula líquida								
No calentada	0.98 \pm 0.03	53.33 \pm 3.02	55.14 \pm 4.45	0.08 \pm 0.00	17.16 \pm 1.93	214.4 \pm 27.5	13.46 \pm 1.139	804.80 \pm 32.0
Baño María	0.95 \pm 0.04	51.79 \pm 6.1	54.67 \pm 5.16	0.09 \pm 0.02	20.00 \pm 2.42	222.1 \pm 14.87	14.58 \pm 0.971	925.78 \pm 52.29
Microondas	0.92 \pm 0.02	59.75 \pm 3.28	64.83 \pm 3.87	0.08 \pm 0.00	21.80 \pm 1.71	269.8 \pm 15.7	12.26 \pm 1.95	746.22 \pm 54.45
Tipo	N.S.	N.S.	0.009	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Tipo x Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales \pm error estándar

* Diferencias entre tipos dentro del mismo calentamiento por ANOVA 1 vía ($p < 0.05$).

TABLA 39.- CONTENIDO Y CONCENTRACION DE ZINC EN HÍGADO, BAZO, PIEL Y HEMATÍES

GRUPOS	HIGADO			BAZO			PIEL	HEMATIES
	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)
Leche de vaca								
No calentada	1.29 \pm 0.10	60.25 \pm 3.76	47.70 \pm 4.29	0.17 \pm 0.01	22.00 \pm 1.22	200.84 \pm 24.56	42.93 \pm 1.27	13.55 \pm 2.13
Baño María	1.36 \pm 0.10	71.87 \pm 3.47	55.73 \pm 5.56	0.15 \pm 0.03	20.48 \pm 1.70	155.82 \pm 23.03	46.81 \pm 2.02	11.7 \pm 2.33
Microondas	1.31 \pm 0.06	64.46 \pm 3.16	49.44 \pm 2.09	0.11 \pm 0.01	26.33 \pm 1.84	247.56 \pm 30.25	49.50 \pm 2.97	13.46 \pm 1.01
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales \pm error estándar.

No aparecieron diferencias significativas debidas al calentamiento ($p < 0.05$) ANOVA 1 vía.

TABLA 40.- CONTENIDO Y CONCENTRACION DE ZINC EN HÍGADO, BAZO, PIEL Y HEMATÍES

GRUPOS	HIGADO			BAZO			PIEL	HEMATIES
	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)
Fórmula en polvo								
No calentada	1.11±0.037	78.04±5.86	70.03±4.46	0.09±0.00	25.06±1.08	295.62±28.84	65.65±3.01	15.28±3.27
Baño María	1.07±0.05	70.12±3.61	66.41±5.33	0.09±0.00	21.65±2.56	245.40±17.21	57.16±2.76	10.39±1.00
Microondas	1.09±0.05	80.37±4.97	74.82±6.56	0.09±0.00	22.73±1.06	269.42±25.45	56.18±1.77	15.78±2.88
Fórmula líquida								
No calentada	0.98±0.03	60.25±2.79	61.67±2.58	0.08±0.00	18.68±2.28 ^{a*}	229.31±24.42 ^{b*}	73.30±4.13	13.59±0.56
Baño María	0.95±0.04	62.0±4.39	65.29±2.77	0.09±0.02	24.45±1.03 ^{b**}	289.19±35.04 ^{b*}	65.12±1.9	13.20±0.40
Microondas	0.92±0.02	66.79±3.0	72.23±2.52	0.08±0.00	31.15±1.44 ^{c*}	393.52±34.31 ^{a*}	63.38±9.69	14.19±1.53
Tipo	N.S.	p=0.001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.022	p=0.036	N.S.	N.S.
Tipo x	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.001	p=0.008	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales \pm error estándar

Letras distintas indican diferencias significativas debido al calentamiento dentro del mismo tipo de leche ($p < 0.05$) ANOVA 1 vía.

* Diferencias significativas entre tipos dentro del mismo tratamiento ($p < 0.05$) ANOVA 1 vía.

TABLA 41.- CONTENIDO Y CONCENTRACION DE COBRE EN HÍGADO, BAZO, PIEL Y HEMATÍES

GRUPOS	HIGADO			PIEL	HEMATÍES
	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)
Leche de vaca					
No calentada	1.29 \pm 0.10	26.87 \pm 4.18	22.06 \pm 4.49	4.54 \pm 0.07	6.32 \pm 1.08
Baño María	1.36 \pm 0.10	26.37 \pm 7.22	18.79 \pm 3.50	4.66 \pm 0.12	9.52 \pm 2.27
Microondas	1.31 \pm 0.06	24.54 \pm 3.28	18.67 \pm 2.20	4.6 \pm 0.24	9.88 \pm 1.53
Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales \pm error estándar.

No aparecieron diferencias significativas debidas al calentamiento ($p < 0.05$) ANOVA 1 via.

TABLA 42.-CONTENIDO Y CONCENTRACIÓN DE COBRE EN HÍGADO, PIEL Y HEMATÍES

GRUPOS	HIGADO			PIEL	HEMATÍES
	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)
Fórmula en polvo					
No calentada	1.11 \pm 0.037	20.04 \pm 3.19	18.0 \pm 2.97	6.94 \pm 0.54	19.40 \pm 11.18
Baño María	1.07 \pm 0.05	22.83 \pm 3.51	21.6 \pm 3.48	6.42 \pm 0.36	9.95 \pm 2.55
Microondas	1.09 \pm 0.05	18.75 \pm 2.47	17.59 \pm 2.74	6.19 \pm 0.30	13.16 \pm 5.23

Fórmula líquida					
No calentada	0.98 \pm 0.03	16.70 \pm 1.50	17.07 \pm 1.37 ^{a*}	6.52 \pm 0.27	13.89 \pm 0.78
Baño María	0.95 \pm 0.04	28.39 \pm 3.84	29.32 \pm 2.93 ^{b*}	6.99 \pm 0.32	21.53 \pm 2.53
Microondas	0.92 \pm 0.02	27.87 \pm 3.56	30.07 \pm 3.83 ^{b*}	5.70 \pm 0.88	17.36 \pm 5.04
Tipo	N.S.	N.S.	p=0.013	N.S.	N.S.
Tratamiento	N.S.	N.S.	p=0.031	N.S.	N.S.
Tipo x Tratamiento	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales \pm error estándar

Letras distintas indican diferencias significativas debido al calentamiento, dentro del mismo tipo de leche ($p < 0.05$) ANOVA 1 vía..

* Diferencias significativas entre tipos dentro del mismo tratamiento ($p < 0.05$) ANOVA 1 vía.

TABLA 43.- VALORES DE HEMATOCRITO Y HEMOGLOBINA

GRUPOS	Hc (mg/ml)	Hb (g/100 ml)
Leche de vaca		
No calentada	22.85±0.99	5.05±0.49
Baño María	29.43±2.87	6.29±0.38
Microondas	23.81±1.74	5.57±0.46
Tratamiento	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales \pm error estándar.

No aparecieron diferencias significativas debidas al calentamiento por ANOVA de 1 vía ($p < 0.05$).

TABLA 44.- VALORES DE HEMATOCRITO Y HEMOGLOBINA

GRUPOS	Hc (mg/ml)	Hb (g/100 ml)
Fórmula en polvo		
No calentada	40.13±2.46	10.03±0.24
Baño María	44.15±1.24	10.70±0.21
Microondas	43.28±0.61	9.92±0.22
Fórmula líquida		
No calentada	44.25±1.32	11.03±0.24
Baño María	41.53±0.83	10.23±0.84
Microondas	44.0±1.33	9.39±0.59
Tipo	N.S.	N.S.
Tratamiento	N.S.	N.S.
Tipo x Tratamiento	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

No aparecieron diferencias significativas por ANOVA de 2 vías (tipo de fórmula, calentamiento).

Resultados

**TABLA 45. CONTENIDO DE LACTULOSA Y FUROSINA Y
LA RELACIÓN LACTULOSA/FUROSINA**

Fórmula	Lactulosa (mg L ⁻¹)	Furosina (mg L ⁻¹)	Lu Fu ⁻¹
A Polvo	143	205	0.69
A Liq. esteril.	4556	105	43.4
B Polvo	97	102	0.95
B Liq. UHT	1587	111	14.5

**TABLA 46. NITROGENO TOTAL, NITROGENO NO CASEÍNICO Y
NO PROTEICO EN TCA (120 ml L⁻¹)**

Fórmula	NT (mg L ⁻¹)	NNP (mg L ⁻¹)	NNC (mg L ⁻¹)
A Polvo	3253	114	830
A Liq. esteril.	3258	153	539
B Polvo	3288	89	524
B Liq. UHT	3233	93	567

TABLA 47.- EVOLUCION PONDERAL (g)

GRUPOS	DIA 1	DIA 4	DIA 11
AIN 76	40.24±0.28	54.11±0.38	85.51±2.34
Control	39.86±0.29	53.94±1.74	95.63±2.77
ANOVA 1 vía			
Tipo	N.S.	N.S.	p=0.0107

Valores medios de 9 a 12 animales ± error estándar.

TAB 48. - INGESTA, COEFICIENTE DE EFICACIA ALIMENTARIA (C.E.A.) Y PROTEICA (C.E.P.)

GRUPOS	Ingesta (g/día)	Incremento de peso (g)	C.E.A.	C.E.P.	I.H.S. (%)
Control	10.72±0.54	6.30±0.31	0.56±0.03	3.35±0.17	4.72±0.42
A Polvo	8.70±0.43*	5.09±0.31	0.59±0.02	3.48±0.17	3.92±0.45\$
A Liq. esterilizado	8.56±0.32*	4.83±0.24	0.56±0.02	3.49±0.20	5.12±0.31
B Polvo	8.81±0.33*	4.87±0.29	0.55±0.02	3.30±0.12	5.52±0.22
B Liq. UHT	8.83±0.35*	4.94±0.262	0.56±0.01	3.40±0.08	5.81±0.18
	p=0.0010		N.S.	N.S.	p=0.0046

Valores medios de 12 animales ± error estándar.

Los símbolos indican diferencias significativas (p<0.05) respecto a: *control; † A polvo; ‡ A liq. esterilizada; \$ B polvo.

TABLA 49 . - INGESTA, COEFICIENTES DE EFICACIA ALIMENTARIA (C.E.A.) Y PROTEICA (C.E.P.) DURANTE EL PERIODO DE BALANCE E INDICE HEPATOSOMATICO (I.H.S.)

GRUPOS	Ingesta (s.s.) (g/día)	C.E.A.	C.E.P.	I.H.S. (%)
AIN 76	9.89±0.25	0.47±0.02	2.74±0.10	4.90±0.31
Control	10.72±0.54	0.56±0.03	3.35±0.17	4.44±0.34
ANOVA 1 vía				
Tipo	N.S.	p=0.0205	p=0.0033	N.S.

Valores medios de 9 a 12 animales ± error estándar.

TAB 50. - INGESTA, COEFICIENTE DE EFICACIA ALIMENTARIA (C.E.A.) Y PROTEICA (C.E.P.)

GRUPOS	Ingesta (g/día)	Incremento de peso (g)	C.E.A.	C.E.P.	I.H.S. (%)
Control	10.72±0.54	6.30±0.31	0.56±0.03	3.35±0.17	4.72±0.42
A Polvo	8.70±0.43*	5.09±0.31	0.59±0.02	3.48±0.17	3.92±0.45
A Liq. esterilizado	8.56±0.32*	4.83±0.24	0.56±0.02	3.49±0.20	5.12±0.31
B Polvo	8.81±0.33*	4.87±0.29	0.55±0.02	3.30±0.12	5.52±0.22
B Liq. UHT	8.83±0.35*	4.94±0.262	0.56±0.01	3.40±0.08	5.81±0.18†
ANOVA 1 vía					
	p=0.0010		N.S.	N.S.	p=0.0046

Valores medios de 12 animales ± error estándar.

Los símbolos indican diferencias significativas (p<0.05) respecto a: *control; † Apolvo; ‡ A liq. esterilizada; § B polvo.

TABLA 51. BALANCE DE NITROGENO

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ORINA	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(mg/día)							
AIN 76	272.19±6.52	11.41±0.53	73.29±2.94	260.78±6.60	187.49±6.97	95.7±0.2	71.7±1.3	68.7±1.2
Control	286.86±15.07	9.77±0.44	54.84±5.97	277.06±14.90	222.21±13.87	96.5±0.2	80.1±2.1	77.5±2.1
ANOVA 1 vía								
Tipo	N.S.	p=0.0269	p=0.0112	N.S.	p=0.0358	p=0.0206	p=0.0026	p=0.0017

Valores medios de 12 animales ± error estándar

TABLA 52 . BALANCE DE NITROGENO

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ORINA	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(mg/día)							
Control	286.86±15.07	9.77±0.44	54.84±5.97	277.06±14.90	222.21±13.87	96.5±0.2	80.1±2.1	77.5±2.1
A polvo	235.87±6.68*	12.17±0.63	61.34±3.05	223.70±6.59*	162.36±5.56*	94.8±0.3*	71.8±1.3	68.8±1.2*
A liq. esteril.	227.68±8.68*	16.28±1.32†	37.39±1.86†*	211.41±7.96*	174.01±7.92*	92.6±0.5*†	81.3±1.2†	76.4±1.2
B polvo	235.20±9.01*	12.43±0.74	44.10±4.79	222.77±8.77*	178.67±7.71*	94.5±0.3*	79.8±2.1	76.3±1.9
B liq. UHT	227.77±8.71*	12.55±0.84	49.33±3.35	215.21±8.45*	165.88±8.05*	94.2±0.4*	76.9±1.5	72.8±1.9
ANOVA 1 vía								
Tipo	p=0.0000	p=0.0001	p=0.0030	p=0.0000	p=0.0000	p=0.0000	p=0.0030	p=0.0031

Valores medios de 9 a 12 animales ± error estándar.

Los símbolos indican diferencias significativas (p<0.05) respecto a: *control; † A polvo; ‡ A liq. esterilizado; § B polvo

TABLA. 53. IN VITRO CALCIO (%)

Tipo	DIALIZADO	NO DIALIZADO SOLUBLE	PRECIPITADO
Fórmula A polvo	14,8±2,5*	45,4±1,2*	39,8±3,4†
Fórmula A liq.est.	15,6±0,8*	50,9±1,4†	33,5±1,7†
Fórmula B polvo	23,9±1,2†	62,0±0,6‡	14,1±0,6*
Fórmula B UHT	24,3±1,1†	64,4±0,2‡	11,3±1,2*
ANOVA 1 vía	p=0.003	p=0.000	p=0.001

TABLA 54. BALANCE DE CALCIO

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ORINA	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
AIN 76	48.40±1.66	12.50±0.8	2.10±0.18	35.90±1.73	33.80±1.63	73.9±1.8	94.1±0.5	69.6±1.8
Control	52.79±2.77	10.96±0.4	1.53±0.16	41.83±2.56	40.29±2.46	78.8±0.9	96.34±0.3	75.9±0.9
ANOVA 1 vía								
Tipo	N.S.	N.S.	p=0.0272	N.S.	p=0.0387	p=0.0272	p=0.0011	p=0.0053

Valores medios de 12 animales ± error estándar.

TABLA 55. BALANCE DE CALCIO

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ORINA	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(mg/día)							
Control	52.79±2.77	10.96±0.41	1.53±0.16	41.83±2.56	40.29±2.46	78.8±0.9	96.3±0.3	75.9±0.9
A polvo	39.27±2.12*	4.94±0.65*	1.01±0.08	34.33±2.13	33.31±2.10*	87.1±1.7*	96.9±0.2	84.5±1.8*
A liq. esterilizada	40.01±1.52*	4.35±0.42*	1.32±0.12	35.65±1.46	34.33±1.46	89.0±1.2*	96.2±0.3	85.6±1.1*
B polvo	39.82±1.52*	5.29±0.92*	1.17±0.09	34.53±0.96*	33.36±0.91*	87.2±1.8*	96.6±0.2	84.2±1.7*
B liq. UHT	38.91±1.48*	3.90±0.30*	0.92±0.21*	35.01±1.38	34.07±1.29	89.9±0.6*	97.4±0.6	87.6±0.7*
ANOVA 1 via								
Tipo	p=0.0000	p=0.0000	p=0.0298	p=0.0228	p=0.0300	p=0.0000	N.S.	p=0.0000

Valores medios de 9 a 12 animales ± error estándar

Los símbolos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a: *control; † A polvo; ‡ A liq. esterilizada; § B polvo.

TABLA 56. IN VITRO FOSFORO (%)

Tipo	DIALIZADO	NO DIALIZADO SOLUBLE	PRECIPITADO
Fórmula A polvo	29,6±1,2†	67,5±1,1*	2,9±0,5
Fórmula A liq. est.	27,3±2,1*†	70,1±2,3*†	2,7±0,1
Fórmula B polvo	24,5±0,5*	73,1±0,7†	2,5±0,2
Fórmula B UHT	25,2±0,7*†	71,4±0,3*†	3,4±0,7
ANOVA 1 vía	p=0.005	p=0.005	N.S.

TABLA 57. BALANCE DE FOSFORO

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ORINA	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(mg/día)							
AIN 76	53.33±1.82	7.91±0.30	10.92±0.71	45.42±1.76	34.50±1.49	85.1±0.6	75.9±1.3	64.5±1.3
Control	50.57±2.65	2.14±3.21	7.39±0.62	48.43±2.62	41.04±2.43	95.7±0.4	84.6±1.3	80.9±1.3
ANOVA 1 vía								
Tipo	NS	p=0.0000	p=0.0013	NS	p=0.0317	p=0.0000	p=0.0001	p=0.0001

Valores medios de 12 animales ± error estándar

TABLA 58. BALANCE DE FOSFORO

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ORINA	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(mg/día)							
Control	50.57±2.65	2.14±3.21	7.39±0.62	48.43±2.62	41.04±2.43	95.6±0.4	84.6±1.2	8.9±1.2
A polvo	36.91±2.0*	3.99±0.49	5.19±0.34*	32.91±2.03*	27.76±1.94*	88.8±1.5*	83.8±1.2*	74.5±1.6*
A liq. esterilizada	37.52±1.43*	3.84±0.38	4.07±0.41*	33.68±1.23*	29.61±1.24*	89.8±0.9*	87.9±1.2	78.9±1.4
B polvo	39.10±1.49*	4.47±0.72	4.23±0.38*	34.62±0.96*	30.39±1.03*	88.9±1.4*	87.8±1.1	77.9±1.3
B liq. UHT	38.93±1.49*	3.59±0.33*	5.57±0.53	35.33±1.43*	29.76±1.22*	90.7±0.9*	84.8±1.15	76.4±1.0
ANOVA 1 vía								
Tipo	p=0.0000	p=0.0001	p=0.0000	p=0.0000	p=0.0042	p=0.0001	N.S.	N.S.

Valores medios de 9 a 12 animales ± error estándar

Los símbolos indican diferencias significativas (p<0.05) respecto a: *control; † A polvo; ‡ A liq. esterilizada; § B polvo.

TABLA 59. IN VITRO MAGNESIO (%)

Tipo	DIALIZADO	NO DIALIZADO SOLUBLE	PRECIPITADO
Fórmula A polvo	30,7±0,6†	61,0±0,6*	8,3±0,8†
Fórmula A liq. est.	33,0±0,8†	59,7±1,2*	7,3±0,4*†
Fórmula B polvo	27,4±0,6*	66,4±0,7†	6,2±0,6*†
Fórmula B UHT	24,9±0,1*	70,0±0,4†	5,1±0,4*
ANOVA 1 vía	p=0.001	p=0.000	p=0.026

TABLA 60. BALANCE DE MAGNESIO

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ORINA	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(mg/día)							
AIN 76	5.74±0.20	2.16±0.09	0.94±0.04	3.57±0.21	2.63±0.19	61.9±2.1	73.1±1.2	45.4±2.1
Control	5.54±0.29	1.24±0.06	1.31±0.14	4.29±0.28	2.99±0.23	76.9±1.1	69.6±2.8	57.6±5.7
ANOVA 1 vía								
Tipo	N.S.	p=0.0000	p=0.0306	N.S.	N.S.	p=0.0000	N.S.	N.S.

Valores medios de 12 animales ± error estándar

TABLA 61. BALANCE DE MAGNESIO

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ORINA	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(mg/día)							
Control	5.54±0.29	1.24±0.06	1.3±0.14	4.29±0.28	2.99±0.23	76.9±1.3	69.6±2.9	57.6±1.8
A polvo	4.19±0.22*	0.89±0.06*	1.35±0.08	3.29±0.2*	1.93±0.19*	78.2±1.5	57.52±3.4*	45.3±1.2
A liq. esterilizada	4.45±0.17*	0.79±0.06*	1.3±0.09	3.65±0.14	2.35±0.15	82.1±1.16*	64.1±2.4	52.6±1.3
B polvo	4.84±0.18	0.9±0.09*	1.25±0.11	3.93±0.13	2.67±0.15	81.5±1.51	67.9±2.8	55.3±1.6
B liq. UHT	4.33±0.16*	0.82±0.04*	1.31±0.13	3.51±0.16	2.2±0.12*	80.8±1.24	63.1±2.6	50.9±2.1
ANOVA 1 vía								
Tipo	p=0.0003	p=0.0001	N.S.	p=0.0074	p=0.0014	p=0.0394	p=0.0449	N.S.

Valores medios de 9 a 12 animales ± error estándar

Los símbolos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a: *control; † A polvo; ‡ A liq. esterilizada; § B polvo.

TABLA 62. CONTENIDO Y CONCENTRACIÓN DE Ca, P, Mg y N CORPORAL TOTAL

GRUPO	PESO	Ca		P		Mg		N	
	(g)	(mg)	(mg/g)	(mg)	(mg/g)	(mg)	(mg/g)	(mg)	(mg/g)
AIN 76	79.12±3.61	547.85±16.87	6.98±0.35	474.90±34.03	6.10±0.69	24.75±1.00	0.31±0.00	1999.00±59.37	24.34±0.45
Control	92.34±3.32	580.01±17.73	6.29±0.11	506.60±14.02	5.50±0.18	20.30±0.33	0.22±0.01	1415.26±55.91	15.34±0.40
ANOVA 1 vía									
Tipo	p= 0.0272	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0028	p=0.0000	p=0.0001	p=0.0000

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

TABLA 63. CONTENIDO Y CONCENTRACIÓN DE Ca, P, Mg y N CORPORAL TOTAL

GRUPO	PESO	Ca		P		Mg		N	
	(g)	(mg)	(mg/g)	(mg)	(mg/g)	(mg)	(mg/g)	(mg)	(mg/g)
Control	92.34±3.32	580.01±17.73	6.29±0.11	506.60±14.02	5.50±0.18	20.30±0.33	0.22±0.01	1415.26±55.90	15.34±0.40
A polvo	85.73±2.59	559.59±22.47	6.53±0.15	477.58±10.63	5.60±0.21	25.35±0.75*	0.30±0.01	2082.13±47.70*	24.32±0.22*
A liq. esteril	82.90±2.29	553.20±17.39	6.28±0.17	521.00±45.11	6.32±0.60	24.73±0.63*	0.25±0.05	2072.60±48.98*	25.03±0.36*
B polvo	86.24±1.79	540.20±29.40	6.28±0.27	494.70±73.69	5.74±0.86	24.75±1.02*	0.29±0.01	2072.03±87.52*	24.06±1.11*
B liq. UHT	82.44±2.49	515.20±16.99	6.25±0.09	440.70±22.77	5.36±0.31	24.25±0.80*	0.29±0.01	2003.34±52.91*	24.40±0.41*
ANOVA 1 vía									
Tipo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0007	N.S.	p=0.0000	p=0.0000

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

* indica que es diferente significativamente respecto al control ($p < 0.05$).

TABLA 64.- CONCENTRACIONES SÉRICAS DE Ca, Mg, Fe, Zn y Cu

GRUPO	CALCIO (mg/dl)	MAGNESIO (mg/dl)	HIERRO (μ g/dl)	ZINC (μ g/dl)	COBRE (μ g/dl)
AIN 76	9.33 \pm 0.11	2.99 \pm 0.17	0.27 \pm 0.09	0.16 \pm 0. 03	0.03 \pm 0.04
Control	10.52 \pm 0.91	2.37 \pm 0.23	0.30 \pm 0.02	0.18 \pm 0.02	0.06 \pm 0.05
ANOVA 1 vía					
Tipo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios \pm error estándar.

TABLA 65.- CONCENTRACIONES SÉRICAS DE Ca, Mg, Fe, Zn y Cu

GRUPO	CALCIO (mg/dl)	MAGNESIO (mg/dl)	HIERRO (μ g/dl)	ZINC (μ g/dl)	COBRE (μ g/dl)
Control	10.84 \pm 0.77	2.37 \pm 0.23	0.30 \pm 0.02	0.18 \pm 0.02	0.06 \pm 0.05
F. A polvo	8.94 \pm 0.81	2.46 \pm 0.18	0.29 \pm 0.01	0.16 \pm 0.07	0.06 \pm 0.08
F.A esterilizada	8.33 \pm 0.6.9	2.34 \pm 0.13	0.25 \pm 0.03	0.16 \pm 0.01	0.04 \pm 0.10
F. B polvo	10.11 \pm 0.23	2.55 \pm 0.22	0.29 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01	0.4 \pm 0.06
F. B UHT	9.94 \pm 0.21	2.45 \pm 0.12	0.27 \pm 0.03	0.14 \pm 0.01	0.03 \pm 0.09
ANOVA 1 vía					
Tipo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios \pm error estándar.

TABLA 66. IN VITRO HIERRO (%)

Tipo	DIALIZADO	NO DIALIZADO SOLUBLE	PRECIPITADO
Fórmula A polvo	27,2±0,6	62,3±1,8	10,6±1,7
Fórmula A liq. est.	26,6±0,6	60,5±0,7	12,8±0,5
Fórmula B polvo	27,2±0,5	61,1±0,5	11,7±0,5
Fórmula B UHT	28,5±0,8	62,1±0,5	9,3±0,3
ANOVA 1 vía	N.S.	N.S.	N.S.

TABLA 67. BALANCE DE HIERRO

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ORINA	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(µg/día)							
AIN 76	547.41±18.74	248.33±8.52	24.34±1.58	299.07±18.85	274.72±18.54	54.2±1.9	91.6±0.7	49.7±2.1
Control	606.72±31.87	259.68±8.56	13.51±0.56	347.03±29.06	333.52±30.03	56.2±2.1	95.8±0.3	53.9±2.2
ANOVA 1 vía								
Tipo	N.S.	N.S.	p=0.0001	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0000	N.S.

Valores medios de 12 animales ± error estándar

TABLA 68. BALANCE DE HIERRO

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ORINA	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
			(µg/día)					
Control	606.72±31.	259.68±8.5	13.51±0.56	347.03±29.	333.52±30.	56.2±2.3	95.8±0.3	53.94±1.5
A polvo	414.59±22.4*	117.4±9.81*	12.59±0.62	297.19±21.5	284.59±21.95	71.2±2.3*	95.4±0.5*	68.03±1.3*
A liq. esterilizada	414.51±15.8*	115.71±10.5*	13.91±1.08	298.8±12.67	284.88±12.44	72.2±2.2*	95.3±0.3*	68.86±2.0*
B polvo	505.87±19.3*	176.29±13.8*	19.76±1.68*	329.57±13.9	309.81±13.25	65.3±2.1*	93.9±0.4*	61.42±1.6
B liq. UHT	446.45±18.62*	156.46±10.05*	12.14±0.67	329.98±18.16	317.84±18.1	67.6±2.1*	96.2±0.3	65.11±2.11*
ANOVA 1 vía								
Tipo	P=0.0000	P=0.0000	P=0.0074	N.S.	N.S.	P=0.0000	P=0.0034	P=0.0001

Valores medios de 9 a 12 animales ± error estándar

Los símbolos indican diferencias significativas (p<0.05) respecto a: *control; † A polvo; ‡ A liq. esterilizada; § B polvo.

TABLA 69. IN VITRO ZINC (%)

Tipo	DIALIZADO	NO DIALIZADO SOLUBLE	PRECIPITADO
Fórmula A polvo	20,8±0,6*	70,4±1‡	8,8±0,4*
Fórmula A liq. est.	19,9±0,6*	69,9±0,0‡	10,2±0,6*
Fórmula B polvo	24,2±0,3‡	55,4±0,2‡	20,4±0,4‡
Fórmula B UHT	23,4±0,9‡	48,6±0,8*	28,0±0,4‡
ANOVA 1 vía	p=0.004	p=0.000	p=0.000

TABLA 70. BALANCE DE ZINC

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ORINA	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(µg/día)							
AIN 76	503.14±17.22	384.51±15.56	40.23±2.50	118.63±14.64	78.41±16.55	23.35±2.43	57.40±3.71	18.22±2.87
Control	490.26±25.39	292.61±10.57	12.01±0.93	197.66±22.51	185.65±23.	39.13±2.9	92.31±1.62	36.54±3.11
ANOVA 1 vía								
Tipo	N.S.	p=0.0001	p=0.0000	p=0.0075	p=0.0010	p=0.0004	p=0.0001	p=0.0000

Valores medios de 12 animales ± error estándar.

TABLA 71. BALANCE DE ZINC

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ORINA	ABSORBIDO	RETENIDO	% A/I	% R/A	% R/I
	(g/día)							
Control	490.26±25.75	292.61±10.57	12.01±0.93	197.66±22.51	185.65±23.05	39.1±2.9	92.3±1.6	36.5±3.1
A polvo	376.39±17.23*	260.45±20.48	39.58±3.47*	115.94±17.02*	76.36±18.10*	30.7±4.4	57.8±7.4*	20.1±4.8*
A liq. esteril	369.37±14.15*	225.81±12.10	34.86±3.67*	143.56±9.48	108.69±8.97	38.8±2.2	75.1±2.4	29.4±2.6
B polvo	482.33±18.49	332.02±25.74	41.91±2.85*	150.32±17.38	108.41±17.68	31.5±3.7	67.1±4.9*	22.9±3.8*
B liq. UHT	474.41±18.16	293.94±16.99	37.57±4.15*	180.46±19.10	142.89±21.01	37.7±3.4	75.1±5.9	29.6±4.1
ANOVA 1 vía								
Tipo	p=0.0000	p=0.0013	p=0.0000	p=0.0229	p=0.0017	N.S.	p=0.0005	p=0.0208

Valores medios de 9 a 12 animales ± error estándar.

Los símbolos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a: *control; † A polvo; ‡ A liq. esterilizada; § B polvo.

TABLA 72. BALANCE DE COBRE

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ABSORBIDO	% A/I
		($\mu\text{g}/\text{día}$)		
AIN 76	100.62 \pm 3.44	77.16 \pm 2.38	23.46 \pm 2.91	22.82 \pm 2.32
Control	126.89 \pm 6.66	62.03 \pm 2.45	64.85 \pm 5.53	50.29 \pm 2.56
ANOVA 1 vía				
Tipo	p=0.0020	p=0.0002	p=0.0000	p=0.0001

Valores medios de 12 animales \pm error estándar.

TABLA 73. BALANCE DE COBRE

GRUPOS	INGERIDO	HECES	ABSORBIDO	% A/I
Control	126.89 \pm 6.66	62.03 \pm 2.45	64.85 \pm 5.53	50.3 \pm 2.2
A polvo	82.02 \pm 4.44*	49.85 \pm 2.85*	32.16 \pm 2.71*	38.9 \pm 2.3*
A liq. esterilizada	78.39 \pm 2.98*	45.51 \pm 2.41*	32.87 \pm 1.91*	42.1 \pm 2.1
B polvo	87.32 \pm 3.32*	54.96 \pm 2.99	32.35 \pm 3.21*	36.8 \pm 3.2*
B liq. UHT	91.74 \pm 3.51*	51.41 \pm 2.42	40.33 \pm 3.09*	43.6 \pm 2.5
ANOVA 1 vía				
Tipo	p=0.0000	p=0.0006	p=0.0000	p=0.0033

Valores medios de 9 a 12 animales \pm error estándar

Los símbolos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a: *control; † A polvo; ‡ A liq. esterilizada; § B polvo.

TABLA 74. CONTENIDO Y CONCENTRACIÓN DE Fe, Zn y Cu CORPORAL TOTAL

GRUPOS	PESO	Fe		Zn		Cu	
	(g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)
AIN 76	79.12 \pm 3.61	2377 \pm 141	30.02 \pm 1.01	2443 \pm 368	30.47 \pm 3.20	199 \pm 6	2.50 \pm 0.05
Control	92.34 \pm 3.32	2547 \pm 148	27.60 \pm 1.39	3032 \pm 138	32.86 \pm 1.10	284 \pm 13	3.075 \pm 0.09
ANOVA 1 vía							
Tipo	p=0.0272	N.S.	N.S..	N.S.	N.S.	p=0.0003	p=0.0006

Valores medios de 5 ó 6 animales \pm error estándar.

TABLA 75. CONTENIDO Y CONCENTRACIÓN DE Fe, Zn y Cu CORPORAL TOTAL

GRUPOS	PESO	Fe		Zn		Cu	
	(g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)
Control	92.34 \pm 3.32	2547.00 \pm 148.10	27.60 \pm 1.39	3031.92 \pm 138.08	32.86 \pm 1.10	283.99 \pm 13.08	3.08 \pm 0.09
A polvo	85.73 \pm 2.59	3322.92 \pm 154.97*	38.69 \pm 0.91*	2745.83 \pm 226.63	31.93 \pm 2.21	222.50 \pm 18.20*	2.59 \pm 0.08*
A. esterilizada	82.90 \pm 2.29	3135.42 \pm 154.56*	37.74 \pm 1.06*	2264.58 \pm 177.35	29.63 \pm 1.52	214.17 \pm 9.61*	2.58 \pm 0.08*
B polvo	86.24 \pm 1.79	3322.40 \pm 216.78*	38.51 \pm 2.24*	2832.50 \pm 234.34	33.03 \pm 3.34	213.00 \pm 8.78*	2.47 \pm 0.10*
B UHT	82.44 \pm 2.49	3322.50 \pm 216.81*	40.51 \pm 3.14*	2702.50 \pm 243.84	32.92 \pm 3.23	196.00 \pm 8.28*	2.38 \pm 0.04*
ANOVA 1 vía							
Tipo	N.S.	p=0.0274.	p=0.0013.	N.S.	N.S.	p=0.0011	p=0.0000

Valores medios de 6 animales \pm error estándar.

* indica que es diferente significativamente respecto al control ($p < 0.05$).

TABLA 76.- CONTENIDO Y CONCENTRACION DE HIERRO EN HÍGADO, BAZO, PIEL Y HEMATÍES

GRUPOS	HIGADO			BAZO			PIEL	HEMATÍES
	peso (g)	(μ g)	(μ g/g)	peso (g)	(μ g)	(μ g/g)	(μ g/g)	(μ g/g)
AIN 76	4.19 \pm 0.27	267.00 \pm 38.68	62.47 \pm 6.04	0.42 \pm 0.01	85.44 \pm 11.35	204.82 \pm 31.37	8.65 \pm 0.40	544.11 \pm 81.60
Control	4.25 \pm 0.32	320.51 \pm 31.57	77.41 \pm 9.77	0.36 \pm 0.04	60.36 \pm 3.86	177.43 \pm 22.23	8.65 \pm 0.38	665.53 \pm 94.81
ANOVA 1 vía	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Tipo								

Valores medios de 5 ó 6 animales \pm error estándar

TABLA 77.- CONTENIDO Y CONCENTRACION DE HIERRO EN HÍGADO, BAZO, PIEL Y HEMATÍES

GRUPOS	HIGADO			BAZO			PIEL	HEMATÍES
	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)
Control	4.25 \pm 0.32	320.51 \pm 31.57	77.41 \pm 9.73	0.35 \pm 0.03	60.36 \pm 3.86	177.43 \pm 23.23	8.65 \pm 0.37	665.52 \pm 94.8
A polvo	3.87 \pm 0.43	262.83 \pm 49.7	69.76 \pm 13.13	0.37 \pm 0.05	76.0 \pm 9.25	228.68 \pm 41.48	10.68 \pm 0.94	578.84 \pm 60.97
A liq esteril	4.07 \pm 0.36	300.81 \pm 9.19	75.45 \pm 4.81	0.36 \pm 0.04	82.14 \pm 9.47	229.51 \pm 13.42	11.11 \pm 1.11	670.68 \pm 62.21
B polvo	4.65 \pm 0.44	389.71 \pm 52.76	86.13 \pm 14.93	0.33 \pm 0.3	92.0 \pm 18.8	267.93 \pm 40.15	11.43 \pm 0.7	675.02 \pm 55.6
B liq.UHT	5.14 \pm 0.23	461.22 \pm 31.32†	89.57 \pm 3.25	0.41 \pm 0.01	85.62 \pm 13.08	607.07 \pm 29.81	10.67 \pm 0.62	736.75 \pm 31.89
ANOVA 1 vía								
Tipo	N.S.	p=0.0190	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 5 a 6 animales \pm error estándar

* Diferencias entre tipos dentro del mismo calentamiento ($p < 0.05$) ANOVA 1 vía.

TABLA 78.- CONTENIDO Y CONCENTRACION DE ZINC EN HÍGADO, BAZO, PIEL Y HEMATÍES

GRUPOS	HIGADO			BAZO			PIEL	HEMATIES
	peso (g)	(µg)	(µg/g)	peso (g)	(µg)	(µg/g)	(µg/g)	(µg/g)
AIN 76	4.19±0.27	121.37±1.77	29.56±2.00	0.42±0.01	17.28±1.15	41.23±3.59	27.03±1.38	8.93±1.51
Control	4.25±0.32	130.87±8.14	31.82±3.86	0.36±0.04	9.56±0.96	26.95±1.49	20.59±0.27	9.97±1.29
ANOVA 1 vía								
Tipo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0009	p=0.0063	p=0.0330	N.S.

Valores medios de 5 ó 6 animales ± error estándar

TABLA 79.- CONTENIDO Y CONCENTRACION DE ZINC EN HÍGADO, BAZO, PIEL Y HEMATÍES

GRUPOS	HIGADO			BAZO			PIEL	HEMATÍES
	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)
Control	4.25 \pm 0.32	130.87 \pm 8.13	31.81 \pm 3.86	0.35 \pm 0.03	9.56 \pm 0.96	26.95 \pm 1.48	20.59 \pm 2.26	9.97 \pm 1.28
A polvo	3.87 \pm 0.43	130.07 \pm 10.57	34.52 \pm 2.55	0.37 \pm 0.05	12.99 \pm 1.57	37.3 \pm 3.39	32.63 \pm 3.68*	10.22 \pm 2.26
A liq. est	4.07 \pm 0.36	131.1 \pm 19.91	31.66 \pm 2.01	0.36 \pm 0.04	14.38 \pm 1.77	39.96 \pm 1.67	26.46 \pm 1.71	10.12 \pm 2.56
B polvo	4.65 \pm 0.44	154.41 \pm 17.88	33.06 \pm 1.32	0.33 \pm 0.3	13.3 \pm 0.85	40.33 \pm 3.88	25.56 \pm 1.17	9.34 \pm 0.35
B liq. UHT	5.14 \pm 0.23	146.12 \pm 7.19	28.56 \pm 1.65	0.41 \pm 0.01	19.84 \pm 5.19	47.21 \pm 11.25	27.52 \pm 1.27	9.97 \pm 0.49
ANOVA 1 vía								
Tipo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	p=0.0317	N.S.

Valores medios de 5 a 6 animales \pm error estándar.

No aparecieron diferencias significativas debidas al calentamiento ($p < 0.05$) ANOVA 1 vía.

TABLA 80.- CONTENIDO Y CONCENTRACION DE COBRE EN HÍGADO, PIEL Y HEMATÍES

GRUPOS	HIGADO		PIEL	HEMATÍES	
	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	
AIN 76	4.19 \pm 0.27	36.43 \pm 2.20	6.49 \pm 0.68	2.19 \pm 0.12	7.83 \pm 1.27
Control	4.25 \pm 0.32	35.26 \pm 3.66	8.29 \pm 0.50	2.12 \pm 0.37	6.31 \pm 1.41
ANOVA 1 vía					
Tipo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 5 a 6 animales \pm error estándar

TABLA 81.- CONTENIDO Y CONCENTRACION DE COBRE EN HÍGADO, BAZO, PIEL Y HEMATÍES

GRUPOS	HIGADO			PIEL	HEMATIES
	peso (g)	(μg)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)
Control	4.25 \pm 0.32	35.25 \pm 3.66	8.29 \pm 0.5	2.12 \pm 0.37	6.31 \pm 1.4
A polvo	3.87 \pm 0.43	38.75 \pm 9.17	9.66 \pm 2.1	2.28 \pm 0.13	5.02 \pm 1.24
A esterilizada	4.07 \pm 0.36	24.79 \pm 1.57	6.16 \pm 0.37	2.12 \pm 0.17	5.25 \pm 0.84
B polvo	4.65 \pm 0.44	43.36 \pm 5.24	9.28 \pm 0.41	1.94 \pm 0.16	7.88 \pm 2.11
B liq. UHT	5.14 \pm 0.23	32.13 \pm 3.1	6.28 \pm 0.62	2.07 \pm 0.23	6.39 \pm 1.11
ANOVA 1 vía					
Tipo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 5 a 6 animales \pm error estándar.

No aparecieron diferencias significativas debidas al calentamiento ($p < 0.05$) ANOVA 1 vía.

TABLA 82.- VALORES DE HEMATOCRITO Y HEMOGLOBINA

GRUPOS	Hc (mg/ml)	Hb (g/100 ml)
AIN 76	34.12±1.40	9.05±0.60
Control	35.88±2.08	8.55±0.46
ANOVA 1 vía		
Tipo	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

TABLA 83.- VALORES DE HEMATOCRITO Y HEMOGLOBINA

GRUPOS	Hc (mg/ml)	Hb (g/100 ml)
Control	35.88±2.08	8.55±0.46
A polvo	38.77±2.07	12.37±0.52
A esterilizada	38.90±0.40	11.55±0.55
B polvo	35.20±1.50	11.73±0.36
B liq. UHT	36.57±2.81	12.10±0.77
ANOVA 1 vía		
Tipo	N.S.	N.S.

Valores medios de 6 animales ± error estándar.

4.2. Experimentos I y II

4.2.1. Ingesta y evolución ponderal

En los animales que consumieron leche de vaca la ingesta alimentaria se situó en unos 120 ml totales, independientemente del calentamiento efectuado (tabla 9). El peso corporal evolucionó de acuerdo con el estadio fisiológico correspondiente (tercera semana de lactación) y pasó de aproximadamente 30 g a 40-41 g que es el peso considerado normal para la rata en el momento de su destete (Saiz y col., 1983; Harkness y Wagner, 1995). sin producirse diferencias significativas debidas al calentamiento (tabla 11).

Las ratas alimentadas con fórmula infantil voluntariamente bebieron menor cantidad de alimento que las que tomaron leche de vaca (tabla 10). Por ello, aunque partieron de pesos similares a éstas, no alcanzaron al final del experimento pesos equivalentes (tabla 12). Además, en estos animales se observó una influencia del tipo de fórmula consumida; la forma líquida condicionó una menor ingesta y ganancia ponderal respecto a la fórmula deshidratada (tabla 12). Sin embargo, el calentamiento doméstico de la leche, al baño María o al microondas no afectó estos parámetros.

La diferencia de comportamiento de los animales entre la experiencia I, en la que utilizó leche de vaca, y la experiencia II, en la que se emplearon fórmulas infantiles, podría relacionarse con la composición de la leche de vaca que es mucho más parecida a la leche de rata que las fórmulas infantiles (Keen y col. 1981; Saiz y col., 1983; Davis y col. 1994).

Por su parte las dos fórmulas, aunque tenían prácticamente el mismo contenido de nutrientes, según indicaciones del fabricantes y nuestros propios análisis (tabla 2), parecieron tener distinta calidad nutritiva. En este sentido, los análisis efectuados en la tercera experiencia, que se detallaran más adelante, revelaron que la fórmula líquida posiblemente fue sometida a un mayor tratamiento térmico que la fórmula en polvo con una mayor alteración de las proteínas, lo que podría haber condicionado una influencia más negativa sobre el

crecimiento, coincidiendo con la bibliografía (Muñoz y col., 1981; Lewis y col., 1982; Marcos y col., 1984; Tirapegui y De Angelis, 1985; Sakuma y col., 1987). Por un lado, se ha descrito que el sabor y el olor pueden verse alterados en leche procesada, lo que se asocia a su alto contenido en lactulosa, producto de isomerización de la lactosa, (Andrews 1986; Burton 1988) y fue precisamente la fórmula líquida la que contenía una concentración de este compuesto más elevada: 4556 mg/L frente a los 143 mg/L de la fórmula en polvo. Pero además, se sabe que los productos de la reacción de Maillard pueden disminuir la ingesta afectando el peso corporal (Furniss y col, 1989; Burton, 1994) y la fórmula líquida presentaba cierto pardeamiento, y como se explicará en el apartado 4.3.1. probablemente contenía mayor proporción de productos avanzados de la Reacción de Maillard que la fórmula en polvo.

La influencia del calentamiento al baño María y al microondas sobre la ingesta y evolución ponderal, no se observó quizá porque se reproducían condiciones domésticas moderadas (Creas y Fungo, 1982; Juncar y Penninks, 1992) y, en caso de haberse producido habrían sido mínimas y quedarían anuladas por el efecto mucho mayor del tratamiento térmico industrial implicado en la fabricación de estos alimentos. En este sentido, se ha señalado que la alimentación de ratas en crecimiento con caseína calentada a 121°C origina una disminución de la ingesta, incremento de peso y eficacia proteica (Knipfel, 1975), mientras que si la caseína sólo se calentaba a 35°C, incluso en presencia de glucosa y durante un tiempo prolongado, no se producía ninguna alteración en la ingesta y el peso (Friedman y col. 1988). Quizá la única influencia del calentamiento por microondas, que podría relacionarse con una alteración del peso, sería la posibilidad de que originara una proporción elevada de L-aminoácidos los cuales no son utilizable por el organismo. Sin embargo parece ser que ello sólo se produce en tratamientos por microondas muy intensos, Lubec et al (1989).

Como se puede observar en las tablas 13 y 14, los valores del índice hepatosomático obtenidos en este trabajo como corresponde a animales muy jóvenes, son inferiores a los correspondientes a ratas más adultas (Aspe, 1992; Arce, 1993; Pérez, 1997) y muy próximos a los descritos para ratas de algo más de un mes de edad (Aguirre, 1995). Existió una pequeña

diferencia, entre los índices de las ratas alimentadas con fórmula infantil respecto a las alimentadas con leche de vaca, siendo éstos significativamente inferiores, lo que se relaciona fundamentalmente con el peso final del animal (tabla 11 y 12), y con el peso de los hígados (tabla 37 y 38).

El índice hepatosomático no varió en los grupos de animales que tomaron leche de vaca (tabla 13), ni en los que tomaron fórmula infantil, en función de su forma de presentación ni del calentamiento ensayado (tabla 14). Se sabe que cuando se ingieren sustancias extrañas el peso hepático puede elevarse debido a la necesidad de metabolizar el xenobiótico (Arce, 1993; López-Varela y col., 1995). En el caso de productos de la reacción de Maillard, Erbersdobler y col. (1981) demostraron que algunos compuestos de Amadori son captados por el hígado, y se ha descrito que la ingesta excesiva de compuestos de la reacción de Maillard produce hepatomegalia (O'Brien y Walker, 1988) aunque esto no se ha detectado en condiciones más moderadas (Aspe, 1992).

4.2.2. Biodisponibilidad del calcio

4.2.2.1. Ensayos in vitro

Aproximadamente el 15-20% del calcio de la leche de vaca entera dializó, en concordancia con los resultados de Shen y col. (1995) y Roig (1996), y casi el doble, un 30%, en el caso de la leche descremada, de acuerdo con Aguirre (1995). Los valores obtenidos para las fracciones del no dializado soluble y el precipitado estuvieron en torno al 62% y 20%, respectivamente, para la leche entera, y 62% y 8%, respectivamente, para la descremada (tablas 15, 16 y 17). Para este último tipo, el rango sería similar al observado en otros estudios (Aguirre, 1995). Por tanto, existieron diferencias claras, y significativas, en el dializado y precipitado debidas a la cantidad de grasa de la leche (Figuras 12,13,14).

En diversos sistemas *in vitro* similares al nuestro, se ha descrito también que la grasa inhibe la diálisis del calcio y dicha interferencia es más acusada cuando la grasa es de tipo saturado (Vaquero y col., 1992; Aguirre, 1995; Pérez-Granados, 1997). Esta interacción en el caso de la leche ha sido descrita por Reykdal y Lee (1991). Ello habría que relacionarlo con la capacidad del calcio de formar jabones insolubles con los ácidos grasos saturados, especialmente los de cadena larga (Widdowson, 1965). Los ácidos grasos saturados más abundantes de la leche de vaca son el mirístico, palmítico y esteárico, y entre los insaturados el oléico (Bellomonte y col., 1990) y parece ser que precisamente los ácidos grasos saturados de entre 12 y 18 carbonos son los que más perjudican la absorción de este mineral (Cheng y col., 1949; Nicolaysen y col., 1953) frente a los saturados de cadena más corta y los insaturados (Gacs y Baltrop, 1977; Van Dokkum y col., 1983; Aguirre, 1995; Pérez-Granados, 1997).

El calcio no dializado soluble tendió a aumentar a medida que avanzaba la digestión pancreática, aunque esta tendencia no se aprecia claramente con la leche de vaca entera aisladamente (tabla 16, Figura 13). En casi todos los estudios de digestibilidad *in vitro* se ha observado influencia del tiempo de digestión, aunque ésta ha sido desigual: se han descrito elevaciones progresivas de formas no dializadas e insolubles de calcio (Aspe, 1992; Aspe y col. 1993; Aguirre, 1995; Pérez Granados, 1997), disminuciones del no dializado soluble (Aspe y col. 1993; Pérez-Granados, 1997), disminuciones del dializado (Vaquero y col. 1992; Aguirre, 1995; Pérez Granados, 1997) e incluso elevaciones del dializado (Aspe, 1992). Las diferencias podrían atribuirse a las condiciones experimentales y al tipo de muestra ensayada. No se observaron diferencias significativas en la fracción de calcio no dializado pero soluble entre la leche de vaca entera y la descremada, y como se ha indicado anteriormente, fue el calcio dializado el que más varió debido al contenido de grasa de la leche. Schwartz y col. (1982) también indicaron que la disponibilidad *in vitro* de calcio era superior en la leche de vaca desnatada que en la entera, aunque en su estudio no identificaron el calcio capaz de dializar y solamente el calcio soluble

total; Reykdal y Lee (1991) encontraron que la diferencia se producía en el no dializado soluble en lugar del dializado. También Shen y col. (1995) observaron que el calcio de la leche descremada de distintas especies tendía a dializar más que sus homólogas enteras. No obstante, de todo ello no puede deducirse que la ingesta de leche entera frente a la descremada deprima la absorción intestinal de calcio, ya que numerosos trabajos demuestran que el calcio lácteo es altamente disponible (Walstra y Jeness, 1984; Reykdal y Lee, 1991) estando en una forma de fácil asimilación; prácticamente todo el calcio (99%) está en la fracción desnatada (Fransson y Lönnnerdal, 1983); dos tercios del total está en forma coloidal asociada con las micelas de caseína, en forma de fosfato cálcico o de iones calcio unidos a los residuos de fosfoserina y el tercio restante está en forma soluble (Holt, 1985).

Al igual que ocurre en la fracción del no dializado soluble, la hora también afecta significativamente al precipitado, pero en este caso de manera negativa (tabla 17, Figura 14). Se aprecia claramente que la leche de vaca descremada, que es la que resultó tener mayor porcentaje de calcio dializado, originó un menor precipitado, con diferencias significativas respecto a la leche de vaca entera y a las fórmulas (tabla 15 y 17).

La digestión *in vitro* de la fórmula líquida respecto a la polvo reveló sólo algunas diferencias significativas que se resumirían en una tendencia a incrementarse las formas de calcio de bajo peso molecular, dializado y no dializado soluble, (tablas 15 y 16). Este resultado probablemente se debe a las características físico-químicas de estas fórmulas, y se explicaría la presencia de emulsionantes, que debido a su naturaleza dipolar pueden atraer cationes divalentes (Sandstom y col., 1983), y estabilizantes en la fórmula infantil líquida. En general, la proporción de calcio dializado en las dos fórmulas fue similar a la de la leche de vaca entera y quedó muy por debajo de la correspondiente a la descremada. Por su parte, el no dializado soluble de las dos fórmulas quedó por debajo del nivel de la leche de vaca, particularmente el de la fórmula

en polvo, y el precipitado de ambas fórmulas fue superior, con algunas excepciones, al de la leche de vaca (tablas 16 y 17). Los valores obtenidos en este trabajo son del mismo orden que los descritos por Roig (1997) para distintos tipos de fórmulas infantiles y leche de vaca entera.

En la figura 1 se representa la cantidad de calcio que se encontraría en la forma dializada y no dializada a partir del mismo volumen (100 ml) de cada tipo de leche o fórmula infantil, calculado a partir del valor porcentual medio de las tres horas de digestión y la concentración del metal en la muestra de partida correspondiente. Como se observa claramente, el calcio dializado y el no dializado soluble de la leche de vaca entera, seguida de la descremada, por unidad de volumen, son superiores en relación a los que aportan las fórmulas infantiles, debido a que contienen aproximadamente una concentración doble del mineral (tablas 1 y 2), y en el caso de la leche descremada también a que el porcentaje de diálisis era el más alto. Para este tipo de leche se aprecia que la magnitud del precipitado es muy pequeña, al producirse tan solo en un 8%. A grandes rasgos, las diferencias entre fórmulas descritas en los valores porcentuales se mantienen al utilizar esta expresión, ya que la concentración de calcio de los dos preparados fue muy similar.

Según este estudio, la disponibilidad in vitro de calcio de la leche de vaca es superior a la de las fórmulas infantiles, y más todavía cuando se trata de leche descremada, y se observa una tendencia a mayor disponibilidad de calcio con el preparado para lactantes líquido respecto al polvo. Ciertamente, existe una diferencia importante en la forma físico-química de este elemento entre la leche de vaca y las fórmulas infantiles, éstas se elaboran a partir de leche de vaca total o parcialmente desmineralizada y desnatada adicionándose aceites vegetales, su contenido proteico se modifica cualitativa y cuantitativamente variando la relación

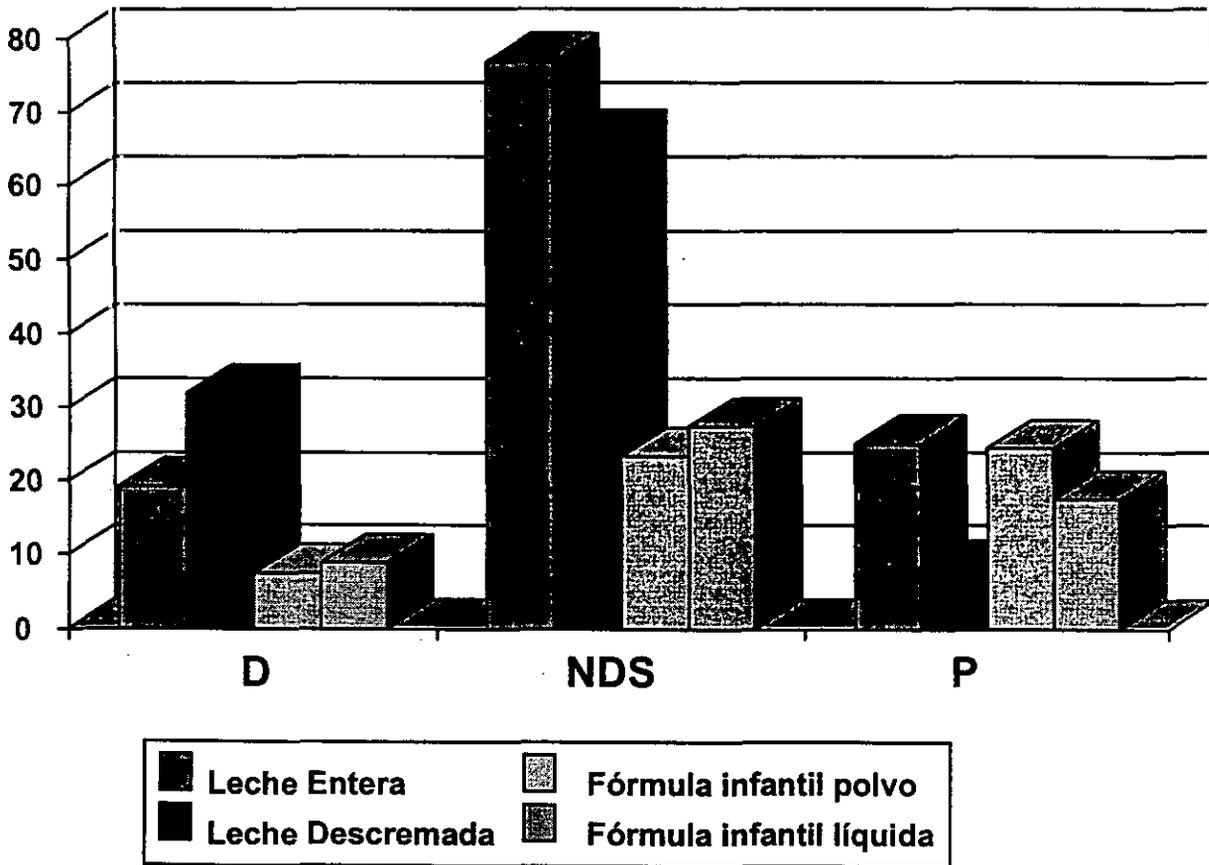
caseína:proteínas séricas, y lógicamente constituyen el alimento más adecuado para alimentar a un bebé cuando no es posible la lactancia materna.

En lo que respecta a los efectos de los calentamientos al baño María y por microondas, no se ha detectado ninguna influencia significativa en ninguna de las tres fracciones estudiada tras la digestión in vitro de la leche de vaca entera y descremada (tabla 15, 16 y 17). Tampoco se han encontrado variaciones debidas al tratamiento térmico en el calcio dializado de las fórmulas (tabla 15). No obstante, el calentamiento introdujo ciertos cambios en el calcio no dializado (tabla 16), favoreciendo las formas solubles en detrimento de las insolubles, este efecto fue significativo tanto en el calcio no dializado soluble como en el precipitado cuando se calentó por microondas, y sólo en el precipitado en el caso del baño María (tabla 17).

El hecho de que el calentamiento haya ejercido algunos efectos sobre el calcio de la fórmula en polvo podría atribuirse a su heterogeneidad, lógicamente mucho menor que en la fórmula líquida, de forma que al calentar reducirían los tamaños moleculares, incrementándose las formas solubles de calcio y favoreciéndose su disolución. Por ello, de nuestros resultados también se deduce que el tratamiento al baño María y por microondas asemeja la fórmula en polvo a la líquida. También puede entenderse que este efecto haya sido más marcado al utilizar microondas que con el calentamiento convencional, ya que en el primero el agua y las partículas de leche intentan alinearse con el campo electromagnético y se origina una rotación dipolar con la consecuente fricción intermolecular que llega a romper los puentes de hidrógeno débiles favoreciendo la disolución. Por otra parte, la polarización iónica también se produciría en el calcio, así como otros elementos ionizados, que en su migración electroforética colisionaría con otras moléculas e iones (Yeo et al, 1991) todo ello contribuiría a reducir los tamaños de las partículas y favorecer la disolución.

Figura 1. Valores absolutos de Ca

mg/100 ml



4.2.2.2. Ensayos in vivo

Como corresponde a la ingesta alimentaria (tabla 9), la cantidad de calcio ingerida no mostró diferencias significativas entre los grupos que tomaron la leche de vaca entera, sin calentar o bien calentada al baño María o al microondas. Tampoco se vieron afectadas la absorción ni retención aparentes de calcio, aunque para llegar a esos valores las ratas alimentadas con la leche tratada al baño María utilizaron el calcio con una eficacia digestiva, metabólica y nutritiva global superiores respecto al resto de los animales (tabla 18). Por lo tanto, tampoco se modificaron el contenido absoluto ni la concentración del mineral en el cuerpo de los animales al final del experimento (tabla 26).

Ya se ha comentado, los tres grupos de ratas que tomaron la fórmula infantil líquida bebieron menor cantidad de alimento (tabla 10), y como consecuencia, ingirieron significativamente menos calcio que los que tomaron fórmula en polvo (tabla 19). Ese efecto principal provocó también una reducción significativa de la absorción de calcio con respecto a los que tomaron fórmula en polvo reconstituida, a pesar de que los animales intentaron absorber el calcio del preparado líquido con mayor eficacia, como se demuestra por las diferencias significativas en el porcentaje A/I debidas al tipo de fórmula. El balance de calcio también fue más bajo en los grupos que tomaron el preparado para lactantes líquido debido, por un lado a la inferior absorción, y por otro a que la eficacia de utilización metabólica (%R/A) fue también más baja respecto a los animales que tomaron la fórmula en polvo. Es decir, parte del calcio absorbido se eliminó por orina, con una eliminación media de 0.7 y 3 mg /período en los grupos que tomaron la fórmula en polvo y líquida, respectivamente. En consecuencia, la utilización nutritiva global fue menor en estos animales (Fig 15).

En ratas lactantes existe un sistema de transporte intestinal de calcio por difusión (Bronner y col. 1992), independiente de la vitamina D, hasta el comienzo de la tercera semana de edad, a partir de entonces aparece el transporte activo saturable mediado por un transportador (Ghishan y col., 1980). Los ensayos realizados con la leche de vaca y las fórmulas infantiles revelan que entre los días 16 y 22 las ratas fueron capaces de absorber una proporción bastante

alta de calcio cuando ingerían menor cantidad del mismo, lo que parece reflejar la existencia del transporte activo. Así, el orden observado en la digestibilidad fue descendiente en los grupos: fórmula líquida > fórmula en polvo > leche de vaca. Pero a este efecto también han podido contribuir en alguna medida determinados componentes que abundan más en las fórmulas y que estimulan el transporte intestinal del elemento, entre ellos destacaría la lactosa. Estudios hechos con ratas y otras especies de mamíferos (Ziegler y Fomon, 1983) sugieren que la lactosa favorece al absorción de calcio, así como la de magnesio y hierro entre otros elementos. El que las fórmulas se suplementen con sales de calcio como citratos, carbonatos, cloruros, y fosfatos mono, di y tribásicos (Miles, 1982; Packard, 1982) también ha podido ejercer un efecto activador, así como una relación Ca/P más favorable y una mayor presencia de proteínas séricas (Lönnerdal, 1989).

Diversos estudios han demostrado que los productos de la reacción de Maillard pueden incrementar las pérdidas urinarias de distintos elementos, entre los que se encuentra el calcio (Hurrell 1990; Aspe, 1992) que se excretaría en forma de complejos de alto peso molecular (Rendelman, 1987). Esto apoyaría que el consumo de la fórmula infantil líquida implica una ingesta más elevada de productos de la reacción de Maillard, que serían absorbibles en gran medida e interaccionarían con el metabolismo del calcio en etapas postabsortivas. De hecho, la capacidad de incrementar la absorción del mineral estaba inalterada en los animales que consumieron este preparado, los cuales presentaron un incremento en la digestibilidad aunque con ello no consiguieron igualar los valores de retención de los lactantes alimentados con el preparado en polvo.

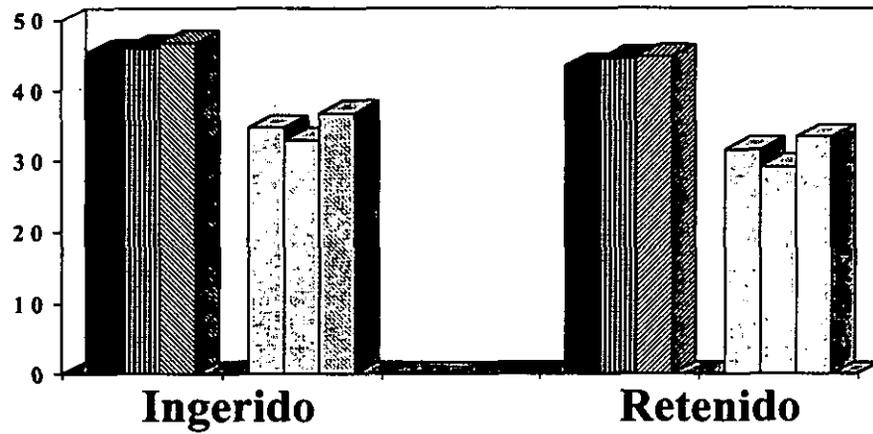
Al igual que ocurría en el ensayo realizado con leche de vaca, el calentamiento doméstico realizado no llegó a modificar la absorción aparente ni el balance de calcio en las ratas lactantes que tomaron fórmula infantil como único alimento (tabla 19). No obstante, el calentamiento al baño María de la fórmula en polvo originó una pequeña elevación del coeficiente R/A, similar a la observada al calentar la leche de vaca por el mismo procedimiento (tabla 18), aunque no se modificaron ni la digestibilidad ni la utilización nutritiva. Sin embargo, cuando se calentaba al

baño María la fórmula líquida se redujo significativamente la utilización metabólica y nutritiva global del calcio. Por su parte, el calentamiento por microondas de la fórmula líquida incidió disminuyendo la digestibilidad del calcio. A pesar de lo antedicho, todas estas modificaciones, aunque significativas, fueron de escasa cuantía y ni la absorción ni la retención de calcio llegaron a variar en función del calentamiento aplicado.

En conjunto, estas eficacias de utilización digestiva, metabólica y nutritiva son elevadas, lo que debe relacionarse con la etapa de lactación en que se encontraban estos animales, que implica unas necesidades incrementadas de todos los nutrientes. Kunz y Lönnerdal (1990) indicaron que ratas lactantes de 14 días absorbían el 89% del calcio administrado en forma de leche humana o leche de vaca y en torno al 93% cuando procedía de fórmula infantil, porcentajes muy parecidos a los de nuestro trabajo.

Coincidiendo con los datos de retención cálcica, los animales que tomaron fórmula infantil calentada por uno u otro procedimiento tenían un contenido corporal y concentración de calcio similar al de los que tomaron la fórmula sin calentar (tabla 27). No obstante, a diferencia de lo hallado mediante la técnica de balance, no se observaron diferencias significativas en el contenido corporal debido al tipo de fórmula. Solamente aparecieron diferencias en la concentración corporal de calcio, que fue superior en los grupos que tomaron la fórmula líquida frente a la fórmula en polvo debido fundamentalmente a su menor peso (tabla 27). Ello ha podido suceder por la necesidad de mantener el esqueleto aunque los animales fueran de peso relativamente bajo, de hecho, la concentración corporal de fósforo, elemento relacionado con el calcio en la constitución del esqueleto, también estaba elevada en esos animales (Garner y col. 1995).

mg/periodo



%

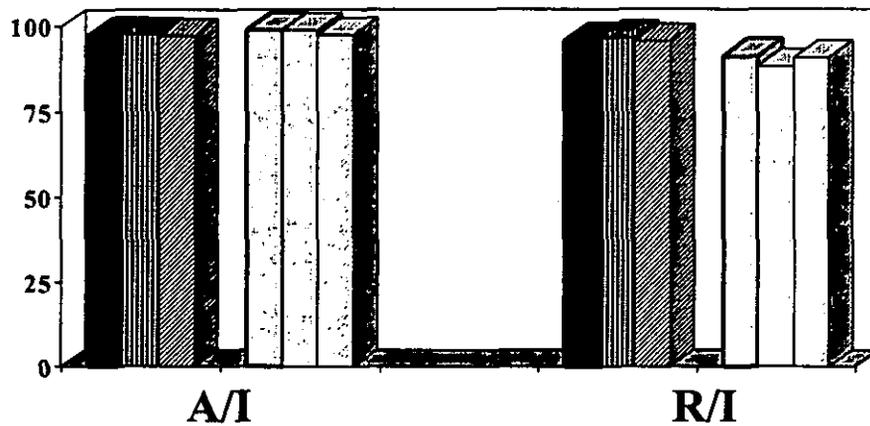


Figura 15. Utilización digestiva y nutritiva de calcio

Ratas alimentadas con fórmulas infantiles: en polvo, sin calentar ■ y calentada al baño María ▣ o por microondas ▤ y líquida, sin calentar □ y calentada al baño María ◻ o por microondas ◻

4.2.3. Biodisponibilidad del fósforo

4.2.3.1. Ensayos in vitro

Los resultados de la disponibilidad in vitro de fósforo, y del resto de los elementos que se comentarán posteriormente, se presentan de forma combinada uniendo los datos de 1h, 2h y 3h, ya que la influencia del tiempo de digestión no fue significativa (tabla 20). Esto también ha sido observado para este micronutriente por otros autores (Aguirre, 1995).

En principio puede decirse que las diferencias en la distribución del fósforo durante la digestión in vitro son debidas a la cantidad de grasa: la leche descremada en comparación con la entera, permite una mayor formación de fósforo soluble no dializado y menor precipitado, aunque en las muestras no calentadas las diferencias no llegaron al nivel de significación estadística. Esto concuerda con lo descrito previamente por Aguirre, 1995, quien al ensayar dietas con un contenido de grasa de un 8% y un 2% obtuvo que la dieta con más grasa dio lugar a mayor proporción de fósforo precipitado y una cierta disminución del no dializado soluble.

Estos resultados recuerdan a lo ya descrito en el caso de la disponibilidad in vitro del calcio, que cuando procedía de leche descremada se solubilizaba mucho mejor manifestándose claramente en las fracciones dializada y precipitada. También se observa que las formas solubles de fósforo se incrementan con este tipo de leche respecto a la entera, aunque en este caso se trata de compuestos de mayor peso molecular que no dializan y además las diferencias no son tan marcadas como en el calcio (tablas 15-17).

En las fórmulas infantiles la distribución del fósforo en las distintas fracciones se vio afectada por el tipo de fórmula y por el calentamiento. La comparación de las dos fórmulas sin calentar revela que la diálisis se estimuló con la fórmula líquida y al mismo tiempo se redujo ligeramente el precipitado, sin existir modificaciones significativas en el no dializado soluble. Además, esta fórmula líquida sin tratar favoreció la disponibilidad in vitro del fósforo respecto a los dos tipos de leche de vaca, lo que se observa en las fracciones del dializado y precipitado (tabla 20).

El contenido de fósforo de los preparados para lactantes utilizados en este estudio es mucho más bajo (0.3 mg/ml) que el de la leche de vaca (1.2 mg/ml) (tabla 2), siendo el primer valor mucho más parecido al de la leche de mujer (0.14 mg/ml). Estos datos están en el rango de los indicados por Roig (1997), tanto para la leche de vaca, de mujer así como para las fórmulas infantiles. En la figura 2 se indica la cantidad de fósforo dializada, no dializada y precipitada por 100 ml de leche de vaca o fórmula infantil. Debido a que la leche de vaca contiene aproximadamente tres veces más fósforo que la fórmula infantil empleada (tablas 1 y 2), la cantidad de fósforo en cada una de estas fracciones, según esta expresión, resulta también tres veces superior con la leche de vaca independientemente de su contenido graso, ya que las diferencias en los valores porcentuales (tabla 20) fueron mucho más pequeñas.

El calentamiento de la leche entera, tanto al baño María como por Microondas, produjo una elevación del fósforo dializado y una disminución del no dializado soluble, permaneciendo prácticamente invariable el precipitado (tabla 20). En la leche descremada ambos calentamientos originan una elevación del no dializado soluble, mientras que las otras dos fracciones tienden a disminuir de forma más significativa el precipitado. El calentamiento al baño María de la fórmula infantil líquida, pero no el de la fórmula en polvo, incrementó el fósforo dializado y precipitado y disminuyó la fracción soluble no dializada.

El porcentaje de fósforo precipitado es muy bajo tanto en la leche de vaca como en los preparados para lactantes y tan solo se observó una disminución de esta fracción por efecto del calentamiento en el caso de la leche de vaca descremada y un ligero incremento en el caso del calentamiento al baño María de la fórmula líquida.

En la leche de vaca un 20% del fósforo está en forma de fosfato orgánico esterificado unido a la caseína, estando el resto como fosfato inorgánico (Jenness, 1974) del cual un 56% es soluble, principalmente está en forma de iones fosfato libre (Holt, 1985). Por su parte, en la leche materna, el 23% del fósforo está unido a proteínas (Harzer y col., 1986b), un 15% está en forma inorgánica y el resto unido a lípidos (Renner, 1983). Se ha indicado que al realizar un calentamiento moderado de la leche (55-60°C) se puede producir una integración del fosfato cálcico en suspensión en las micelas de fosfocaseinato; aunque este proceso es parcialmente

Figura 2. Valores absolutos de P

mg/100 ml

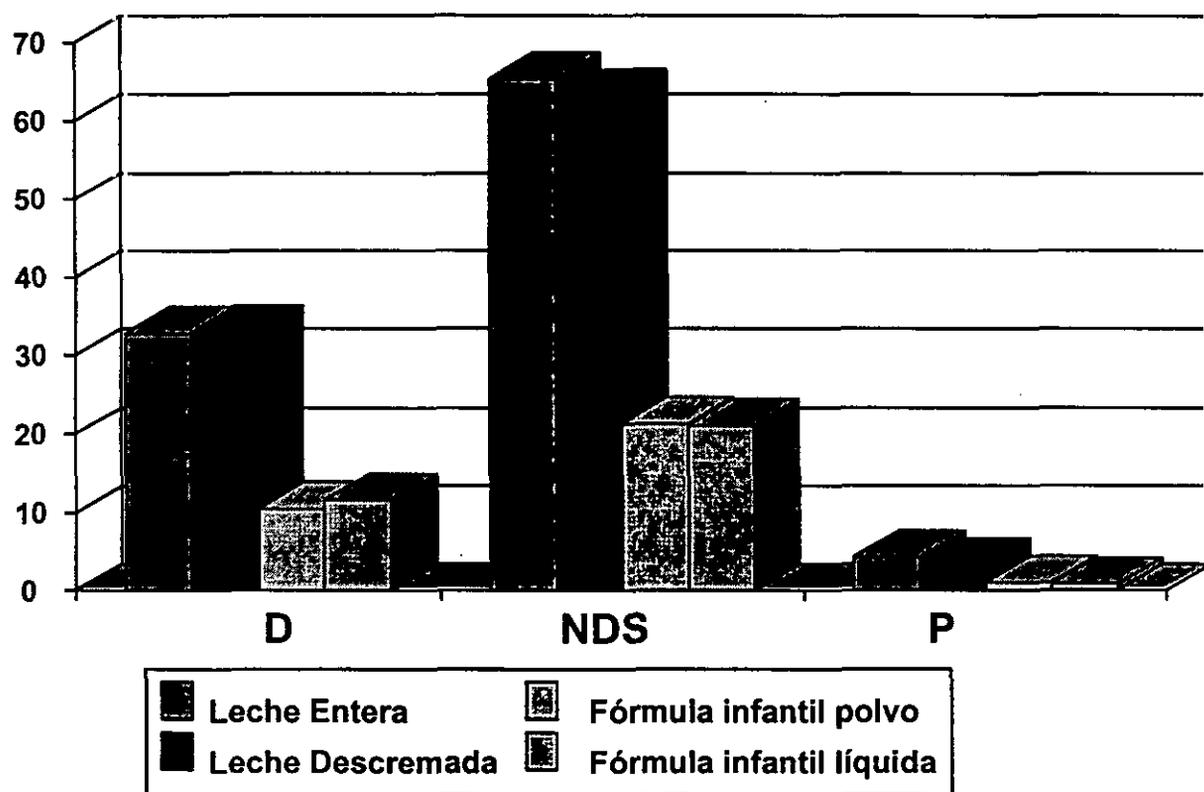
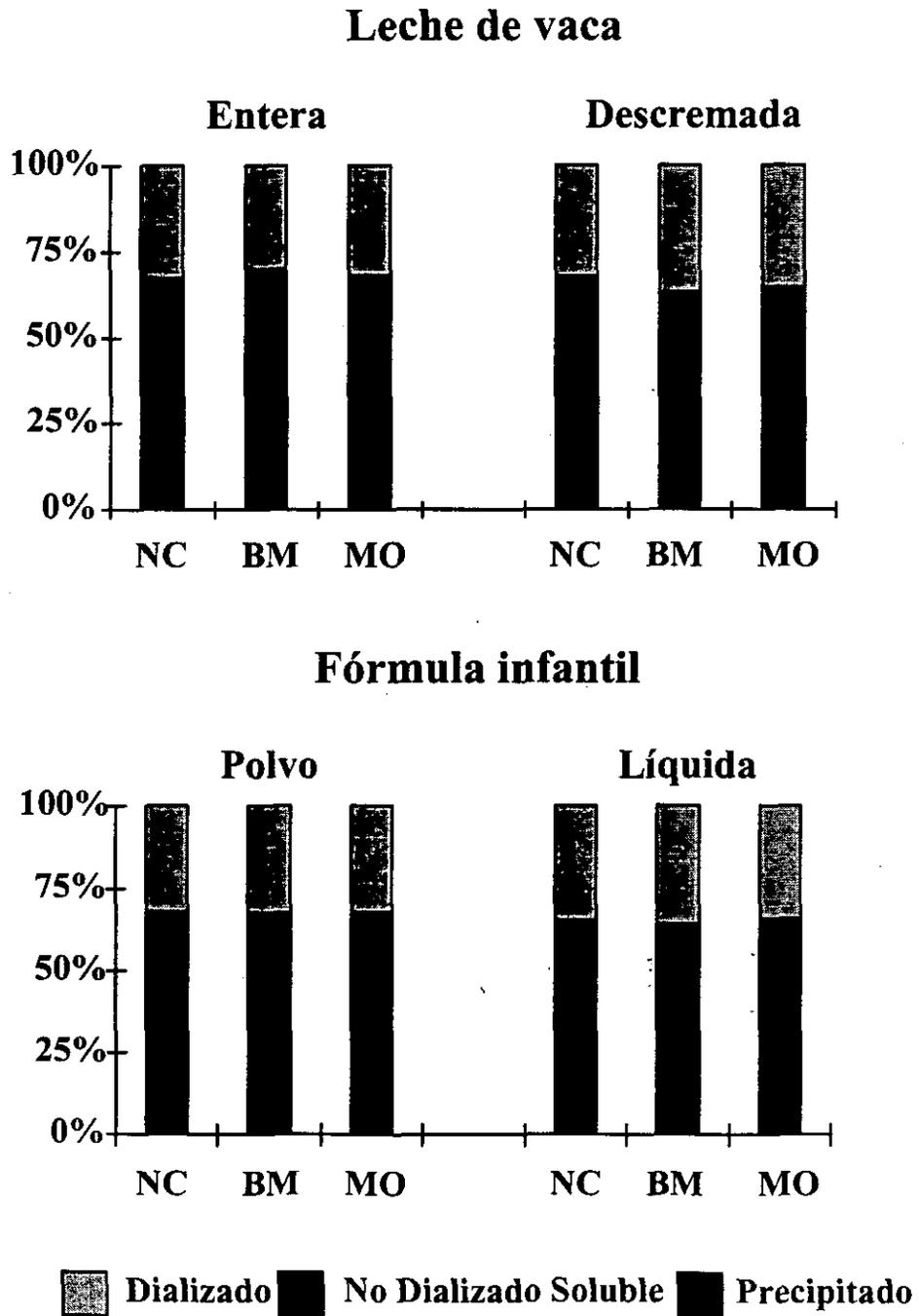


Figura 16. Distribución de fósforo tras la digestión in vitro



reversible, podría explicar la elevación del fósforo no dializado soluble en el caso de la leche de vaca descremada. (Kannann y Jenness, 1961). Además, probablemente se trata de una forma biodisponible; ya que se ha señalado que la absorción de calcio en forma de fosfocaseinato es elevada y posiblemente también la del fósforo (Hazell, 1985), es decir, ese fósforo no dializado soluble tendría la capacidad de absorberse in vivo.

4.2.3.2. Ensayos in vivo

La ingesta de fósforo no mostró diferencias entre los tres grupos que tomaron leche de vaca sin tratar o tratada al baño María o por microondas (tabla 21). No obstante, ambos calentamientos produjeron una elevación de la utilización digestiva y metabólica del fósforo, lo que también se detectó en la utilización nutritiva, particularmente cuando se calentó la leche al baño María. Ese aumento de la eficacia de absorción podría relacionarse con el incremento de fósforo dializado, que se observó al estudiar la digestibilidad in vitro de la leche de vaca entera calentada al baño María o por microondas. Sin embargo, no se llegó a alterar ni la absorción ni la retención del elemento, como tampoco se modificaron los contenidos corporales de fósforo al final del experimento (tabla 26).

Las ratas que consumieron la fórmula líquida ingirieron significativamente menos alimento que las que tomaron la fórmula en polvo (tabla 22), por lo que la absorción y retención de fósforo fue también más baja. Pero además, la digestibilidad del nutriente fue menor en los grupos que tomaron la fórmula líquida sin calentar y tratada al microondas respecto a los correspondientes de fórmula en polvo. Sin embargo no se apreciaron diferencias debidas al tipo de fórmula en los coeficientes de utilización metabólica y utilización nutritiva.

Con respecto a los efectos debidos al tratamiento térmico de estos preparados para lactantes, ni el baño María ni el microondas indujeron modificaciones en la ingesta, absorción ni retención del mineral. Sin embargo, la utilización digestiva tendió a disminuir en los animales que tomaron las fórmulas sometidas a tratamiento térmico, a excepción de los que tomaron la fórmula líquida tratada al baño María . Tanto en la fórmula líquida como en la fórmula en polvo

la utilización metabólica y nutritiva fueron más bajas en los grupos que consumieron las formas calentadas al baño María o por microondas.

El contenido de fósforo de los animales al final del experimento, no varió significativamente en función del tipo de fórmula ni del calentamiento (tabla 27). En principio ello contrasta con el menor balance del mineral de las ratas que tomaron la fórmula líquida respecto a la fórmula en polvo, aunque parece que la tendencia se mantiene cuando se contemplan los grupos que bebieron fórmulas calentadas, aunque sin llegar al nivel de significación estadística a través del test de ANOVA de dos vías aplicado. Por su parte la concentración de fósforo sí se vio afectada por el tipo de fórmula consumida; fue mayor en las ratas que ingirieron la fórmula líquida, lo que ya se ha descrito para el calcio y se relacionaría con la participación de ambos minerales en la constitución del esqueleto. En distintas situaciones de nutrición deficitaria se ha encontrado que determinados tejidos se salvaguardan en la medida de lo posible, entre ellos el cerebro, el hígado, el esqueleto, y que una deficiencia en el crecimiento suele ir asociada con cambios en la concentración de elementos en los distintos tejidos (Vaquero y Navarro, 1993).

La cantidad de fósforo presente en los cuerpos de los animales que tomaron las fórmulas infantiles no varió por el calentamiento, aunque se observaron ciertos cambios en el contenido relativo de fósforo, que estuvieron al borde de la significación estadística en el caso de la fórmula líquida ($p=0.05$) y tuvieron mayor significación por el calentamiento al baño María de la fórmula en polvo que supuso un incremento en las concentraciones corporales de fósforo (tabla 27).

En resumen, podríamos indicar que el tipo de alimento fue el condicionante más importante de la utilización nutritiva del fósforo. Esta fue mucho más adecuada en las ratas que bebieron leche de vaca frente las fórmulas infantiles, y de ellas superior con la forma en polvo. Sin embargo, el calentamiento favoreció la utilización nutritiva del mineral en el caso de la leche de vaca y la disminuyó cuando se trató de las fórmulas infantiles, pero en ningún grupo se alteró ni la absorción ni la retención corporal de fósforo.

4.2.4. Biodisponibilidad del magnesio

4.2.4.1. Ensayos in vitro

El comportamiento del magnesio durante la digestión in vitro de las distintas muestras estaba modulado por el tipo de leche o fórmula infantil, el calentamiento e incluso la interacción de ambas variables (tablas 23). Los valores obtenidos en el presente trabajo son del orden de los descritos en otros trabajos para leche descremada (Aguirre, 1995) así como para distintas fórmulas infantiles, leche humana y leche de vaca en las que se estudió el magnesio soluble e insoluble tras una digestión in vitro que difiere en algunos aspectos de la aplicada en nuestro estudio (Lönnerdal y col., 1993).

Al digerir la leche descremada, se produce menor magnesio precipitado que al utilizar las otras muestras, lo que se asocia con la mayor proporción de magnesio no dializado pero soluble, ya que el dializado en todo caso tendió a ser menor con este tipo de leche. La influencia negativa de la grasa en la biodisponibilidad in vitro de este elemento ya se ha indicado en otros estudios realizados con dietas completas que únicamente diferían en la cantidad de grasa; las dietas hipograsas favorecían la formación de magnesio no dializado soluble e impedían la precipitación del mineral (Aguirre, 1995).

Se observaron también ciertas diferencias significativas en el resto de las muestras pero éstas fueron de menor magnitud que las que se produjeron respecto a la leche descremada: el magnesio precipitado durante la digestión de la fórmula infantil líquida se situó en valores intermedios entre los de la leche de vaca descremada y aquellos de la leche de vaca entera y la fórmula en polvo, que presentaron los valores más altos y sin diferencias significativas entre sí. También el magnesio soluble no dializado de la fórmula líquida se situó entre el de la leche descremada, que fue superior, y los correspondientes a la leche de vaca entera y fórmula en polvo (tabla 23). Estos resultados recuerdan los obtenidos para otros elementos, calcio y magnesio, cuya solubilidad se incrementaba con la leche de vaca de menor contenido de grasa y

Figura 18. Distribución de magnesio tras la digestión in vitro

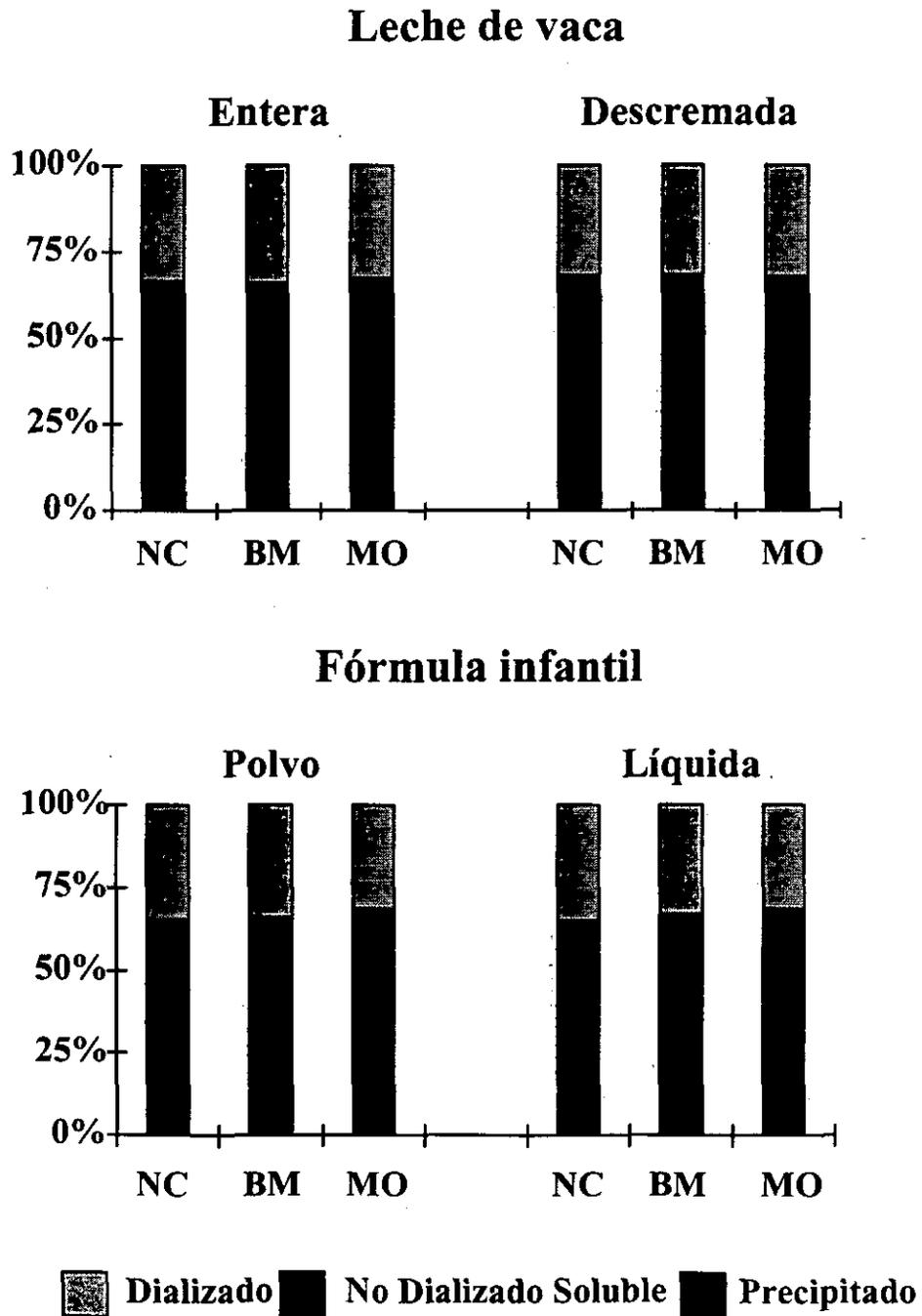
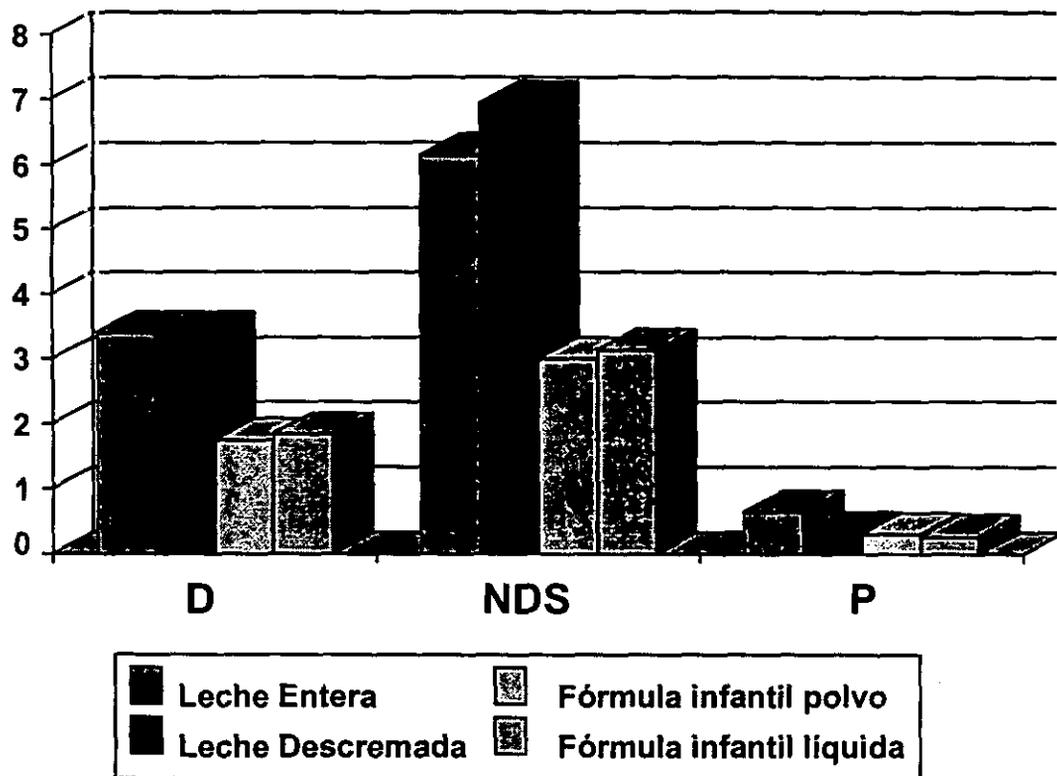


Figura 3. Valores absolutos de Mg

mg/100 ml



con el preparado en forma líquida, lo que parece relacionarse con las características fisico-químicas del alimento que se digiere por este sistema in vitro.

Cabe destacar que la cantidad de magnesio que queda insoluble después de la actuación de los enzimas digestivos es muy pequeña, entre el 2 y el 7%, porque ya en la leche de partida, antes de someterla al proceso de digestión *in vitro*, aproximadamente el 65% del magnesio es soluble y está en la fracción desnatada (40% como citrato magnésico, 7% como fosfato magnésico y un 16% está libre en forma de ion), estando el resto unido a la caseína en una suspensión coloidal (Fransson y Lönnerdal, 1983; Hazell, 1985; Lönnerdal y col., 1993); y lógicamente la digestión ha supuesto un incremento de la solubilidad y una disminución del precipitado. Los resultados de nuestro trabajo concuerdan por tanto con los de Lönnerdal y col. (1993), que obtuvieron en distintos tipos de leche, incluyendo fórmulas infantiles, una insolubilidad del magnesio entre el 35% y el 4%, que después de la digestión con pepsina y pancreatina se redujo a un intervalo de 8 a 2%.

La leche de vaca contiene aproximadamente el doble de magnesio que las fórmulas: 10.4 frente a 5.1 mg/ml, respectivamente, según datos analíticos de esta tesis (tabla 1 y 2). En la figura 3 se puede observar que esta diferencia se mantiene en las distintas fracciones resultantes de la digestión *in vitro*, se obtuvo una cantidad de fósforo dializado doble con la leche de vaca respecto a las fórmulas; también el no dializado soluble guarda esta proporción aunque en el caso de la leche descremada es algo mayor. El precipitado es pequeño en todos los casos pero cabe destacar que en la leche de vaca entera duplica al resto de las muestras.

El calentamiento de la leche de vaca entera (tabla 23), independientemente de la forma de realizarlo, no modificó el magnesio en ninguna de las tres fracciones estudiadas. Tampoco se alteró la porción del elemento dializado y no dializado soluble de la leche de vaca descremada calentada por cualquiera de los dos procedimientos. No obstante, al calentar este tipo de leche disminuyó el magnesio precipitado, aunque sin diferencias significativas con el control cuando se realizó por microondas. Esta modalidad de calentamiento aplicada a las dos fórmulas infantiles originó un descenso del magnesio dializado y simultáneamente una elevación del no dializado soluble. El calentamiento convencional de la fórmula líquida también tendió a reducir el dializado e incrementar el no dializado soluble, cambios que se produjeron sin diferencias

significativas respecto al control no calentado pero se asociaron a un descenso del magnesio precipitado. Además podría apuntarse que el calentamiento por microondas de las fórmulas infantiles ejerció un efecto más marcado sobre el magnesio soluble, incrementando el de mayor peso molecular y disminuyendo el que es capaz de dializar.

Aunque se carece de datos referidos a efectos del calentamiento moderado de leche sobre la biodisponibilidad in vitro de magnesio, Aspe (1992) dirigió, por el mismo método empleado en nuestro trabajo, dietas que contenían como única variable caseína sin tratar o calentada a 150°C y también obtuvo que el tratamiento térmico incrementaba el magnesio no dializado soluble a la vez que disminuía las fracciones de dializado y precipitado.

4.2.4.2. Ensayos in vivo

Como corresponde a los cambios descritos del consumo alimentario, las ratas alimentadas con la leche de vaca sin calentar o sometida a calentamiento ingirieron una cantidad de magnesio similar. La absorción y retención del elemento tampoco se afectó. El único parámetro que mostró variaciones fue la digestibilidad, que se elevó en los grupos que tomaron la leche de vaca tratada al baño María o con microondas (Tabla 24). No es de extrañar que las variaciones hayan sido mínimas, y ni siquiera se detectaran en la composición corporal (tabla 26), ya que tampoco en los ensayos in vitro se apreciaron influencias debidas al calentamiento de este tipo de leche (tabla 23).

Al igual que se ha indicado para la ingesta de alimento (tabla 10) y los balances calcio y fósforo (tablas 19 y 22), el magnesio ingerido por las ratas alimentadas con la fórmula líquida fue inferior respecto a las que tomaron la fórmula en polvo (tabla 25). Por ello, también fueron menores las cantidades de Magnesio absorbidas y retenidas. Además, la digestibilidad fue menor en el grupo de animales que consumió la fórmula líquida sin tratar respecto al de la fórmula en polvo no tratada. No obstante, por el calentamiento dicha digestibilidad se alteró de forma diferente en una u otra fórmula infantil. En la utilización metabólica y nutritiva no se manifestaron diferencias debidas al tipo de fórmula.

Diversos enfoques en estudios realizados con isótopos, han encontrado valores absorción de magnesio de leche humana y fórmulas infantiles del mismo orden de los nuestros (Schuette y Ziegler, 1990) o algo superiores, entre el 80 y el 82% (Liu y col., 1989). En este último rango se situarían la absorción de magnesio de nuestros valores para la leche de vaca o serían incluso mayores. Lönnerdal y col., 1993, estudiaron la posible influencia del tipo de leche o fórmula, con marcaje radioactivo y encontraron que la capacidad de retención de magnesio era similar con leche de vaca, leche humana y una variedad de nueve fórmulas infantiles, aunque el valor referido como porcentaje de la dosis era algo superior al %R/I encontrado en nuestros ensayos. En niños a término y pretérmino se ha hallado mediante técnicas de balance una absorción de magnesio del 55 al 75% (Slater y col., 1961; Strome y col., 1969; Schanler y col., 1985), valores que están dentro del mismo rango que los obtenidos con ratas (Lönnerdal y col 1993).

La diferencia entre los efectos del consumo de leche de vaca y de fórmulas se aprecia no solamente en la cantidad de magnesio ingerida, sino también en la digestibilidad y utilización metabólica (tablas 24 y 25). Por un lado se ha indicado que las ratas de esta edad tienen una capacidad limitada para absorber magnesio y otros elementos mediante transporte activo debido a la inmadurez de su aparato digestivo (Ghishan y col., 1980; Lönnerdal, 1989; Lönnerdal y col., 1993), pero estos ensayos se han realizado al final de la lactación y es posible, como sugerimos al discutir los resultados de la biodisponibilidad de calcio, que este mecanismo pudiera haber tenido cierta relevancia. En este sentido, en un estudio en personas adultas se obtuvo que el porcentaje de absorción real de magnesio era inversamente proporcional a su ingesta, así fue del 75% cuando ésta era de 23 mg/día, del 44% cuando era de 240 mg/día y del 24% cuando era de 1.764 mg/día (Graham y col, 1960), lo que se explica por los sistemas de transporte de magnesio: activo, que se satura a bajas concentraciones lumbales del mineral, y de difusión que

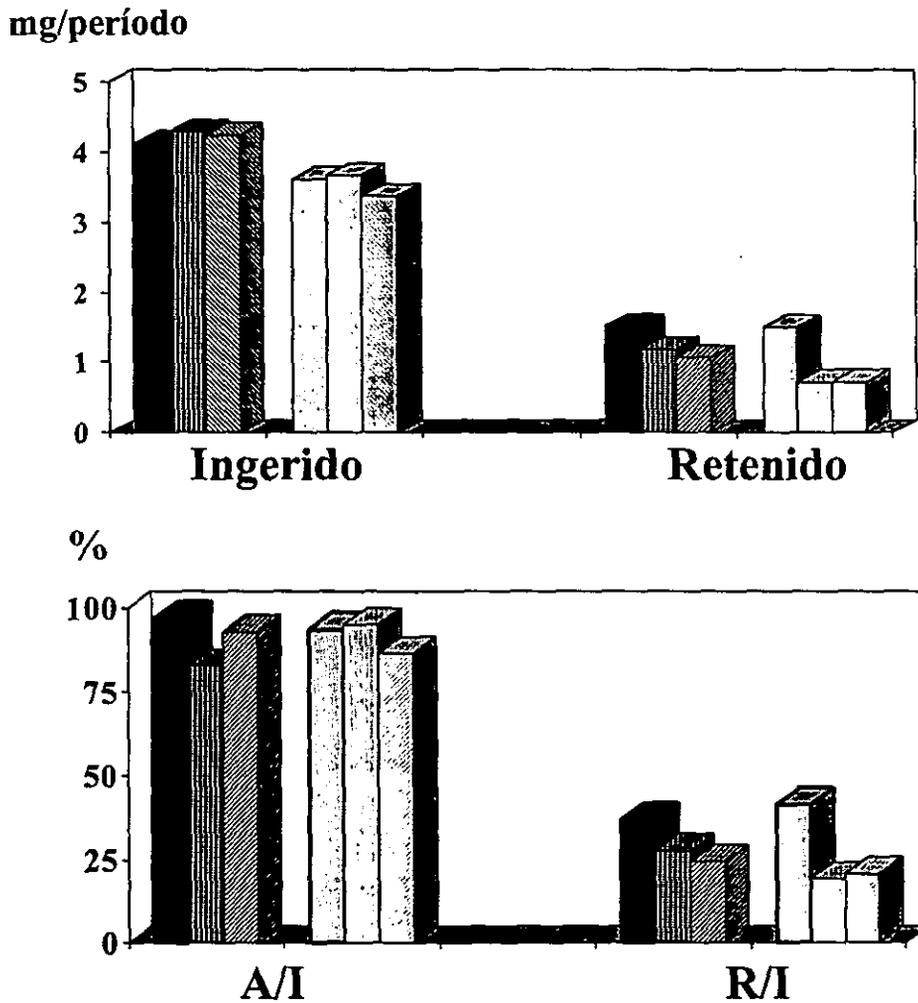


Figura 19. Utilización digestiva y nutritiva de magnesio

Ratas alimentadas con fórmulas infantiles: en polvo, sin calentar ■ y calentada al baño María ▒ o por microondas ▨ y líquida, sin calentar □ y calentada al baño María ◻ o por microondas ◻

actúa cuando las concentraciones son más altas (Shiles, 1984). Además, se ha indicado que existe un paralelismo entre los mecanismos de transporte de magnesio en ratas y humanos (Meneely et al., 1982); la mayoría del magnesio se absorbe en el ileon y el colon, mediante difusión pasiva, transporte activo y arrastre por solvente (Hardwick y col. 1991).

Por todo ello, es factible en nuestros ensayos con ratas lactantes alimentadas con leche de vaca y fórmulas infantiles, que la mayor ingesta de magnesio en las primeras se asociara con una utilización digestiva algo inferior respecto a las segundas. Sin embargo, si comparamos el comportamiento de los animales que tomaron el preparado líquido frente al polvo, éstos no fueron capaces de absorber el magnesio más eficazmente, aunque sí consiguieron absorber algo mejor el calcio como se ha comentado anteriormente. No disponemos de una razón clara que explique tal resultado. Sin embargo, es cierto que las cantidades de magnesio ingeridas por las ratas que tomaron leche de vaca fueron aproximadamente tres veces superiores respecto a las que tomaron fórmulas infantiles, pero el consumo del preparado infantil en una u otra forma comercial no influyó tanto en este parámetro. Además, la absorción del magnesio no está sujeta a un control homeostático tan estricto como la del calcio, porque también se regula a nivel metabólico, modificando sus pérdidas urinarias (Linder, 1988b). Por último cabe pensar que el distinto tratamiento térmico utilizado en la elaboración de la fórmula en polvo y la líquida haya afectado de manera desigual a las digestibilidades del calcio y del magnesio.

Aunque la digestibilidad del magnesio tendió a disminuir por el consumo de leche de vaca, dicho régimen de alimentación supuso una mayor utilización nutritiva del elemento en comparación con la alimentación de estos animales con fórmulas infantiles. La causa de ello estuvo en la elevación de la utilización metabólica cuando se trató de leche de vaca, lo que nuevamente habría que relacionarlo con la capacidad de regular la homeostasis de este elemento a través de su transporte renal.

La influencia del calentamiento doméstico aplicado a las fórmulas infantiles se manifestó en la absorción, el balance y los coeficientes que cuantifican la utilización digestiva, metabólica y nutritiva (tabla 25). Se produjeron descensos en la eficacia de absorción del mineral, particularmente en los grupos alimentados con la fórmula en polvo tratada al baño María y la líquida al microondas, lo que condicionó absorciones significativamente inferiores respecto a sus correspondientes controles. Pero además, la utilización metabólica disminuyó por ambos calentamientos y en los dos preparados, aunque sin diferencias significativas entre la fórmula en

polvo tratada al microondas y sin tratar, de forma que el balance del mineral tendió a reducirse por el tratamiento térmico, aunque las diferencias debidas al calentamiento al baño María de la fórmula en polvo no fueron significativas respecto a la no calentada. Por último, la utilización nutritiva, que engloba la influencia tanto a nivel digestivo como metabólico, muestra que en las dos formas de preparado el calentamiento doméstico ejerció un efecto negativo, que no varió en función de que éste fuera convencional o por microondas.

El contenido corporal de magnesio al final del experimento fue menor en las ratas alimentadas con la fórmula infantil líquida respecto a la equivalente en polvo (tabla 27), coincidiendo con los resultados del balance. Sin embargo, la concentración del mineral en el cuerpo no se alteró, en contraste con los incrementos relativos de calcio y fósforo ya comentados, lo que se interpretaría porque estos dos minerales son constituyentes fundamentales del hueso mientras que el magnesio, aunque también participa en la estructura ósea, está presente en una mayor cantidad en otros tejidos, como es el músculo (Schaafsma, 1997).

En los análisis de composición corporal no se apreció ninguna influencia negativa del consumo de los preparados para lactantes previamente sometidos a calentamiento por microondas o al baño María, y estos resultados estarían apoyados por los del ensayo in vitro. Sin embargo, el balance de magnesio disminuyó en los grupos alimentados con las fórmulas tratadas previamente al baño María o con microondas, algo que también se apuntó con menor intensidad en el calcio y el fósforo, y aunque las diferencias fueron significativas, especialmente para la fórmula líquida, se trataba de retenciones de tan solo 1.5 y 0.7 mg de magnesio en los 6 días que duró el período experimental, diferencia que no se detectó cuando se determinó el contenido total de magnesio en el cuerpo, que fue aproximadamente 10 veces superior.

4.2.5. Biodisponibilidad del hierro

4.2.5.1. Ensayos in vitro

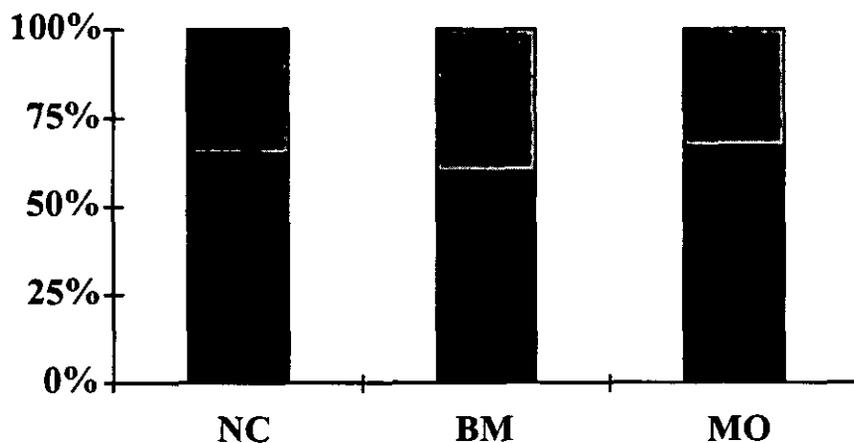
Los valores del porcentaje de hierro en cada una de las fracciones obtenidas tras la digestión in vitro son del mismo orden que los descritos en trabajos anteriores de nuestro grupo (Aguirre, 1995), aunque quizá el no dializado soluble ha resultado mayor en nuestro estudio (tabla 28).

El estudio de la disponibilidad in vitro del hierro de la leche de vaca entera no queda reflejado la tabla 28, ya que existió gran variabilidad y las recuperaciones fueron altas, en algunos casos superiores al 150%. Sin embargo, la leche de vaca descremada, que se digirió simultáneamente con la leche entera, y que tenía un contenido de hierro también relativamente bajo (tabla 1), como es bien conocido (Hazell, 1985; Wharf y col., 1997) y similar al de ella, tuvo un comportamiento durante la digestión in vitro parecido al de otros tipos de leches, y los resultados correspondientes sí se reflejan en la tabla.

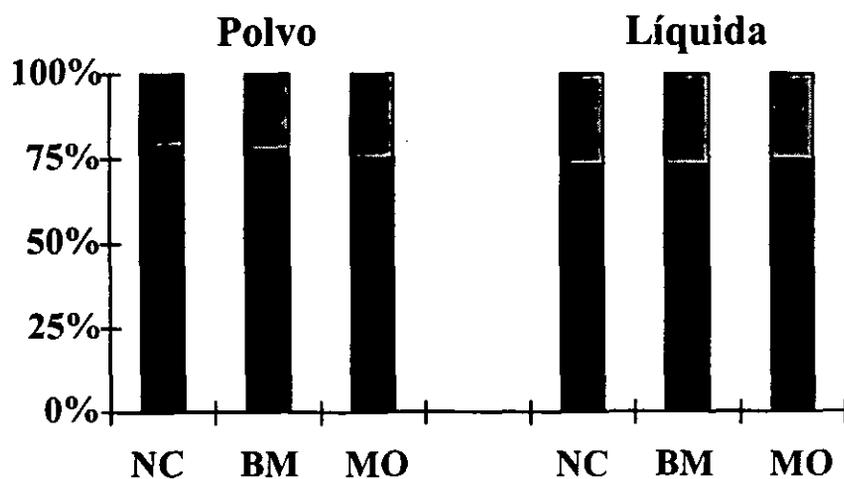
En este sentido, se sabe que aproximadamente el 14% del hierro de la leche está en la fracción de grasa (Fransson y Lönnnerdal, 1983; Lönnnerdal, 1985), asociado a la membrana de los glóbulos grasos; aproximadamente un 24% está unido a la caseína (Fransson y Lönnnerdal, 1983), probablemente a través de residuos de fosfoserina de la caseína, mientras que un 29% está unido a proteínas séricas y un 32% está asociado con una fracción de bajo peso molecular. Además la grasa saturada, típica de la leche, actúa interfiriendo la disponibilidad del hierro, tanto in vitro (Aguirre, 1995) como in vivo (Lukaski y col., 1982; Pérez-Granados, 1997) por lo que esta influencia negativa unida al hecho de que la leche constituye una fuente escasa del metal, rica en inhibidores de la absorción de hierro como son el calcio y la caseína (Hurrell, 1997), ha podido dar lugar a ese comportamiento irregular del elemento y a la imposibilidad de detectar con suficiente sensibilidad los cambios debidos al calentamiento.

Figura 20. Distribución de hierro tras la digestión in vitro

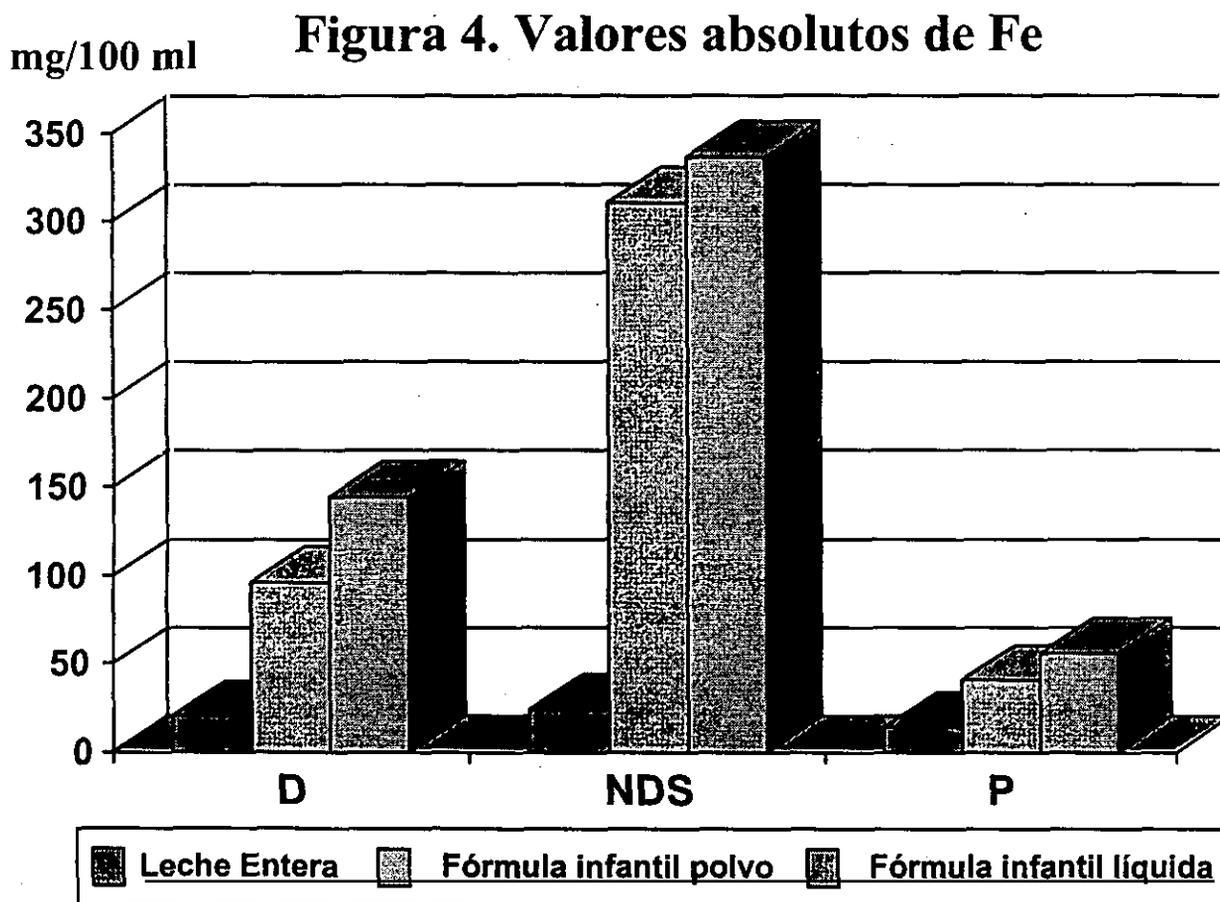
Leche de vaca descremada



Fórmula infantil



Dializado
 No Dializado Soluble
 Precipitado



Por lo que se refiere a la disponibilidad in vitro del hierro de la leche de vaca descremada y de las fórmulas infantiles, se observa claramente que con la leche descremada se producía mayor proporción de hierro dializado y precipitado y menor no dializado soluble respecto a las fórmulas (tabla 28), y esas diferencias en todos los casos fueron significativas. Al comparar las fórmulas entre sí se observó que la diálisis del hierro se favorecía con la fórmula líquida, y a la

vez disminuía el no dializado soluble, aunque sin diferencias significativas entre las dos fórmulas calentadas al microondas (tabla 28).

En la leche humana un 33% del hierro total está asociado a la fracción lipídica (Fransson y Lönnnerdal, 1980); otra parte importante, aproximadamente un 32%, pertenece a una fracción de bajo peso molecular que aún no ha sido bien caracterizada (Lönnnerdal, 1984) y tan sólo un 9% está unido a la caseína (Fransson y Lönnnerdal, 1983), lógicamente esta distribución del hierro y el mantenimiento de su función se presenta como el ideal en el diseño de las fórmulas infantiles.

Respecto a este tema, diversos estudios tratan la asociación del hierro a distintos nutrientes en las fórmulas infantiles. Algunos datos procedentes de estudios *in vitro* indican que cuando se suplementada la leche adaptada con hierro, este se liga a un componente u otro en función de la sal utilizada, en concreto el sulfato ferroso dona menos hierro a la caseína que otros tipos de suplementos (Hegenauer y col., 1979). La unión del hierro a la lactoferrina sérica, tan relevante en la leche materna (Davidson y Lönnnerdal, 1988), cuando se intenta reproducir suplementando las fórmulas con esta proteína no da siempre un claro efecto positivo sobre la absorción de hierro (Fairweather-Tait y col. 1987; Schulz-Lell y col. 1991; Davidson y col., 1994). Hurrell y col., (1989) indican que la caseína y las proteínas séricas de la leche de vaca deprimen la absorción de hierro, lo que también fue corroborado por otros autores a través del método *in vitro* de biodisponibilidad; encontrando que la diálisis más se favorecía cuando las fórmulas contenían proteínas hidrolizadas (Alegria y col., 1997)

El incremento en la diálisis del hierro con la leche de vaca descremada, respecto a las fórmulas infantiles (tabla 28), ya se ha descrito para el calcio (tabla 15), y se atribuyó a su bajo contenido de grasa. Pero, por otra parte, la precipitación del hierro fue mucho mayor con la leche descremada que con las fórmulas. Sobre ello, podemos indicar que la caseína, proteína mayoritaria en la leche de vaca y que está presente en las fórmulas infantiles junto con proteínas séricas en una proporción 60:40, es un potente inhibidor de la absorción de hierro, como lo demuestran distintos estudios *in vitro*, (Aspe, 1992), en ratas y en humanos (Hegenauer y col.,

1979; Lönnerdal, 1990). Dicho efecto de la proteína láctea revierte en gran medida cuando se hidroliza previamente (Hurrell, 1989; 1990; Alegría y col., 1997). En realidad la leche de vaca como ya se ha mencionado, incide negativamente en la biodisponibilidad del hierro, por su alto contenido de caseína (Hurrell y col., 1989) y también por su alto aporte de calcio (Hurrell, 1997), y como presenta un contenido muy bajo de hierro, no se recomienda para niños con una edad inferior a 12 meses (Ziegler, 1989; Dallman, 1990; Fomon, 1995; Wharf y col., 1997).

En la figura 4 se muestra, teniendo en cuenta el contenido férrico en cada uno de los tipos de leche ensayados, la existencia de grandes diferencias, en la cantidad de hierro disponible cuando se parte de un volumen dado de leche descremada o fórmula infantil en sus distintas presentaciones. Se produjeron diferencias altamente significativas entre los tres tipos, y tanto en las fracciones de hierro no dializado como en el dializado. Por lo tanto, aunque el hierro de la leche de vaca descremada tenía gran facilidad para dializar, en valor absoluto, esa diálisis representa una cantidad muy pequeña del nutriente en comparación con las fórmulas, que tienen un contenido férrico prácticamente 10 veces superior (tabla 1 y 2); y lo mismo sucede con el no dializado soluble. Por lo que se refiere a las dos fórmulas, la líquida, que fue la que más facilitó la diálisis del elemento, también contenía mayor cantidad, con un valor medio de 535.5 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ frente a 446.31 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ de la fórmula en polvo, y en consecuencia, la expresión de hierro en cada una de las tres fracciones por 100 ml de fórmula infantil manifiesta aún más las diferencias encontradas en el porcentaje de hierro de cada una de las tres fracciones de la digestión in vitro. Por ello, aunque no se observaron diferencias significativas en el hierro precipitado, entre las dos fórmulas no calentadas, sí que se produce un incremento significativo de la cantidad de hierro precipitado procedente de 100 ml de leche.

El calentamiento tradicional al baño María de la leche de vaca descremada aumentó el hierro dializado y disminuyó el precipitado. Al calentar por microondas la fórmula en polvo se favorecieron las formas dializables del

hierro, a expensas de las solubles de mayor peso molecular, y si se trataba de la fórmula líquida, que ya se caracteriza por permitir una mayor diálisis de hierro como ya se ha comentado, esta modalidad de calentamiento incrementó la fracción de hierro no dializado soluble disminuyendo simultáneamente el precipitado (tabla 28, figura 20).

4.2.5.2. Ensayos in vivo

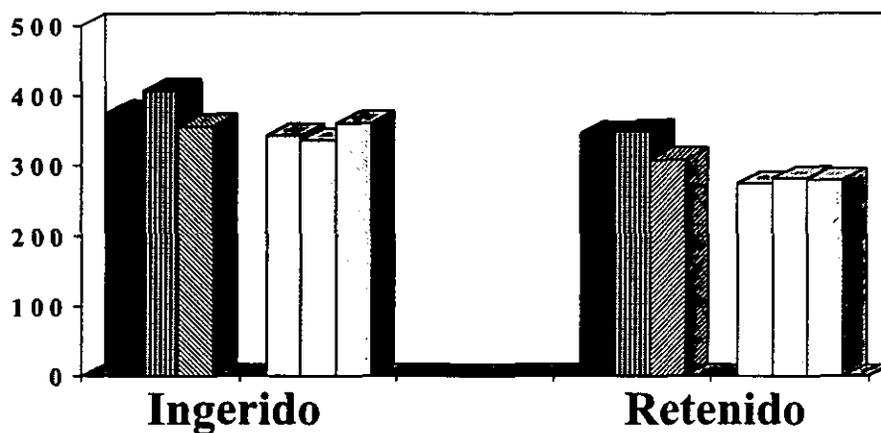
El calentamiento doméstico ensayado en la leche de vaca entera redujo el contenido corporal total de hierro, en las ratas lactantes, aunque sin llegar al nivel de significación estadística en el caso del calentamiento al baño María, así como su concentración corporal (tabla, 35). Es difícil atribuir dichos cambios a variaciones en la digestibilidad o utilización metabólica del elemento, ya que el estudio del balance mostró que la ingesta de hierro fue muy pequeña para estos animales en período de lactación y la mayor parte del hierro ingerido se eliminaba por heces, quedando la retención férrica durante todo el período por debajo de los 20 μg (datos no presentados). La ausencia de los datos correspondientes al balance en nuestro estudio sería un reflejo más de que el hierro de la leche de vaca presenta una biodisponibilidad muy pobre como se ha comentado en el apartado anterior. De hecho, considerando que el contenido de hierro corporal de ratas de 16 días es de aproximadamente 400ng (Datos analíticos no mostrados) los animales de este estudio incrementaron dicho nivel inicial pero mucho menos que los que tomaron fórmula infantil. Dicha influencia también se manifestó en la hemoglobina ni en el hematocrito que en conjunto presentaron valores muy por debajo de la normalidad (Sáiz y col., 1983), por lo que podría deducirse que los tres grupos de ratas alimentadas con leche de vaca se encontraban en un estado de deficiencia de hierro, y manifestaron anemia. Ello también se deduce del estudio de los contenidos de hierro en el cuerpo en su conjunto (tablas 35 y 36) en los distintos órganos, tanto en valor absoluto como relativo, que fueron inferiores respecto a los correspondientes de los grupos con fórmula infantil (tablas 37 y 38). Esta alta vulnerabilidad de la rata lactante a la baja ingesta de hierro debe relacionarse con el contenido de este nutriente en la leche de vaca que para el período de nuestro ensayo, la tercera semana de lactación, se sitúa

la rata lactante a la baja ingesta de hierro debe relacionarse con el contenido de este nutriente en la leche de rata que para el período de nuestro ensayo, la tercera semana de lactación, se sitúa en unos 4 $\mu\text{g/ml}$ (Keen y col. 1981). La leche de vaca, con un aporte de hierro de 0.65 $\mu\text{g/ml}$ (tabla 1), por tanto constituía un alimento deficitario, mientras que los preparados para lactantes con un contenido de 4.5 $\mu\text{g/ml}$ y 5.35 $\mu\text{g/ml}$, para la fórmula en polvo y la líquida, respectivamente, aportaron una cantidad de hierro más cercana a la necesitada por la rata lactante (tabla 2).

En las ratas que tomaron los preparados para lactantes la ingesta, absorción y retención de hierro, se vieron afectadas significativamente por la forma de presentación, ya que con el preparado líquido los tres parámetros fueron inferiores. Pero además, excepto en el grupo que tomó la fórmula tratada al baño María, la digestibilidad de la fórmula líquida fue inferior a la de la fórmula en polvo (tabla 29). Cabe destacar, que en estos animales lactantes alimentados exclusivamente con fórmula infantil la capacidad de absorción fue extremadamente alta, a diferencia del estado adulto y coincidiendo con otros datos de la literatura (Ezekiel, 1967; Leslie y Kaldor, 1971) que indican que la rata en sus primeros 14 días de vida puede absorber casi el 100% del hierro ingerido, valor que desciende paulatinamente hasta llegar aproximadamente al 25% a los 30 días de edad. Además, la concentración de hierro de los preparados para lactantes empleados en este ensayo, fue similar a la concentración de la leche de rata, por lo que este régimen de alimentación no supondría un déficit de férrico.

La utilización metabólica del hierro fue significativamente inferior con la fórmula líquida respecto a la fórmula en polvo, es decir, una proporción superior del hierro absorbido se eliminó por orina cuando se presentaba en forma líquida. En consecuencia, no sólo la peor utilización digestiva de este alimento sino también la menos eficiente utilización metabólica, condicionaron una inferior utilización nutritiva en los tres grupos de animales que tomaron la fórmula infantil líquida (tabla 29). Se ha descrito que el calentamiento implicado en la esterilización puede provocar la aparición de determinados productos de la reacción de Maillard (Renner, 1979; Finot, 1983; Hurrell, 1994), algunos de ellos inhibiendo la absorción férrica y otros incrementando sus

$\mu\text{g}/\text{período}$



%

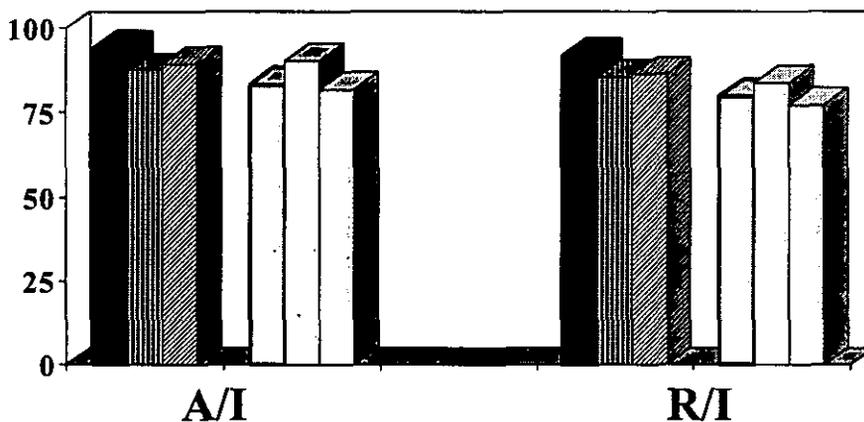


Figura 21. Utilización digestiva y nutritiva de hierro

Ratas alimentadas con fórmulas infantiles: en polvo, sin calentar ■ y calentada al baño María ▨ o por microondas ▩ y líquida, sin calentar □ y calentada al baño María □ o por microondas □

nutriente no son suficientes (Dallman, 1990; Wharf y col., 1997), colectivos vulnerables que si se alimentan durante un tiempo prolongado exclusivamente con fórmulas líquidas esterilizadas podrían ver agravados algunos de sus síntomas.

La influencia que el calentamiento doméstico ejerció en los coeficientes de utilización digestiva, metabólica y utilización nutritiva fue desigual; en la fórmula en polvo el porcentaje de absorción de hierro se redujo por el calentamiento disminuyendo también la utilización nutritiva del metal, además se produjo una disminución de la utilización metabólica en los animales que tomaron este preparado tratado al microondas (tabla 29). Sin embargo, en el caso del preparado líquido el descenso en la utilización metabólica de este elemento resultó significativo respecto al control tanto en los animales que tomaron la fórmula calentada al baño María como al microondas. La utilización nutritiva del hierro de la fórmula líquida no se afectó por el calentamiento; por el contrario se observó que el calentamiento convencional condicionó una mejor absorción relativa, con diferencias significativas en el cociente %A/I, y una elevación también significativa de la utilización nutritiva global de este elemento traza. No obstante, estas variaciones debidas al calentamiento deben considerarse moderadas, ya que ni la absorción ni la retención del nutriente se alteraron en los animales que ingirieron una u otra fórmula.

El estudio de la composición corporal férrica revela igualmente que la influencia del calentamiento fue mínima, y no se observaron diferencias significativas en ningún caso (tabla 36). Quizá podría indicarse que en los dos grupos de ratas que tomaron la fórmula en polvo tratada térmicamente, los cuales mostraron una disminución en la utilización nutritiva del hierro, tendió a reducirse el contenido corporal del elemento, y que este se elevó ligeramente en los animales que tomaron la fórmula líquida calentada al baño María, aunque a diferencia de los resultados correspondientes a la utilización nutritiva, no hubo diferencias significativas. Solamente se apreció que las ratas alimentadas con la fórmula líquida sin calentar presentaban en sus cuerpos un contenido de hierro significativamente inferior al correspondiente de las alimentadas con la fórmula en polvo, igual que se obtuvo en el balance de este elemento (tabla 29); pero, aunque varió el contenido total de hierro, la concentración corporal no se afectó ni por el tipo de fórmula ni por el calentamiento ensayado (tabla 36).

29); pero, aunque varió el contenido total de hierro, la concentración corporal no se afectó ni por el tipo de fórmula ni por el calentamiento ensayado (tabla 36).

Se observaron algunas variaciones del contenido total de hierro en las ratas lactantes al cabo de los 6 días que duró el experimento, pero los contenidos relativos no se modificaron, de modo que fundamentalmente habría que relacionarlas con las fluctuaciones del peso entre los distintos grupos; sólo en el grupo que tomó fórmula líquida sin calentar fueron peso y contenido férrico significativamente inferiores que en su homólogo en polvo (tabla 36). Si estos animales se comparan con los alimentados con leche de vaca (tabla 35) se puede observar que la concentración corporal de este elemento fue bastante más alta, lo cual se puede atribuir a bajo contenido de hierro de la leche de vaca que ya ha sido indicado.

El estudio del contenido de hierro en distintos tejidos no dio lugar a resultados significativos dependientes de la forma de presentación del preparado para lactantes, ni del calentamiento, a excepción de la concentración hepática, que fue superior en las ratas alimentadas con la fórmula líquida (tabla 38). Dichos animales, que comieron menos y alcanzaron pesos inferiores a los de las ratas que tomaron fórmula en polvo, tuvieron unos hígados levemente más pequeños, siendo el índice hepatosomático similar en todos los grupos (tabla 14). Sin embargo, el contenido de hierro en el hígado no tendió a ser inferior sino que por el contrario la concentración hepática de este mineral estaba incrementada. Esto debería relacionarse con aspectos fisiológicos de movilización del hierro de sus depósitos que se han formado durante la gestación en la etapa postnatal (Wharf y col., 1997), lo que también está asociado con el aporte tan escaso de este elemento a través de la leche de vaca. Como estos animales tuvieron una ingesta algo deficitaria de hierro respecto a la otra fórmula y lo utilizaron más ineficazmente, debería de haber vaciado más sus reservas hepáticas. Sin embargo, el hecho de que la concentración férrica en el órganos se incremente, podría explicarse por el menor crecimiento que mostraron, y por tanto, la menor necesidad de movilizar dichas reservas. Incrementos en la concentración hepática de hierro se han observado bajo distintos regímenes dietéticos que supusieron una alteración del crecimiento y/o del estados del hierro (Wharf y col., 1997).

4.2.6. Biodisponibilidad del zinc

4.2.6.1. Ensayos in vitro

Según Evans y Johnson (1978) la forma química del zinc biológicamente más importante es como ion divalente, pero dichos iones en solución acuosa a pH elevado, normalmente forman hidróxidos que precipitan, a no ser que estén presentes especies acomplejantes (tales como aminoácidos, péptidos, proteínas o quelantes orgánicos). Otros autores coinciden en indicar que la forma más disponible del zinc es formando quelatos con aminoácidos, y la menos formando parte de sales inorgánicas y complejos orgánicos altamente estables (Kirchgessener y Hartel, 1977).

El zinc de la leche descremada dializa significativamente menos que el de la leche entera, pero queda más en forma soluble no dializada y menos como precipitado (tabla 30). Esta influencia de la cantidad de grasa de la leche estaría de acuerdo con lo descrito por Aguirre (1995) al comparar dietas con un 8% y un 2% de grasa, y recuerda a lo ya indicado para el calcio que también tendió a solubilizarse más, presentando menos precipitado, cuando se digería la leche descremada en lugar de la entera, aunque eran las formas solubles de bajo peso molecular (dializadas) las más favorecidas (tabla 17).

En diversos estudios se ha comprobado que determinados ácidos grasos, triglicéridos etc. tienen capacidad para captar calcio (Kies, 1985; Kaup y col., 1993) y zinc (Kies, 1988; Draper y col, 1993) formando jabones insolubles en el intestino que impiden su absorción (Widdowson, 1965). Esto en nuestro sistema in vitro podría explicar que con más grasa se incrementaran las fracciones insolubles de ambos elementos, aunque en el organismo existen mecanismos fisiológicos para absorber incluso determinados jabones cálcicos por lo que esta diferencia entre la leche entera y descremada quizá no tiene repercusiones en el organismo (Patton y Carey, 1979) indican que la formación de los jabones de calcio es un paso normal en la digestión de los lípidos, aunque no es bien conocido si el calcio es absorbido con las micelas.

Figura 22. Distribución de zinc tras la digestión in vitro

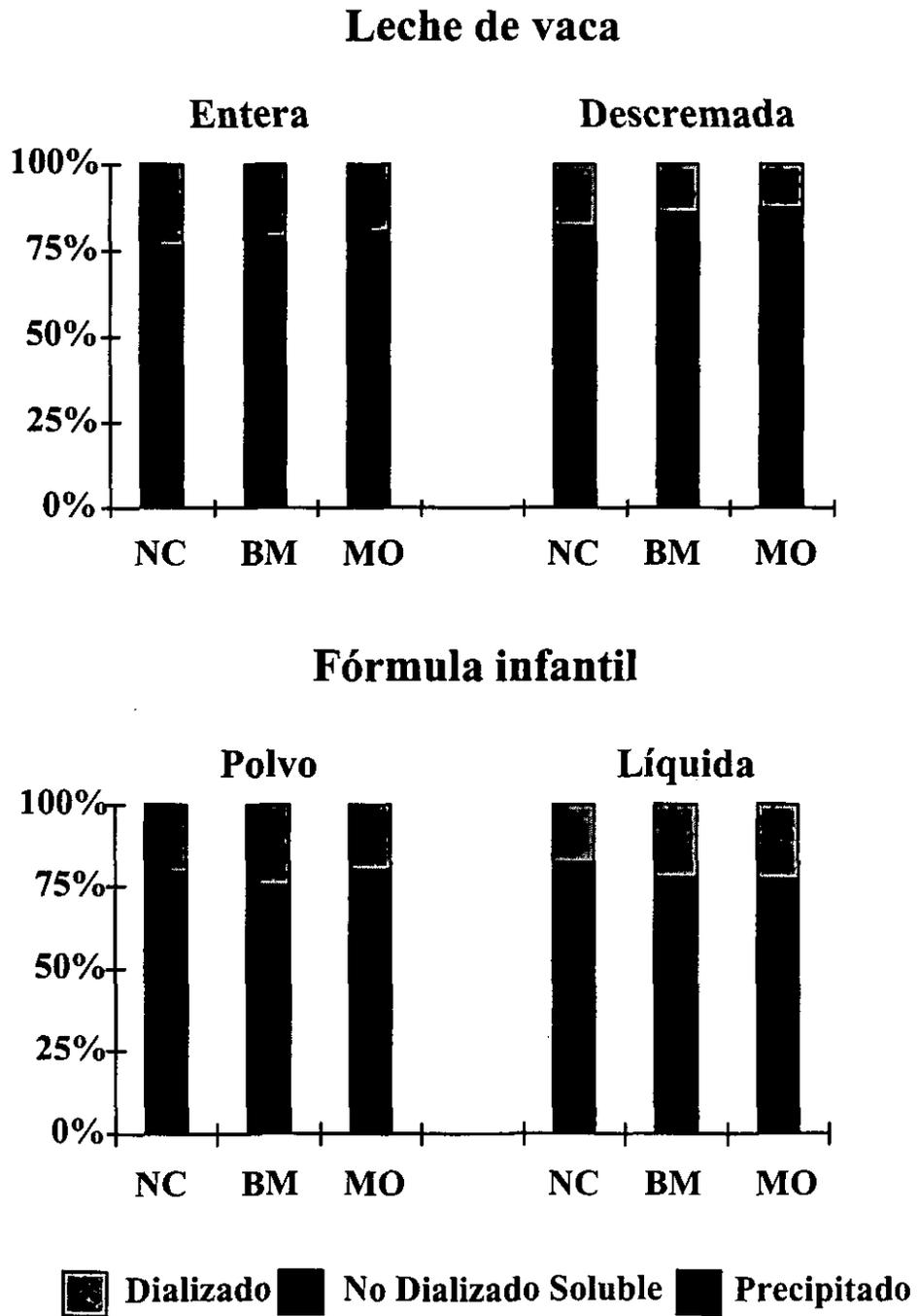
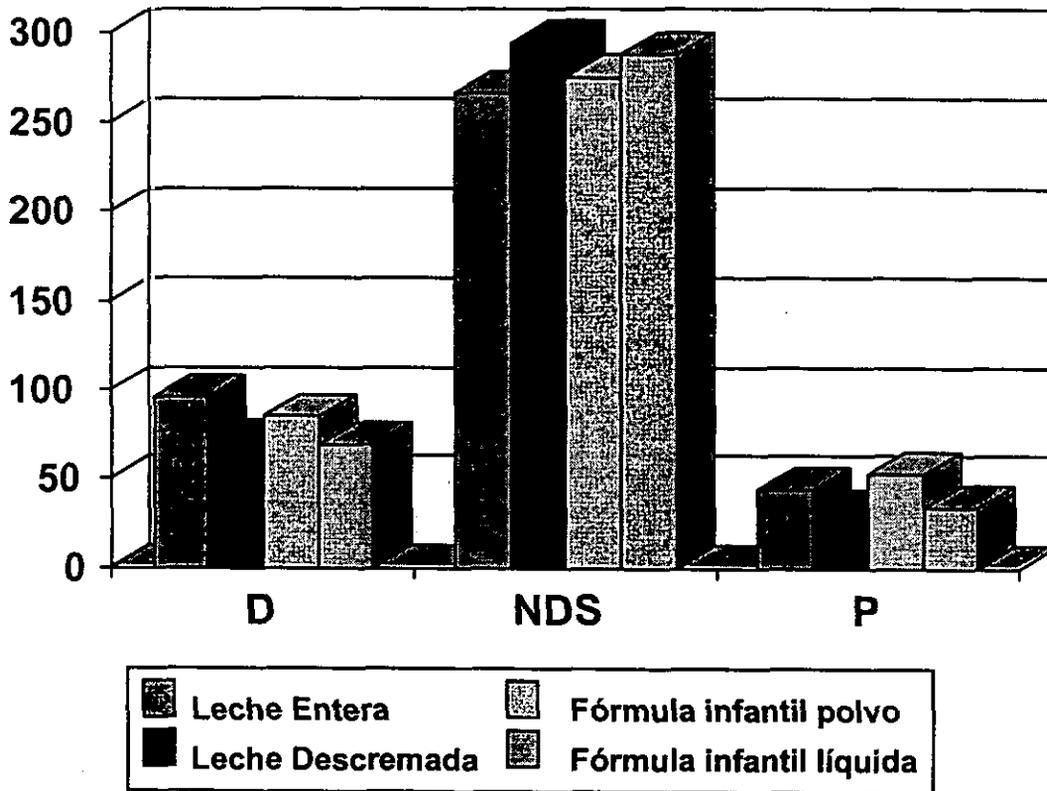


Figura 5. Valores absolutos de Zn

mg/100 ml



En la leche de vaca casi todo el zinc está ligado a la fracción descremada y sólo un 1% pertenece a la fracción lipídica (Fransson y Lönnnerdal, 1983). Respecto al zinc correspondiente a la parte descremada, un 95% está asociado a las micelas de caseína (Blakeborough y col., 1983) y sólo una pequeña proporción (5%) está asociado a un compuesto de bajo peso molecular (Singh y col., 1989) que ha sido identificado como citrato (Blakeborough y col., 1983; Martín

y col., 1984). Del zinc ligado a las micelas de caseína, un tercio está débilmente unido a través de los residuos de fosfoserina de la caseína, y los otros dos tercios se unen más estrechamente al fosfato cálcico coloidal (Singh y col., 1989).

En las fórmulas infantiles, parte del zinc puede que se encuentre en formas similares a las de la leche de vaca, pero debido a los distintos procesos implicados en su fabricación, ésta ha podido modificarse y además hay que tener en cuenta que debe adicionarse como sal inorgánica al objeto de cubrir las necesidades del bebé.

Respecto a los resultados de la disponibilidad *in vitro* de zinc tras la digestión de las fórmulas infantiles (tabla 30), a diferencia de lo ocurrido en los casos del calcio (tabla 17) y hierro (tabla 28), se observó que la diálisis del zinc prácticamente no difería entre las dos formas de presentación, lo que recuerda más a la disponibilidad *in vitro* del fósforo (tabla 20) y el magnesio (tabla 23). Sin embargo, al principio de la digestión pancreática, después de 1 hora, con la fórmula en polvo el zinc dializado era menor, el no dializado soluble superior y el precipitado superior respecto a la líquida.

La leche de vaca entera y descremada y las fórmulas infantiles estudiadas contenían una cantidad de zinc bastante similar (tabla 1 y 2). Por ello, la expresión del zinc dializado, no dializado soluble y precipitado por 100 ml, de leche o fórmula no tratada (Figura 5) detecta las mismas diferencias que ya se habían encontrado en los valores porcentuales, a excepción de la elevación significativa del valor absoluto del zinc no dializado soluble y precipitado con la fórmula infantil en polvo respecto a la leche de vaca entera que se produce porque esta última presenta una concentración de zinc algo superior.

El calentamiento independientemente de su modalidad, disminuyó aún más el zinc dializado e incrementó el no dializado soluble y precipitado de la leche descremada, en contraste con las variaciones que ejerció en la leche de vaca entera cuyas formas solubles no parecieron afectarse y sólo se incrementó el precipitado significativamente al calentar por microondas (tabla 30).

En la fórmula en polvo se observó un incremento de la diálisis de zinc por el calentamiento al baño María y a la vez una disminución del zinc soluble que no dializó, sin cambios importantes en el insoluble. Por su parte, ambos tipos de calentamiento elevaron en la fórmula líquida la fracción de zinc que dializó y disminuyeron el no dializado soluble, si bien se produjo también un cierto aumento del precipitado, de forma significativa en ambas formas de calentamiento pero sin diferencias respecto a la correspondiente fórmula en polvo tratada por la misma modalidad.

4.2.6.2. Ensayos in vivo

Coincidiendo con lo observado para otros elementos, la ingesta, absorción y retención de zinc no varió en los tres grupos de ratas que tomaron leche de vaca. Sin embargo, se produjeron disminuciones en la digestibilidad, utilización metabólica y utilización nutritiva, debidas al calentamiento, aunque las variaciones en la utilización metabólica de los grupos que tomaron las leches sin calentar y calentada al microondas no fueron significativas (tabla 31).

En el estudio de digestibilidad in vitro de esta leche de vaca, la influencia del calentamiento se manifestó en una elevación del precipitado, lo que se asociaría con una peor utilización del zinc a nivel digestivo. En diferentes estudios realizados con mezclas de proteína o aminoácidos y azúcares calentados que implican la formación de productos de la reacción de Maillard, se ha observado que el porcentaje de absorción del zinc disminuye (Sandstöm y col., 1983; Lykken y col., 1986) y en algunos casos, además aumentan las pérdidas urinarias (Furniss y col., 1989; Aspe, 1992). Sin embargo, estas variaciones parece que se producen con calentamientos intensos, y resulta difícil que la reacción de Maillard haya tenido suficiente entidad para desencadenar efectos negativos en las condiciones de nuestros experimentos, temperatura máxima de 65°C. Ha de manifestarse sobre este aspecto, que ni la absorción ni la retención aparentes disminuyeron de forma significativa. Otro tipo de modificaciones que origina el calentamiento son isomerización de la lactosa, modificación de la estructura proteica, etc.; y aunque estos cambios indirectamente podrían también haber afectado en la utilización de este

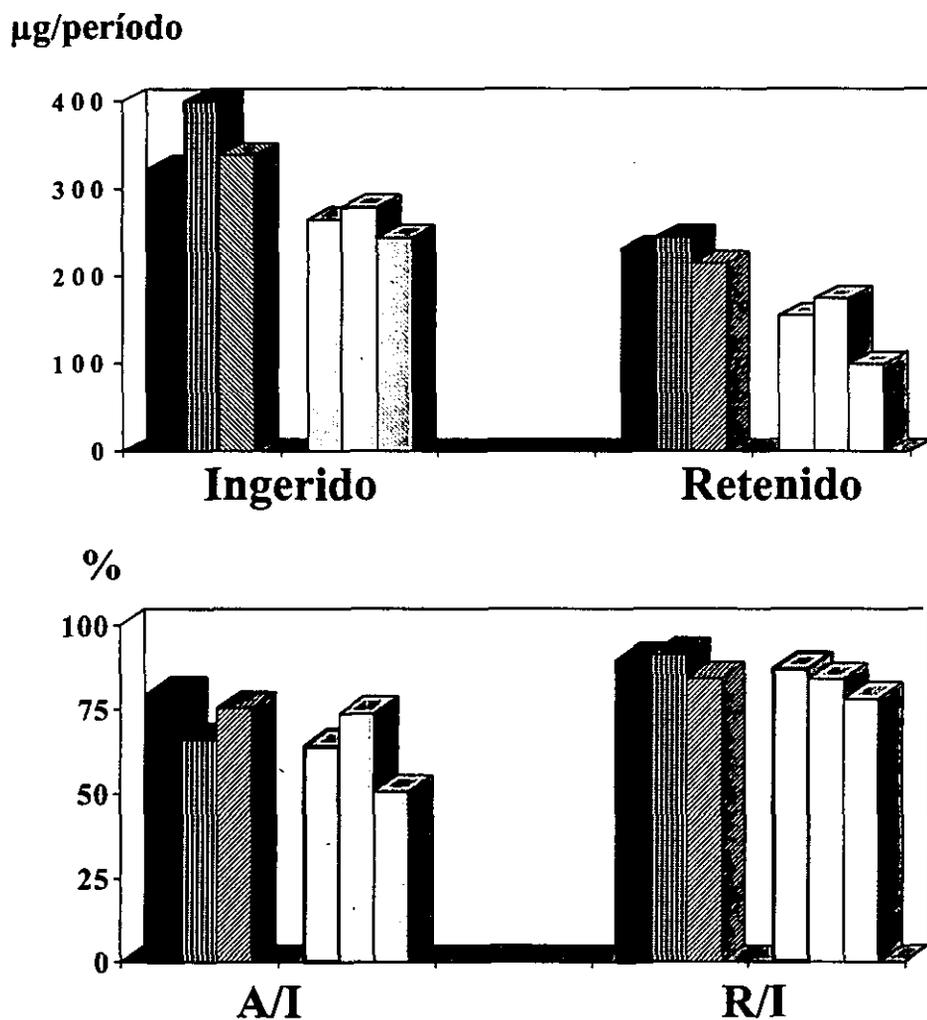


Figura 23. Utilización digestiva y metabólica de zinc

Ratas alimentadas con fórmulas infantiles: en polvo, sin calentar ■ y calentada al baño María ▨ o por microondas ▩ y líquida, sin calentar □ y calentada al baño María ◻ o por microondas ◻

nutriente, no parece que hayan podido jugar un papel destacado, a juzgar por las variaciones tan pequeñas que se han producido.

En cualquier caso, la ingesta de leche de vaca tratada al baño María o por microondas hubo de alterar poco el estado nutritivo de zinc, ya que los contenidos tisulares de este elemento no se afectaron (tabla 39) y el contenido corporal total (tabla 35) no se redujo, incluso en el del grupo que tomó la leche calentada al baño María se incrementó significativamente tanto en valor absoluto como relativo. En diferentes órganos y tejidos no se apreciaron cambios importantes (tabla 37).

Las ratas que tomaron fórmula infantil absorbieron y retuvieron el zinc con eficacias similares a las de las que tomaron leche de vaca, A/I, R/A, R/I (tabla 31 y 32). En este sentido, estudios de retención corporal total de ^{65}Zn llevados a cabo en adultos humanos demostraron que la absorción de zinc de la leche de mujer es significativamente más alta que la de la leche de vaca o la de fórmulas infantiles elaborados a partir de leche de vaca, sin diferencias significativas entre éstas (Casy y col. 1981; Blakeborough y col., 1983; Lönnerdal y col., 1984). También Lönnerdal y col. (1988) obtuvieron en monos rhesus lactantes que la absorción del zinc de la leche humana (65%) era más similar a la de las fórmulas infantiles con predominio de proteínas séricas (60%) que con predominio de caseína (46%), pero la cantidad absoluta de zinc absorbido era considerablemente más alta con las fórmulas que con la leche humana, debido a que las primeras presentaban una concentración del elemento en cuestión notablemente más alta. Sin embargo, existen en la bibliografía resultados dispares sobre este tema: Sandström y col. (1993) no observaron diferencias en la distribución tisular del ^{65}Zn administrado con fórmula infantil o leche humana, y Johnson y Evans (1978) obtuvieron en ratas que la biodisponibilidad del zinc de la leche de mujer y la leche de vaca eran respectivamente 59 y 42%, pero esta diferencia no era significativa. Otros estudios llevados a cabo en ratas lactantes mostraron un porcentaje de absorción de zinc elevada (85-95%) con leche de mujer y en preparados para lactantes a base de leche de vaca (Brennan y col., 1989, 1990 a,b; Flynn y Brennan, 1991). Parece ser que la baja concentración de zinc de la leche de mujer contribuye a que su eficacia de absorción sea más

elevada ya que el zinc está sometido a un control homeostático, pero también se sabe que éste tiene alta biodisponibilidad, gracias a la calidad proteica y a la presencia de pequeños ligandos en la leche humana (Sandström, 1977).

La absorción y retención aparente de zinc estuvieron deprimidas en los animales que tomaron la fórmula líquida (tabla 32), no solamente por su inferior ingesta, sino también en los grupos que tomaron el preparado sin tratar o tratado al microondas, por una disminución del porcentaje de absorción. Pero los animales que tomaron la fórmula líquida previamente calentada al baño María tuvieron una digestibilidad de zinc superior que los correspondientes que bebieron la fórmula en polvo reconstituída, y ello contrasta con que a nivel metabólico (R/A) el zinc se utilizó peor. En general, la utilización nutritiva del zinc fue menor en las ratas lactantes alimentadas con la fórmula líquida respecto a la fórmula en polvo, pero el calentamiento moduló este resultado, como se indica a continuación.

La cantidad de zinc ingerida, absorbida y retenida tendió a aumentar en los animales que tomaron las fórmulas después de calentarlas tradicionalmente al baño María, si bien las diferencias en los valores de absorción y retención no llegaron a ser significativas respecto a sus controles; ya que en el caso de la fórmula líquida tendió a elevarse la digestibilidad y en la fórmula en polvo se redujo, llegando a afectarse la utilización nutritiva (figura 23). Por su parte, el microondas disminuyó los tres coeficientes A/I, R/A, y R/I, especialmente con el preparado líquido, pero no se afectó de forma clara ni la absorción aparente ni el balance. Por tanto, estos calentamientos de tipo doméstico incidieron poco en la utilización nutritiva del zinc; se presentaron ciertas diferencias en los coeficientes que cuantifican los procesos digestivo y metabólico o incluso el nutritivo, lo que también se observó cuando se calentó la leche de vaca (tabla 31) pero en ningún caso se afectó el balance del elemento (tabla 32).

El zinc corporal total fue significativamente inferior en las ratas que consumieron la fórmula infantil líquida (tabla 36) lo que fundamentalmente se relaciona con su mayor peso; los animales de estos grupos comieron menos, pesaron menos y retuvieron una cantidad de zinc inferior, como se determinó a través del estudio de balance (tabla 32). Sin embargo, la influencia

del calentamiento en el contenido de zinc de estos animales no se detectó, ni en valor absoluto ni por gramo de peso.

También el menor peso de los animales alimentados con el preparado líquido conllevó un peso hepático ligeramente más bajo y un contenido de zinc en el órgano significativamente menor que el de las ratas que se alimentaron con la fórmula en polvo, pero no se produjeron diferencias significativas en sus concentraciones (tabla 40). Tampoco se apreciaron diferencias significativas en las concentraciones de zinc en piel y hematíes. Podría apuntarse que quizás en la piel, tendieron a elevarse; y precisamente acúmulos excesivos de este metal en pelo se han asociado con estados de malnutrición (Varela y col., 1992).

Todo ello apoyaría una vez más que las repercusiones nutritivas del calentamiento moderado de las fórmulas infantiles fueron mínimas.

4.2.7. Biodisponibilidad del cobre

4.2.7.1. Ensayos in vitro

Los contenidos de cobre de la leche de vaca entera y descremada empleadas en nuestros estudios fue aproximadamente de 0.4 µg/ml, y de 0.65 µg/ml para las fórmulas infantiles (tabla 1 y 2); ambos valores resultan similares a los hallados por Lönnnerdal y col. (1985), aunque en la bibliografía se describen contenidos de cobre de la leche de vaca inferiores, como refleja Roig (1997). Respecto al valor de cobre para las fórmulas infantiles, puesto que no se dispone de datos suficientes para establecer recomendaciones sobre las ingestas adecuadas de cobre se recurre al concepto de ingestas dietéticas diarias que se estiman seguras y adecuadas (ESADDI: Estimated Safe and Adequate Daily Dietary Intake), que en este caso es de 0.4 a 0.6 mg/día. Las leches artificiales para lactantes comercializadas en Estados Unidos tienen que aportar 60

µg por 100 kcal, y esta misma cantidad es la especificada por la Joint FAO/OMS Alimentarius Commission (1986).

Se indicado que el 44% del cobre de la leche de vaca se encuentra unido a la caseína, un 8% a las proteínas de suero y un 47% a la fracción de bajo peso molecular unido a la grasa (Lönnerdal y col., 1981). La relación de Zn/Cu es mucho mayor en la leche de vaca que en la leche de mujer, que en el primer mes de lactancia es de 6.3, en el segundo 4.7, en el tercero 3.9 y en el cuarto de 3.7 (Butte y col., 1987). En nuestro caso dicha relación fue aproximadamente 12 para leche de vaca y 6 para las fórmulas infantiles, y por tanto estas tendrían una composición más cercana a la de la leche materna.

4.2.7.2. Ensayos in vivo

Elevadas ingestas dietéticas de zinc inducen signos de deficiencia de cobre en los animales, principalmente anemia y disminución de la actividad de la citocromo c-oxidasa (O'Dell, 1989). Además, parece que existe un mecanismo de competencia entre ambos elementos (Turnlund, 1994). El incremento de la concentración de zinc en las células de la mucosa intestinal induce la síntesis de metalotioneínas y estas se unen al cobre mucho más fuertemente que lo hacen al zinc, Por tanto incluso bajas concentraciones de cobre compiten favorablemente por los sitios de unión a los metales (Fomon, 1995). Lynder (1988a) indica que en trabajos de investigación realizados en ratas se ha visto que situaciones deficitarias de cobre van acompañadas de incrementos significativos de hierro acumulados en hígado, y si se les hace una infusión o perfusión ceruloplasmina el hierro hepático se transfiere a la transferrina plasmática (Osaki y Johsson, 1969).

La ingesta de cobre no mostró diferencias significativas entre los grupos que consumieron leche de vaca (tabla 33). Sin embargo, el calentamiento favoreció la digestibilidad de este elemento, tanto los animales que tomaron la leche calentada al baño María como los que la tomaron tratada al microondas presentaron una mayor relación A/I respecto al control. Sin

embargo, la absorción aparente sólo se incrementó significativamente respecto al grupo control en el caso del calentamiento por microondas.

Con respecto a los contenidos globales de cobre y a las concentraciones corporales al final del experimento de los animales que tomaron leche de vaca (tabla 35), no se han encontrado diferencias significativas debidas al calentamiento, si bien se aprecia un contenido ligeramente inferior en el grupo que consumió la leche sin calentar.

Los niños al nacer contienen una considerable reserva de cobre en el hígado, del 50 al 70% del cobre total se localiza en este órgano, y actúa como reserva durante los 3 a 6 primeros meses de vida, cuando la ingesta de cobre es baja. El contenido de cobre de la leche humana es de 0.2 $\mu\text{g/ml}$ y es altamente disponible (Lönnerdal, 1981). Tan sólo se han observado deficiencias de cobre en niños prematuros, que presentan un contenido hepático de cobre más bajo, alimentados con leche de vaca (Al-Rashid y Spangler, 1971; Naveh y col, 1981). La leche de rata presenta una concentración de cobre notablemente más alta que la de muchas otras especies de mamíferos incluido el hombre (Underwood, 1977) además es muy disponible, de manera que durante la lactancia, la rata el incrementa su reservar hepático de cobre (Terao y Owen, 1977; Keen y Hurley, 1980). Las concentraciones hepáticas de cobre obtenidas para los animales que tomaron leche de vaca fueron superiores a las obtenidas para ratas de un mes: 10 $\mu\text{g/g}$ (Aguirre, 1995). No se vieron afectados los contenidos en valor absoluto ni relativo de este micronutriente en hígado, piel y hematíes de los animales de los tres grupos anteriormente indicados.

La mayor parte del cobre eritrocitario está presente en la Cu, Zn-superóxido dismutasa, y la concentración del zinc en esta enzima permanece inalterada durante toda la vida del eritrocito maduro (Fomon, 1995). Los valores obtenidos para este parámetro en los grupos que tomaron leche de vaca (tabla 37) no mostraron diferencias entre si y son coherentes con la concentración media de cobre en hematíes descrita por Aguirre (1995) para ratas de 85 g de peso: 9.9 $\mu\text{g/g}$.

En general se observa que las cantidades de cobre absorbidas y digeridas por los animales que tomaron fórmula infantil fueron bastante similares a los que tomaron leche de vaca, lo que fundamentalmente se debe a la mayor concentración de cobre en las fórmulas, incluso a que la digestibilidad de este elemento resultó favorecida. La ingesta de los grupos que tomaron la fórmula líquida fue inferior a la de los grupos que tomaron la fórmula en polvo, siendo la diferencia entre tipos significativa en las fórmulas tratadas al baño María, así como en las calentadas al microondas. Debido a que la eliminación urinaria de cobre fue relativamente proporcional a su ingesta se alcanzaron dentro de los dos tipos de preparados para lactantes valores de absorción aparentes parecidas. Tan sólo es de destacar el caso de la fórmula en polvo calentada al baño María que mostró una absorción significativamente más baja respecto a su control y a su homólogo calentada al microondas, y a la vez fue significativamente menor a la fórmula líquida tratada al baño María. También es de señalar que en este grupo la relación A/I fue significativamente distinto desde el punto de vista de su tipo y de su tratamiento. Parece que el calentamiento de la fórmula en polvo hubiera perjudicado su utilización digestiva siendo más acentuado en el caso anteriormente señalado. Con respecto a este parámetro coincide que la fórmula líquida calentada al microondas también fue significativamente menor que su control y la fórmula líquida baño María.

También podría atribuirse a que el contenido de cobre de la leche de vaca es aproximadamente la mitad que el de los preparados para lactantes el hecho de que partiendo de un contenido corporal de cobre de aproximadamente 186, correspondiente a ratas de 16 días μg (datos analíticos no mostrados), las ratas alimentadas con leche de vaca mostraron un contenido final de aproximadamente 90 μg (tabla 35), sin que existieran diferencias por el tipo de calentamiento al que fue sometido su alimento, respecto a las ratas alimentadas con fórmula en polvo, 110 μg y las ratas alimentadas con fórmula líquida, 95 μg , por lo tanto el contenido corporal de cobre en valor absoluto correspondiente a los grupos que tomaron fórmula en polvo es significativamente mayor, pero no en valor relativo debido al menor peso que presentaron los animales que consumieron la fórmula líquida. Sin embargo esta diferencia no se reflejó en el contenido de cobre de la piel, los hematíes ni en el hígado en valor absoluto pero sí en valor relativo (tabla 38), siendo mayor la concentración de cobre en el grupo que tomó la fórmula en líquida. El bajo contenido de cobre en la leche de vaca quedó reflejado en el bajo concentración de cobre en la piel y en los hematíes de los grupos experimentales la consumieron (tabla 37).

4.3. Experimentos III

4.3.1. Evaluación del daño térmico

En la tabla 45 se recoge los valores obtenidos de los indicadores de daño térmico correspondientes a los preparados para lactantes obtenidos mediante procesos industriales de deshidratación (A polvo y B polvo), esterilización convencional (A esterilizada) y esterilización UHT (B-UHT). Las fórmulas líquidas presentaron un contenido de lactulosa mucho más alto que las en polvo, ya que la isomerización de la lactosa es la reacción predominante que se produce durante los tratamientos industriales de esterilización convencional y UHT (Nangpal y col., 1990; Hurrell y col., 1989). Respecto a estos indicadores en fórmulas infantiles, Rossi y Pompei (1991) describieron que el contenido de lactulosa de preparados para lactantes UHT (140°C durante 24 segundos) era de 1020 mg/L, y si además se sometía la leche UHT a esterilización en botella este valor aumentaba hasta 1280 mg/L. Los niveles altos de lactulosa obtenidos en este estudio para las fórmulas líquidas, en especial la A: esterilizada convencionalmente, reflejan que se han sometido a un tratamiento térmico severo o que en su elaboración se han dado varias fases que implicaban calentamiento. Para la leche de vaca "The International Dairy Federation" ha propuesto la lactulosa como indicador de procesamiento térmico, estableciendo el límite máximo para la UHT en 600 mg/L (Schlimme y col., 1993), valores superiores indicarían que se trata de leche esterilizada convencionalmente. Sin embargo, a diferencia de la leche bovina (Schlimme y col., 1993; Fritsch y col., 1983; Horak y Kessler, 1981; Pagliarini y col., 1988), no hay recomendaciones sobre el límite de productos de la reacción de Maillard o de otros indicadores térmicos en fórmulas infantiles, lo cual sería necesario puesto que los preparados para lactantes constituyen el único alimento de los niños durante sus primeros meses de vida, y además esta población es muy vulnerable al no tener todas sus funciones metabólicas plenamente desarrolladas.

Al contrario que la lactulosa, la furosina fue más abundante en los preparados en polvo, y como han indicado otros autores, ello se debe a que la reacción de Maillard es más intensa en sistemas con un bajo contenido de humedad (Labuza y Saltmarch, 1981). Se han

descrito contenidos de furosina de 53.5 a 109.9 mg/L para una leche de vaca en polvo reconstituida comercializada, y 17.6 a 85.4 mg/L para una leche de vaca UHT (Corzo y col., 1994). Henle y col. (1995) señalaron que los preparados para lactantes del mercado contienen más furosina respecto a otros productos lácteos, oscilando de 9.3 a 18.9 g de furosina por kg de proteína en las fórmulas en polvo y 7.3 a 12.5 g/kg de proteína en las líquidas. Nuestros datos están dentro de estos rangos (de 7 a 14 g/kg de proteína). En una fórmula infantil para prematuros esterilizada convencionalmente se halló un contenido de lactulosil-lisina dos veces superior que en la equivalente esterilizada mediante UHT y también tres veces más productos avanzados de la reacción de Maillard que su homóloga UHT (Langhendries y col., 1992), lo que está en concordancia con nuestros resultados.

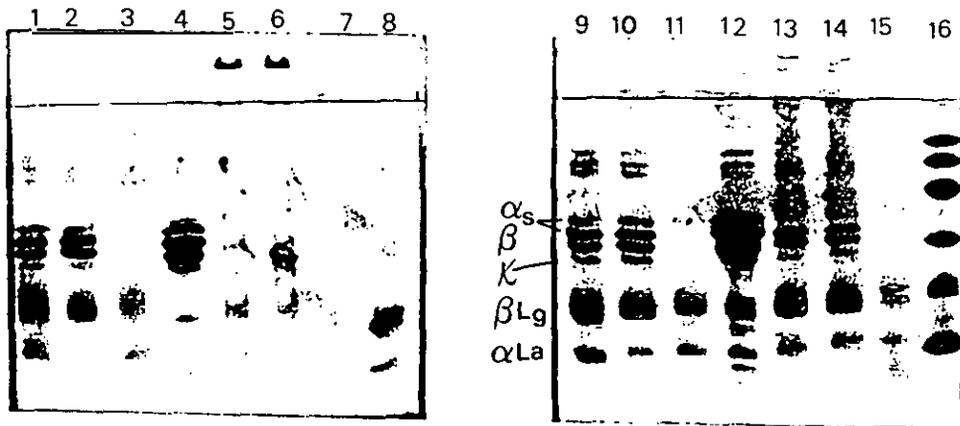
La relación Lu/Fu es normalmente mucho más elevada en las leches líquidas que en las en polvo debido por un lado a la mayor isomerización de la lactosa y por otro lado al menor impacto que la alta humedad y las condiciones de calentamiento tienen sobre el producto. Los valores de este índice obtenidos en nuestro estudio están dentro de los intervalos que figuran en la bibliografía: 0.23 - 1.1 y 6.38 - 13.66 para la leche en polvo y la líquida respectivamente (Corzo y col., 1994). Sin embargo, para la fórmula esterilizada dicho cociente es anormalmente alto, 43.4. Esto se obtiene porque, aunque el contenido de lactulosa es bastante alto, la furosina no estaba elevada, debido probablemente a que se ha producido la degradación de los compuestos de Amadori, precursores de la furosina, dando lugar a otros productos propios de etapas más avanzadas de la reacción de Maillard (Pellegrino y col., 1995) como las melanoidinas. De hecho se observó que ésta muestra era la más oscura de todas, y es bien conocido que el pardeamiento de la leche es consecuencia de la reacción de la lisina con la lactosa (Burton, 1984).

En lo que respecta a las fracciones de nitrógeno, en la tabla 46 figuran los resultados obtenidos para las cuatro muestras, las cuales no mostraron diferencias entre sí en lo que se refiere a su nitrógeno total. Pero las dos fórmulas de tipo A contenían significativamente más nitrógeno no proteico que las B, lo que quizá se deba a que en la elaboración del primer tipo se adicionan más aminoácidos que en el segundo, también llama la atención la diferencia entre la fórmula A en polvo con respecto a su homóloga esterilizada. Dicha diferencia se podría atribuir a que la desnaturalización de las proteínas séricas ha sido más acusada en la fórmula

esterilizada como indicaremos a continuación, lo que también está en concordancia con los valores más altos de lactulosa y furosina.

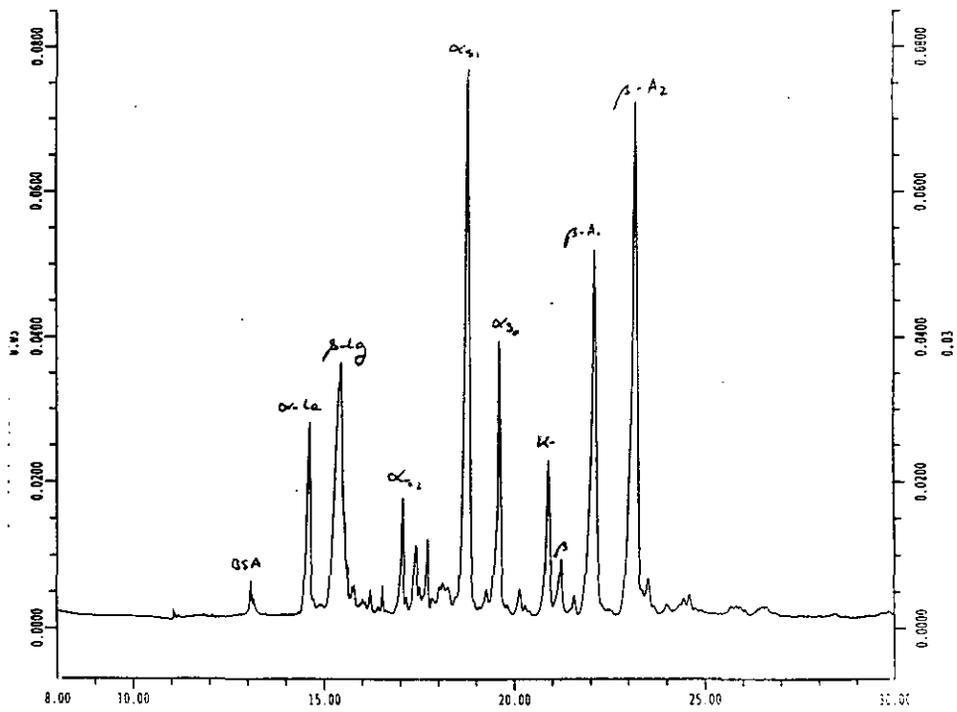
El análisis por HPLC de las fracciones solubles a pH 4.6 por el método de Resmini (1989) no permitió determinar cuantitativamente las proteínas del suero nativas, ya que las muestras dieron lugar a cromatogramas distorsionados en los que los picos correspondientes a la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina tenían una forma irregular (resultados que no se muestran en la tesis), que contrasta claramente con la de la leche de referencia. Es posible que el conjunto de reacciones que se producen durante el calentamiento hayan afectado preferentemente a las proteínas solubles porque estas hayan interactuado más fácilmente con azúcares, lípidos o incluso agregados proteicos.

Los resultados anteriores se ven respaldados por los obtenidos por SDS-PAGE para cada tipo de preparado, así como sus respectivas fracciones de caseína y proteínas séricas (figura 6). En general todas las proteínas presentaban modificaciones intensas. La α -lactoglobulina y β -lactoalbúmina apenas se pudieron apreciar en las fracciones solubles de las fórmula líquida esterilizada convencionalmente y la UHT, respectivamente calle 7 y 15, lo cual apunta a que las proteínas séricas presentaran un alto grado de desnaturalización y estuvieran asociadas a la caseína. Sin embargo, en ambas fórmulas en polvo se apreció una banda más clara para las proteínas séricas (calles 3 y 11) especialmente en el caso de la fórmula 2. En todos los casos al aplicar un tampón SDS y β -mercaptoetanol se produce la ruptura de enlaces disulfuro y entre la caseína y la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina desnaturalizadas, pudiéndose apreciar una segunda banda más clara, correspondiente a dichas proteínas séricas, en las fracciones de caseína (calles 2, 6, 10, y 14). Es de destacar que la leche entera y la fracción caseínica correspondientes a la fórmula líquida A (calles 5 y 6) fueron muy difusas y apenas se pueden diferenciar las bandas correspondientes a las distintas proteínas. Tan sólo apareció en el punto de aplicación de las muestras una "banda", propia de un agregado de proteínas de alto peso molecular, que no migraron a través del gel de resolución ni se solubilizaron al aplicar condiciones reductoras.

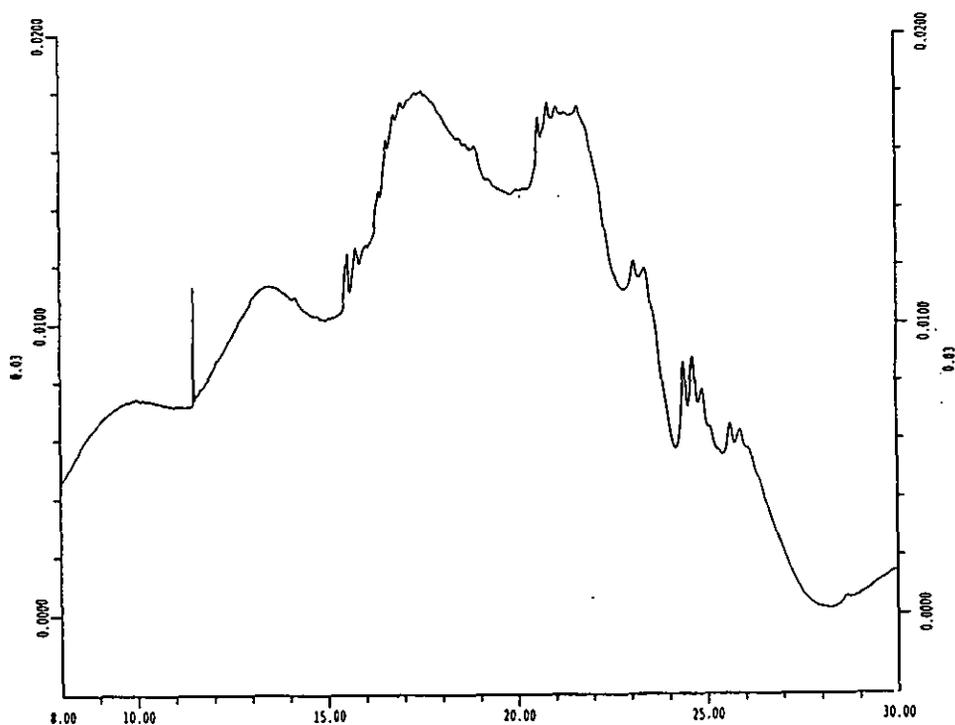


- 1: 1P
- 2: Fracción caseína 1P
- 3: Fracción soluble 1P
- 4: Fracción caseína Referencia (leche de vaca pasteurizada)
- 5: 1E
- 6: Fracción caseína 1E
- 7: Fracción soluble 1E
- 8: Fracción soluble Referencia (leche de vaca pasteurizada)
- 9: 2P
- 10: Fracción caseína 2P
- 11: Fracción soluble 2P
- 12: Referencia (leche de vaca pasteurizada)
- 13: 2 UHT
- 14: Fracción caseína 2 UHT
- 15: Fracción soluble 2 UHT
- 16: Kit de bajo peso molecular

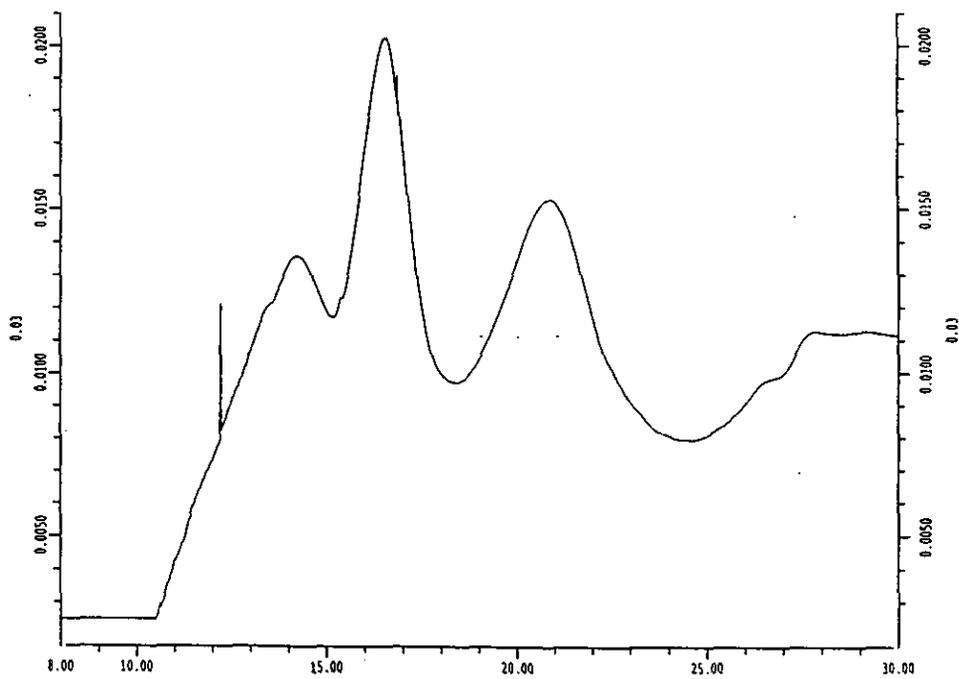
Electroforésis capilar de la leche de vaca entera



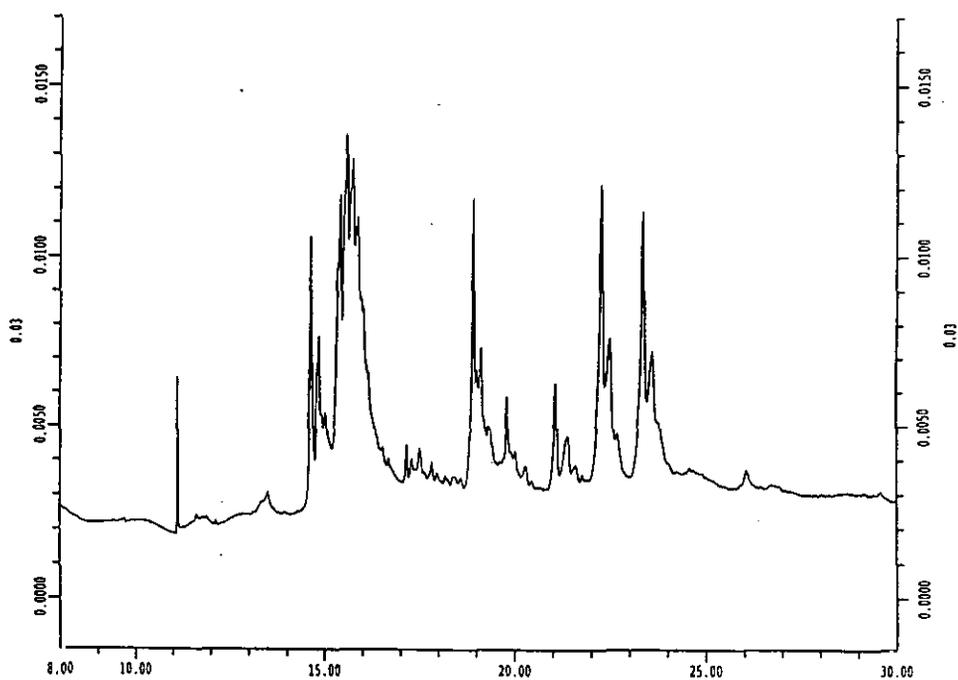
Electroforésis capilar de la fórmula infantil A en polvo



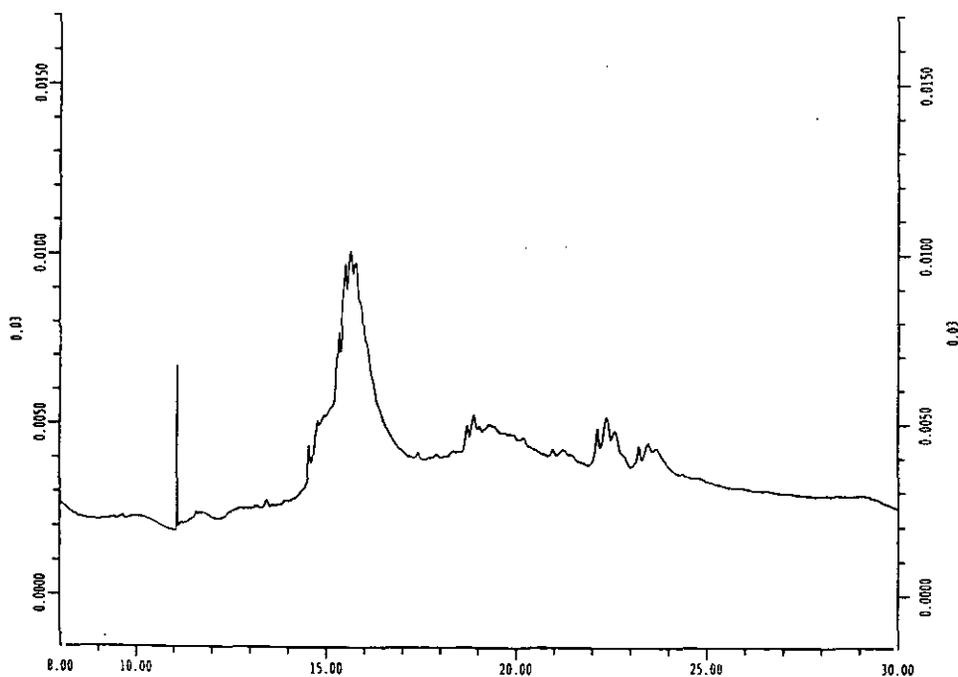
Electroforésis capilar de la fórmula infantil A líquida esterilizada



Electroforésis capilar de la fórmula infantil B en polvo



Electroforésis capilar de la fórmula infantil B líquida UHT



4.3.2. Ingesta y evolución ponderal

La dieta control de los ensayos realizados para estudiar la influencia del tratamiento térmico industrial sobre la utilización nutritiva de la proteína y los minerales, respecto a la dieta estándar AIN-76, era una dieta hipercalórica, con un contenido de aproximadamente 4350 Kcal/kg frente a 3850 Kcal/kg, respectivamente, diferencia que se debió al diferente aporte graso, 16% y 5%, respectivamente (Tablas 4 y 7). Ello se debió a que se intentó preparar una mezcla de dieta estándar y fórmula infantil casi a partes iguales pero sin que la dieta resultante se alejara excesivamente de los requerimientos de la rata, particularmente evitando que el aporte graso fuera superior al 15% a fin de prevenir la aparición de diarreas. Se decidió por tanto utilizar una mezcla de la dieta estándar y fórmula infantil en la proporción 60:40.

Obviamente la dieta hipercalórica produjo un incremento de peso que en nuestro experimento fue significativo en el día 11 (tabla 47). Ello se debió por un lado a que la ingesta de las ratas del grupo control fue algo superior que las del grupo AIN 76, pero fundamentalmente a que la eficacia alimentaria fue más alta (tabla 49), lo que concuerda con las observaciones de que una mayor ingesta grasa produce una elevación del peso y de que la grasa es un nutriente de alta palatabilidad (Mela, 1990; Rolls y Shide, 1992). Además la grasa de la dieta AIN 76 es aceite de maíz al 5% (American Institute of Nutrition, 1977), y se ha visto posteriormente que no es una fuente suficiente de ácido linoleico para la rata (American Institute of Nutrition, 1993). Según Lee y col. (1989) una relación de (n-6)/(n-3) de 5 y de ácidos grasos poliinsaturados/saturados de 2 son las más adecuadas y de acuerdo con Bouree y col., (1989) preferiblemente habrían de ser de 6 y 1 respectivamente. El aceite que más se acerca a estas recomendaciones es el de soja que presenta una relación de (n-6)/(n-3) de 7 y de ácidos grasos poliinsaturados/saturados de aproximadamente 4.

La eficacia proteica también está incrementada en la dieta hipercalórica debido a que la eliminación fecal y urinaria de nitrógeno es más baja respecto a la dieta AIN-76 como se

indicará posteriormente. El índice hepatosomático fue ligeramente superior en las ratas del grupo control frente a las alimentadas con la dieta estándar, aunque las diferencias no llegaron al nivel de significación estadística.

Después del período de adaptación de 4 días, los pesos de los distintos grupos de animales que consumieron fórmula infantil no presentaron diferencias entre sí (tabla 48), pero los animales cuya dieta contenía la fórmula esterilizada pesaban significativamente menos que los que tomaron la dieta control. Al final del ensayo dichas ratas, y las que consumieron las dietas que contenían fórmulas en polvo tuvieron significativamente pesos inferiores que las del grupo control, mientras que el peso de las ratas que tomaron la fórmula UHT no llegó a diferir significativamente del control. Estos cambios han de atribuirse a las diferencias de ingesta (tabla 50), durante el período de balance las ratas alimentadas con las fórmulas infantiles ingirieron significativamente menos alimento que las de la dieta control. Es de destacar que, a diferencia del experimento II, no se apreciaron diferencias entre los grupos que tomaron dietas que contenían la fórmula en polvo A y la líquida esterilizada A, lo que seguramente se debió a que en este experimento los animales no se encontraban en período de lactación, y por eso eran menos vulnerables, y además porque su dieta no era exclusivamente la fórmula infantil sino que estaba formulada para cubrir mejor sus recomendaciones dietéticas.

En lo que se refiere a los coeficientes de eficacia alimentaria y eficacia proteica, éstos fueron muy similares en todos los grupos sin manifestarse ninguna influencia significativa. Así mismo no se encontraron variaciones en el índice hepatosomático (tabla 50) en concordancia con los resultados de las ratas que tomaron la fórmula A polvo y líquida en la experiencia II. El peso del hígado de las ratas de esta parte del presente estudio no mostró diferencias significativas, aunque sí se puede observar que para este parámetro el valor correspondiente al grupo A polvo fue el menor (tabla 77). Puesto que no se puede pensar en una carencia o déficit proteico, que sí puede traducirse en una disminución del peso del órgano (Sakuma y col., 1987; De Jong y Schreiber, 1987; Arce, 1993), ya que el aporte proteico fue adecuado; tan sólo podría plantearse el descenso de lisina, consecuencia de la

reacción de Maillard, pero en concordancia con Said y col. (1974) esto tampoco produce modificaciones sustanciales en el peso del órgano en cuestión.

Se ha descrito que al incrementarse el contenido de lactulosa en la leche procesada (Andrews, 1986; Burton, 1988) disminuye su palatabilidad, y se sabe que las ratas son sensibles a algunos cambios organolépticos. Sin embargo, Nagendra y col. (1994) no observaron variaciones en la ingesta ni el peso de ratas en crecimiento alimentadas con fórmulas infantiles sin lactulosa o con un 0.5% ó 1% de este compuesto. En esta experiencia la fórmula infantil UHT contenía, una vez reconstituida, 1587 mg/L de lactulosa, de forma que la dieta preparada con ella aportaba un 0.5% de lactulosa, mientras que de la fórmula esterilizada, con 4556 mg/L de lactulosa, se obtenía una dieta con un contenido de lactulosa de aproximadamente 1.5%. Coincidiendo con los resultados de Nagendra y col, (1994), estos niveles de lactulosa no ocasionaron variaciones en la ingesta alimentaria de las ratas. Los trabajos de Tánico y col., 1977 y O'Brien y Walker, 1988 señalan que los productos de la reacción de Maillard pueden afectar negativamente a la ingesta, y como consecuencia también al peso final de los animales que los consumen, sin embargo la duración de esos experimentos fue de tres meses y de cinco semanas, respectivamente. Sin embargo, otros autores como Kimiagar y col., (1980) no observaron diferencias en el peso, ingesta ni índices relacionados por el consumo de una dieta que contenía más de 10% de productos derivados de la reacción de Maillard; tampoco Arce, (1993) ni Aspe y col. (1993) han detectado dichos efectos. Esto tal vez sea debido a la distinta naturaleza de los productos resultantes de dicha reacción y a las condiciones experimentales aplicadas en sus estudios. En este sentido, nuestras condiciones fueron moderadas y por lo tanto los resultados obtenidos se unen a los que encuentran que los índices nutricionales no se vieron afectados.

4.3.3. Biodisponibilidad de nitrógeno

Ya que las diferencias en la ingesta alimentaria de las ratas que tomaron las dietas control y AIN-76 no fueron significativas, tampoco se apreciaron diferencias en la cantidad de nitrógeno ingerido (tabla 51). La absorción aparente no llegó a modificarse significativamente por el consumo de una u otra dieta, pero se apreció una disminución del nitrógeno fecal en las ratas del grupo control acompañada de un incremento de su digestibilidad. Esta influencia podría relacionarse con un medio luminal relativamente más ácido en la dieta hipergrasa debido al aumento de ácidos grasos libres que se originan durante la digestión (Van Soest, 1982). Sin embargo, el efecto a nivel metabólico fue mucho más acusado, y con la dieta control de nuestros experimentos se produjo una marcada disminución de la excreción urinaria de nitrógeno, aumentando el coeficiente de utilización metabólica en comparación con la dieta AIN 76. Ello también se tradujo en diferencias significativas en la utilización nutritiva. Es posible que con un 5% de grasa en la dieta en lugar del 14%, parte de la proteína dietética se utilizara con fines energéticos, en cuyo caso se sabe que se elevan las pérdidas urinarias de nitrógeno. Por consiguiente, la utilización de un contenido de grasa más elevada en el ensayo en el que se estudia la influencia del tratamiento térmico industrial de las fórmulas infantiles, no parece desaconsejable.

Como corresponde a los cambios en la ingesta de alimento que se han comentado, la ingesta de nitrógeno no varió por el tipo de fórmula contenida en las dietas experimentales, aunque con ninguna de ellas se alcanzó una ingesta equivalente a la del control (tabla 52).

Los animales que consumieron la dieta que contenía fórmula infantil líquida esterilizada convencionalmente eliminaron una cantidad de nitrógeno superior por vía fecal en comparación con los demás grupos, de modo que el coeficiente de digestibilidad aparente se redujo significativamente. Este resultado, junto con los indicadores de daño térmico que ya se han discutido en esta memoria, apoya que la esterilización convencional utilizada en la elaboración de la fórmula A líquida ha originado productos avanzados de la reacción de Maillard, cuya absorción como se ha descrito (Finot, 1990). es muy escasa. Sarwar y col.

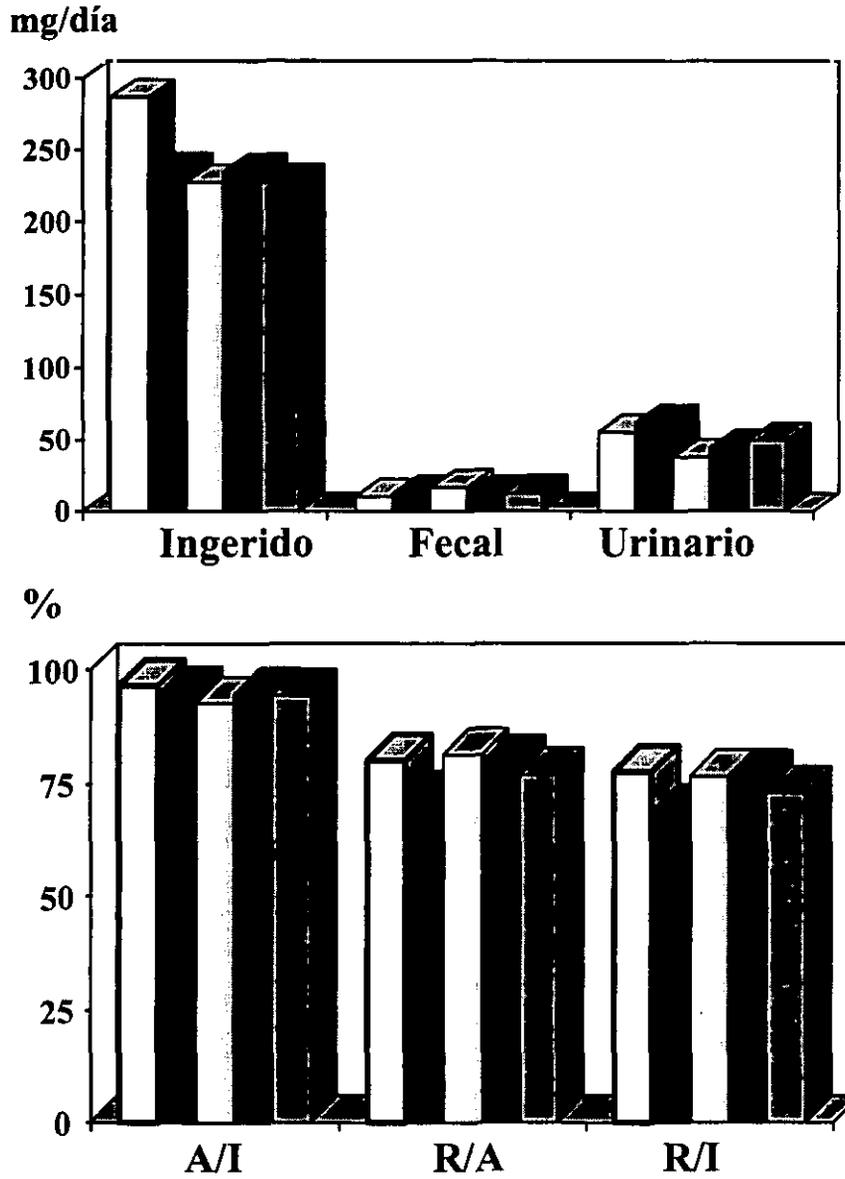


Figura 24. Utilización digestiva y metabólica de nitrógeno

Ratas alimentadas con la dieta control □ o dietas que contenían fórmulas:
 A polvo ■ A líq. esterilizada ■ B polvo □ B líq. UHT ■

(1989) también observaron en ratas que la digestibilidad proteica de un preparado para lactantes líquido esterilizado convencionalmente era más baja que la del preparado en polvo del mismo fabricante y se afectaron tanto la digestibilidad de la lisina como la de los aminoácidos azufrados. El alto contenido de lactulosa en la dieta que contenía la fórmula líquida esterilizada (1.5%) también pudo haber contribuido a este efecto, ya que se ha observado en niños que una elevada ingesta de lactulosa puede provocar diarrea y reducir a digestibilidad proteica (Hendrikse y col. 1977, Mendez y Olano, 1979). En ratas no se han estudiado los efectos de concentraciones de lactulosa en la dieta por encima del 1%, y para este nivel Nagendra y col. (1994) no encontraron ninguna influencia sobre la eliminación fecal ni urinaria de nitrógeno. En nuestro estudio este valor llegó a ser más alto (1.5%) y por tanto no se puede descartar que la lactulosa en el caso de los animales que consumieron la dieta con fórmula líquida esterilizada convencionalmente haya contribuido a la mayor eliminación de nitrógeno en heces.

La eliminación urinaria de nitrógeno tendió a ser más elevada en el grupo que consumió la fórmula en polvo A y pero más baja en el que tomó la líquida esterilizada convencionalmente, esta diferencia llegó a ser significativa tener valor estadísticamente, al igual que el valor biológico aparente.

4.3.3. Biodisponibilidad del calcio

4.3.3.1. Ensayos in vitro

En los ensayos in vitro de la experiencia III no se estudió por separado cada hora de la digestión pancreática, a diferencia de la experiencia II, sino que se procedió a tomar tres muestras en la segunda hora. Esto se realizó a fin de estandarizar este método de disponibilidad mineral como se propuso en la acción concertada nº 10 del proyecto europeo FLAIR.

Las fracciones de calcio dializado, no dializado soluble y precipitado obtenidas para la fórmula A (tabla 53), tanto en polvo como líquida esterilizada convencionalmente, son del mismo orden que las correspondientes de la fórmula en polvo y líquida que se estudiaron en la experiencia II en la hora 2 y cuando no se aplicó calentamiento, ya que se trató de la misma marca comercial (tabla 15, 16 y 17). Como se puede apreciar en la tabla 53, las formas solubles de calcio tendieron a ser superiores con la fórmula líquida A respecto a la misma en polvo, apareciendo diferencia significativa en este ensayo para el calcio no dializado soluble. Sin embargo, la disponibilidad de calcio se modificó más por la marca comercial que por el hecho de que el preparado fuera deshidratado o esterilizado convencionalmente por UHT.

Michel y col. (1993) realizaron un estudio "in vitro" de la solubilidad de calcio durante la fabricación de las fórmulas para lactantes. Los resultados ponen de manifiesto que la pasteurización no parece influir en la solubilidad del calcio. Sin embargo, ésta es menor en fórmulas esterilizadas y en las deshidratadas que en mezclas tratadas a menor temperatura (70°C) debido, probablemente a que se produce una mayor transferencia de calcio y fosfato a la fase coloidal.

Es probable que las diferencias asociadas al preparado A ó B , se deban a su diferente composición. En este sentido, algunos autores han estudiado la influencia de la modificación de las sales minerales sobre la disponibilidad in vitro de diversos minerales (Alegria y col., 1997) incluyendo el calcio (Roig, 1997, Aarle y col., 1997). Según Aarle y col. (1997) la matriz del alimento afecta a la dialisis de calcio tanto como la fuente mineral; aunque dichos cambios no siempre afectan la absorción (Sheikh y col., 1987; Lewis y col., 1989).

4.3.3.2. Ensayos in vivo

La ingesta de calcio y su eliminación fecal no presentaron diferencias entre los grupos control y AIN76, por lo que no llegó a variar la absorción aparente de calcio, aunque se elevó significativamente su eficacia de absorción en los animales del grupo control (Tabla 54). Sin

embargo, en el balance las diferencias fueron más marcadas y éste se elevó debido a que las pérdidas urinarias del metal se redujeron significativamente con la dieta más calórica. En el contenido total de calcio de las ratas que tomaron esa dieta también se apreció al final del estudio un valor medio superior al de las ratas del grupo AIN76 pero las diferencias no llegaron a ser significativas (tabla 62). En consecuencia, la utilización metabólica y utilización nutritiva global fueron mayores con la dieta control respecto a la de referencia para la rata.

Parece ser que la grasa juega un papel modulador de la absorción de calcio, pero en la literatura existen variedad de resultados debidos a las distintas circunstancias experimentales: se ha indicado que cantidades muy pequeñas de grasa en la dieta dificultan la absorción intestinal de calcio y mayores cantidades, dentro de ciertos límites, la favorecen (Kies, 1985). Pero Kaup (1990) observó que la edad también condicionaba dicha influencia; en ratas jóvenes era mínima pero en las más maduras una elevación de la grasa dietética del 5% al 20% redujo la absorción y retención cálcicas. Otros datos en humanos indican que un incremento de la cantidad de grasa de la dieta desde el 22% al 42% no altera la utilización nutritiva de este mineral (Van Dokkum, 1983).

Las ratas que tomaron dietas que contenían fórmula infantil, mostraron una menor ingesta cálcica respecto a las que tomaron la dieta central, pero ésta no varió en función del procesamiento industrial de cada una de ellas.(tabla 55). Tampoco se observaron diferencias en la excreción fecal de calcio debidas al tipo de fórmula, que fue significativamente más baja en todos los grupos respecto al control. Esto se produjo de tal modo que la digestibilidad se incrementó debido al consumo de fórmula infantil y, aunque la cantidad de calcio absorbida fue algo menor que con la dieta control, sólo se apreciaron diferencias significativas en el caso de las ratas que tomaron en su dieta la fórmula B en polvo.

La eliminación urinaria de calcio en el período de balance se situó en el rango que señalan otros autores (García-Arias y col., 1994; Aguirre, 1995), y fue muy parecida en los cuatro grupos que tomaron los preparados para lactantes, apareciendo diferencias significativas exclusivamente entre el grupo que tomó una dieta que incluía la fórmula UHT y el control.

La retención de calcio se redujo, en comparación con el control, en los dos grupos que tomaron fórmula en polvo (tabla 55).

Este último resultado está de acuerdo con estudios llevados a cabo en ratas a las que se les administraba dietas que contenían lactulosa durante aproximadamente mes y medio; la presencia de este compuesto incrementó la retención de calcio, magnesio, hierro cobre y zinc (Suzuki y col. 1985, 1986). En nuestro caso, las fórmulas líquidas contenían al menos 10 veces más lactulosa que las fórmulas en polvo (tabla 48), quedando las dietas preparados a partir de la fórmula A líquida esterilizada y B líquida UHT con un contenido de lactulosa final de 1.5% y 0.5%, respectivamente. La bibliografía indica que la incorporación de lactulosa al 0.5% en fórmulas infantiles es suficiente para incrementar significativamente la población de bifidobacteria en ratas al cabo de cinco semanas (Nagendra y col. 1992; Mizota y col., 1987), y que la absorción de minerales es más elevada al preponderar la flora bífida (Pahwa y Mathur, 1982). Posiblemente debido a que nuestro período experimental fue más corto y a que las concentraciones de lactulosa no fueron muy altas, el aumento de absorción y retención asociado al consumo de los dos preparados líquidos no se apreció con nitidez, y en ningún caso se observaron diferencias significativas entre preparados en polvo y líquidos sino sólo en comparación con el grupo control.

Por otro lado, en el estudio que se realizó utilizando las fórmulas en polvo A y líquida esterilizada A, como único alimento de ratas lactantes (tabla 19) se observó un incremento de la digestibilidad cálcica asociado a la fórmula esterilizada, que sin embargo no fue capaz de mejorar la absorción ni retención del elemento, por lo que podría apuntarse que el posible efecto favorecedor de la absorción atribuido a la lactulosa fue muy leve en las condiciones de ese ensayo. Estos resultados estarían en concordancia con trabajos posteriores de Nagendra y col. (1994), que administraron a ratas dietas sin o con un 0.5% ó 1% de lactulosa y observaron que la presencia de este compuesto no repercutió sobre el balance de calcio ni sobre los índices %A/I y %R/I.

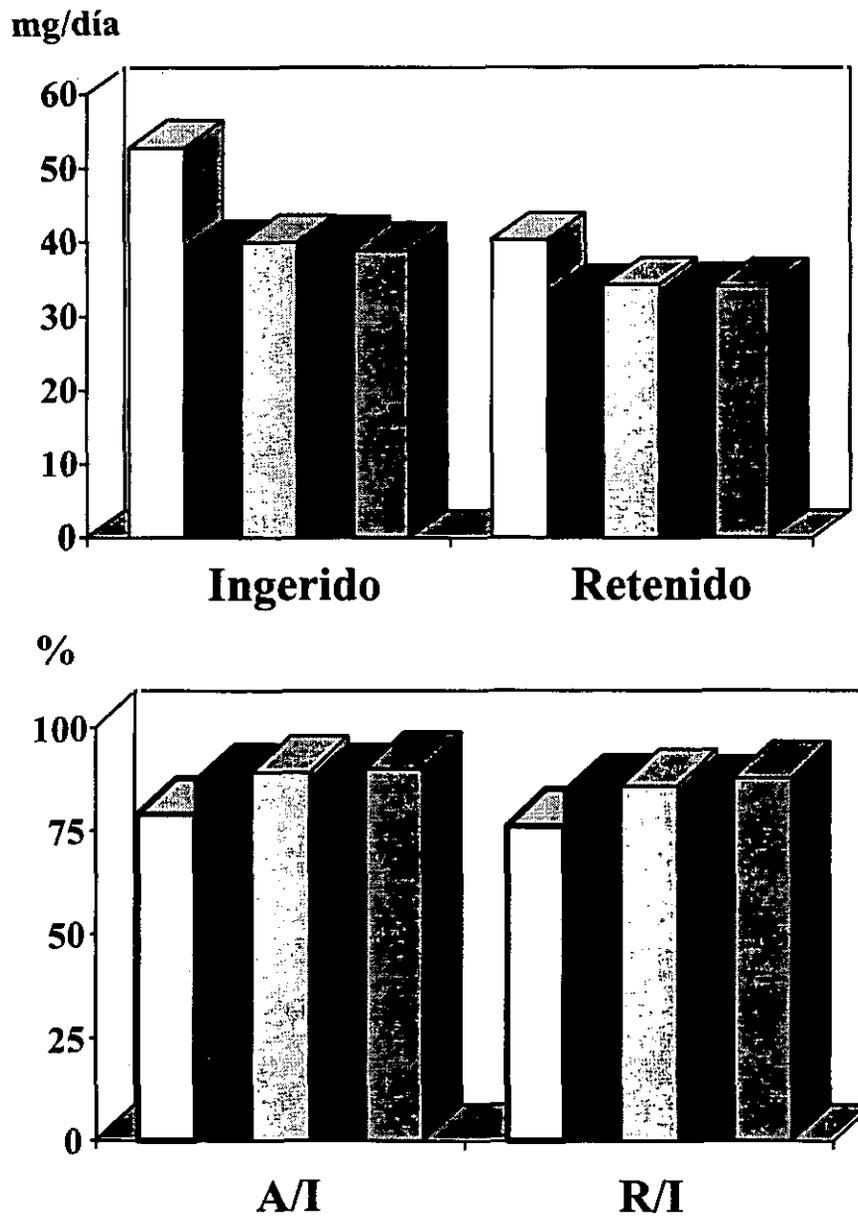


Figura 25. Utilización digestiva y nutritiva de calcio

Ratas alimentadas con la dieta control □ o dietas que contenían fórmulas:
 A polvo ■ A liq. esterilizada ■ B polvo □ B liq. UHT ■

Esa pequeña diferencia en los valores de absorción y retención entre las ratas que consumieron fórmulas en polvo y líquidas, también podría interpretarse porque el contenido relativamente mayor de productos iniciales de la reacción de Maillard en las fórmulas deshidratadas (tabla 44) dificulte en alguna medida la absorción de este mineral. Sin embargo, parece ser que estos compuestos son absorbibles y su interferencia se produciría a nivel metabólico, como se observó en el ensayo realizado con ratas lactantes. Cabría esperar una repercusión más acusada del consumo de la fórmula A líquida esterilizada sobre la biodisponibilidad de calcio, teniendo en cuenta que fue la que presentaba mayor daño térmico (tabla 44 y 45), y se ha señalado que la calidad de las proteínas ingeridas afecta a la utilización nutritiva del calcio (Aspe, 1992). Eso seguramente no se ha detectado al haber utilizado la fórmula en combinación con la dieta AIN 76.

Tampoco se detectaron diferencias en el contenido total ni en la concentración corporal de calcio debidos al tipo de fórmula (tabla 63). Las ratas del grupo control contenían una cantidad algo superior que las de los grupos que consumieron fórmula, pero debido al número de animales utilizados para este análisis y a la dispersión de los resultados, no se produjeron diferencias significativas. La concentración sérica de calcio no varió por el tratamiento dietético y se situó entre 8 y 11 mg/dl (tabla 64), lo que ha de ser reflejo de la estricta regulación hormonal que impidió grandes oscilaciones en la calcemia. (Federation of American Societies for Experimental Biology, 1961; Touverud y Boass, 1979)

4.3.4. Biodisponibilidad del fósforo

4.3.4.1. Ensayos in vitro

Los ensayos de disponibilidad in vitro de fósforo revelaron una influencia del tipo de fórmula en las fracciones de dializado y no dializado soluble (tabla 56). Los valores fueron del mismo orden que sus homólogos estudiados en la experiencia II en el caso del preparado A en polvo y algo menores para el líquido esterilizado (tabla 20). Estas pequeñas diferencias

de magnitud parecieron responsables de que no se obtuviera en este ensayo una mayor disponibilidad *in vitro* del fósforo del preparado para lactantes líquido producido mediante esterilización convencional frente al mismo obtenido por deshidratación, que se describió en el apartado correspondiente. Solamente se produjeron diferencias significativas en el dializado y no dializado soluble entre las dos fórmulas en polvo, mostrando la fórmula A un porcentaje de fósforo dializado superior y paralelamente una menor proporción de fósforo no dializado soluble. Tampoco varió el fósforo presente en las fracciones obtenidas de la digestión de las otras dos fórmulas. No se observaron diferencias significativas en el precipitado.

Estos resultados indicarían que la única influencia detectable se debió a la marca del preparado, tal como ocurrió en el calciopero que aquí fue más leve, pero no a la cantidad de fósforo que prácticamente fue idéntica en los preparados de una u otra marca comercial. Por su parte, el tratamiento térmico empleado en su fabricación tuvo un efecto mínimo.

4.3.4.2. Ensayos *in vivo*

Respecto a la dieta recomendada para la rata, el consumo de nuestra dieta control no modificó significativamente la ingesta de fósforo. Las ratas que consumieron esta dieta eliminaron mucho menos fósforo por heces, siendo superior el coeficiente de digestibilidad (tabla 57). No obstante, la cantidad absorbida no varió significativamente entre los dos grupos. Nagendra y col. (1994) en sus estudios en ratas lactantes a las que administraron una fórmula infantil con un contenido graso del 20%, también obtuvieron un porcentaje de absorción para este mineral en torno al 97%; mientras que en otros estudios efectuados con dietas con contenidos grasos inferiores, se han descrito digestibilidades de fósforo menores que las encontradas en el presente trabajo (García-Arias y col. 1994; Aguirre, 1995; Pérez-Granados y col., 1997).

La influencia de la grasa en la absorción de fósforo se ha atribuido a la competencia existente con otros minerales, por ejemplo el calcio, para unirse con los ácidos grasos y formar compuestos insolubles; al existir más grasa en el lumen el calcio tiende a formar

jabones insolubles, más fácilmente que el fósforo, y éste último quedaría libre para poder absorberse mejorándose así su eficacia digestiva (Fakambi y col., 1969; Kaup y col., 1990). Sin embargo, esta interacción calcio-fósforo no parece haberse producido en estos ensayos, ya que la absorción de calcio no se vio dificultada por la ingestión de la dieta hipergrasa, sino que como la del fósforo también tendió a elevarse. Probablemente en nuestras condiciones experimentales el nivel de grasa del 14% no fue lo suficientemente elevado para insolubilizar al calcio e impedir su absorción, y estaría en la línea de las observaciones que señalan un afecto favorecedor de una elevación moderada de la cantidad de la grasa en la dieta.

Pero no solamente la eficacia de absorción se vio favorecida por el consumo de la dieta hipercalórica, sino que también se elevó la retención del elemento, a través de una disminución de sus pérdidas urinarias, incrementándose sus coeficientes de utilización metabólica y utilización nutritiva. En ensayos en los que se han empleado dietas con un contenido lipídico entre el 5 y el 8%, se han descrito balances diarios de fósforo de aproximadamente 30 mg/día (García-Arias, 1994; Aguirre, 1995), parecidos a los que se hallaron con la dieta AIN76. La elevación de dicho valor con el incremento de la grasa dietética en nuestro estudio podría relacionarse con las variaciones similares de la utilización nutritiva de la proteína que se han descrito con anterioridad, ya que se ha indicado que entre el fósforo y el nitrógeno retenido por el organismo existe una correspondencia (Harrison, 1984); o con las de otros elementos como el calcio, cuya utilización metabólica también mejoró con la dieta control, frente a la AIN 76, y que junto con el fósforo es un constituyente estructural indispensable para el hueso (Hested y col., 1981; Avioli., 1988; Baker y col., 1994).

El consumo de las fórmulas infantiles condicionó una disminución de la ingesta de fósforo respecto al control y a la vez tendió a eliminarse una mayor cantidad de este elemento por heces (tabla 58), significativamente sólo para el grupo cuya dieta contenía el preparado B en polvo, quizá debido a su ingesta ligeramente superior. Este comportamiento condicionó que la absorción en valor absoluto y relativo disminuyera significativamente en los cuatro grupos

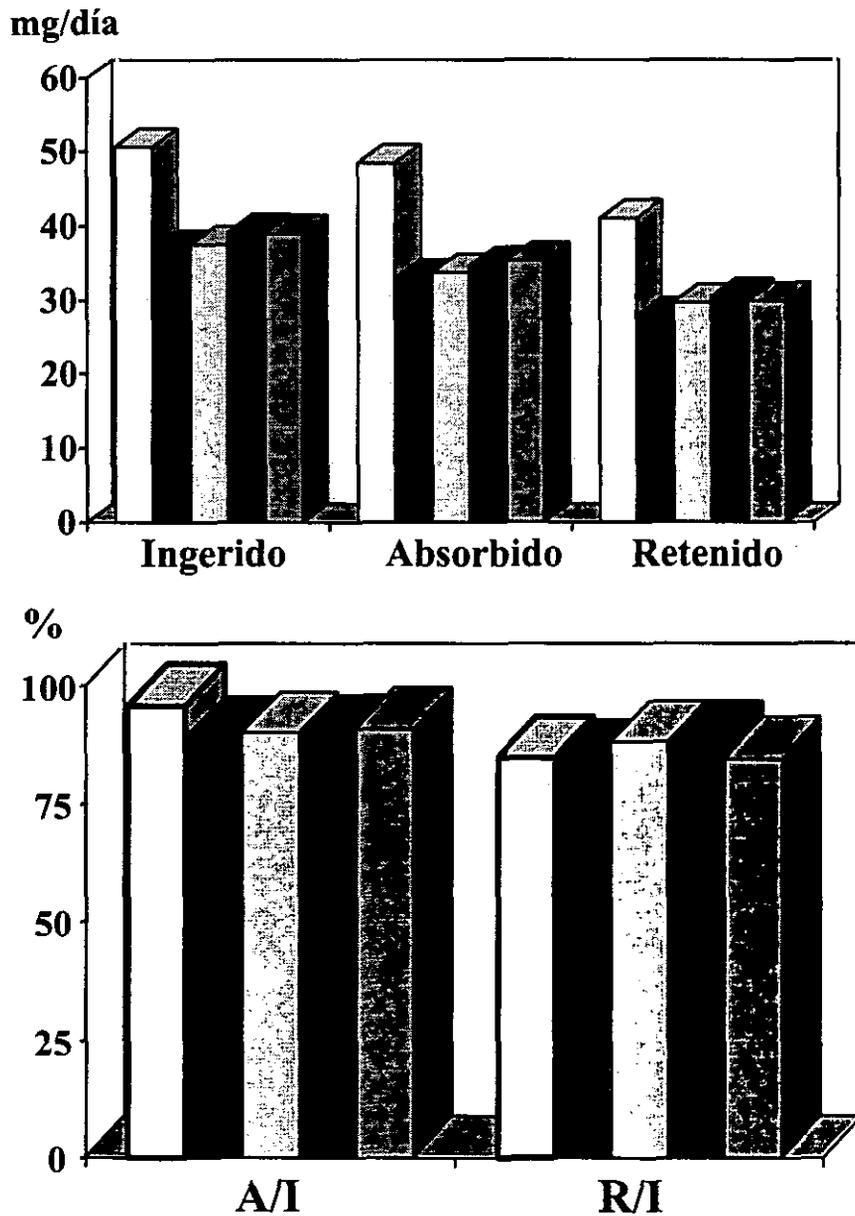


Figura 26. Utilización digestiva y metabólica de fósforo

Ratas alimentadas con la dieta control □ o dietas que contenían fórmulas:
 A polvo ■ A líq. esterilizada ■ B polvo □ B líq. UHT ■

respecto al control. Sin embargo, la inclusión de una u otra fórmula infantil en la dieta no repercutió en la absorción de fósforo (figura 26).

La eliminación urinaria de este elemento en ratas alimentadas con las dietas que contenían las fórmulas infantiles fue inferior que la de las ratas controles aunque sin diferencias significativas cuando se trató del preparado B-UHT; aún así la retención en los cuatro grupos que tomaron fórmulas infantiles fue significativamente más baja que la del grupo control y las utilidades metabólicas fueron del mismo orden. El análisis estadístico de los coeficientes R/A y R/I indicó que las diferencias entre los grupos estaban al borde de la significación estadística; pareció que la utilización metabólica de fósforo estaba disminuida por el consumo de la fórmula deshidratada A respecto a su homóloga líquida esterilizada (figura 26), lo que se acusó en la utilización nutritiva. La utilización nutritiva de la proteína varió en el mismo sentido, lo que nos permitiría pensar existió una causa común teniendo en cuenta además que el metabolismo de estos dos nutrientes está relacionado (Harrison, 1984); el elevado contenido de productos iniciales de la reacción de Maillard originados durante la deshidratación, que habrían podido absorberse sería el causante de la pequeña disminución de la utilización metabólica de la proteína y del fósforo. En el contenido corporal total de fósforo no se apreció ninguna diferencia (Tabla 63).

Coincidiendo con la literatura, los distintos contenidos de lactulosa de los preparados en polvo y líquidos no parecen tener ninguna influencia sobre la biodisponibilidad de fósforo (Nagendra y col. 1994). Además, Reddy (1972) observó que la absorción y retención de fósforo eran similares en ratas libres de gérmenes y en las de referencia, por tanto parece que la absorción de este mineral no depende ni de la flora intestinal ni del pH. Cuando administramos los preparados en polvo y líquido esterilizado de la marca A a ratas lactantes como único alimento, tampoco observamos cambios importantes en las eficacias de utilización digestiva, metabólica y nutritiva global debidos a la forma de presentación y en este ensayo las diferencias encontradas también son leves. De hecho, la literatura consultada referente a tratamientos térmicos y reacción de Maillard no destaca una influencia manifiesta sobre la biodisponibilidad de este elemento, por lo que no es de extrañar que en el presente trabajo no se modifique la utilización nutritiva del mismo por el consumo de las distintas dietas que contenían fórmulas infantiles elaboradas utilizando diferentes procesos industriales.

4.3.5. Biodisponibilidad del magnesio

4.3.5.1. Ensayos in vitro

Como se puede apreciar en la tabla 59, las diferencias más importantes en la disponibilidad in vitro de magnesio, se debieron a la marca, la fórmula B tanto líquida como en polvo permitió una dialisis de magnesio significativamente menor que la fórmula A en cualquiera de sus presentaciones, y estas fueron del mismo orden de las referidas a la experiencia II (tabla 23). Y por el contrario, la fracción de no dializado soluble fue significativamente mayor en los dos preparados de la fórmula B. En consecuencia, el magnesio soluble total procedente de la digestión de las cuatro fórmulas infantiles estuvo bastante próximo, lo cual se pone de manifiesto también a través del estudio de su precipitado, que fue sólo significativamente inferior en el caso de la fórmula B-UHT. Esta influencia de la marca comercial en la disponibilidad mineral recuerda la que se produjo también para el calcio y con menor intensidad para el fósforo, y podría explicarse porque en la elaboración de estos alimentos infantiles se han empleado diferentes sales minerales como permite la normativa actual, aunque el aporte de cada elemento sea equivalente. Sobre este tema, se ha descrito que este método de disponibilidad in vitro puede detectar cambios de solubilidad en función de la forma química del elemento (Lindberg y col., 1990; Fine y col., 1991), aunque es posible que dichos cambios no se traduzcan en variaciones de la absorción in vivo, y en este sentido los estudios de Ranhotra y col. (1976) y Cook (1973) dieron como resultado que el magnesio en forma distintas sales inorgánicas (sulfato, óxidos, silicato, fosfato, carbonato) y orgánicas (lactato, citrato y acetato) administrado a ratas al destete mostraba una biodisponibilidad equivalente.

4.3.5.2. Ensayos in vivo

La ingesta de magnesio de los animales del grupo control y AIN 76 fue parecida pero los segundos presentaron una eliminación fecal del mineral que fue prácticamente el doble y por lo tanto significativamente mayor reduciéndose marcadamente el coeficiente de digestibilidad; no obstante, debido a las cantidades excretadas eran pequeñas, 1.24 y 2.16 mg/día, no llegó a variar la absorción (tabla 60). Nuestros resultados coinciden con los de Watkins y col. (1992) que administraron una mezcla de grasas compuesta de manteca, aceite de maíz y aceite hidrogenado de coco al 1.5, 5 ó 10% a ratas y no obtuvieron efectos de la cantidad de grasa sobre la absorción de magnesio. La eliminación urinaria de magnesio también fue significativamente distinta pero con respecto a este parámetro, la del grupo control fue mayor, lo cual tampoco alteró su retención diaria. Por último, la utilización nutritiva tendió a incrementarse en el control ($p=0.058$). Estos resultados podrían ser sorprendentes ya que existe una mayor posibilidad de formación de jabones de magnesio en el intestino de los animales del grupo control, dado que su dieta contiene una mayor cantidad de grasa. Sin embargo, este efecto depende también de la concentración de calcio, y parece ser que los ácidos grasos libres forman preferentemente jabones con este mineral que con el magnesio. Así, Kaup y col. (1990) observaron que administrando a ratas jóvenes dietas con cantidades elevadas de grasa y de calcio, el magnesio se absorbía mejor. En nuestro estudio, sin embargo, todos los elementos mayoritarios se absorbieron bien con la dieta del 14% de grasa quizá porque ese nivel lipídico no era tan excesivo.

Las ratas alimentadas con las dietas que contenían fórmulas ingirieron una cantidad de magnesio inferior que las que consumieron la dieta control, aunque en el caso de la dieta B-polvo no se alcanzó el nivel de significación establecido ; $p<0.05$ (tabla 61). Debido a que la eliminación fecal de magnesio en los cuatro grupos experimentales también fue significativamente más baja en relación al control, la absorción resultante fue similar, excepto la del grupo que tomó la fórmula A polvo que fue menor. En definitiva, las eficacias de absorción en todos los grupos fueron del mismo orden y solo se diferenciaron significativamente las correspondientes a la fórmula A líquida esterilizada y A polvo, siendo la primera mayor.

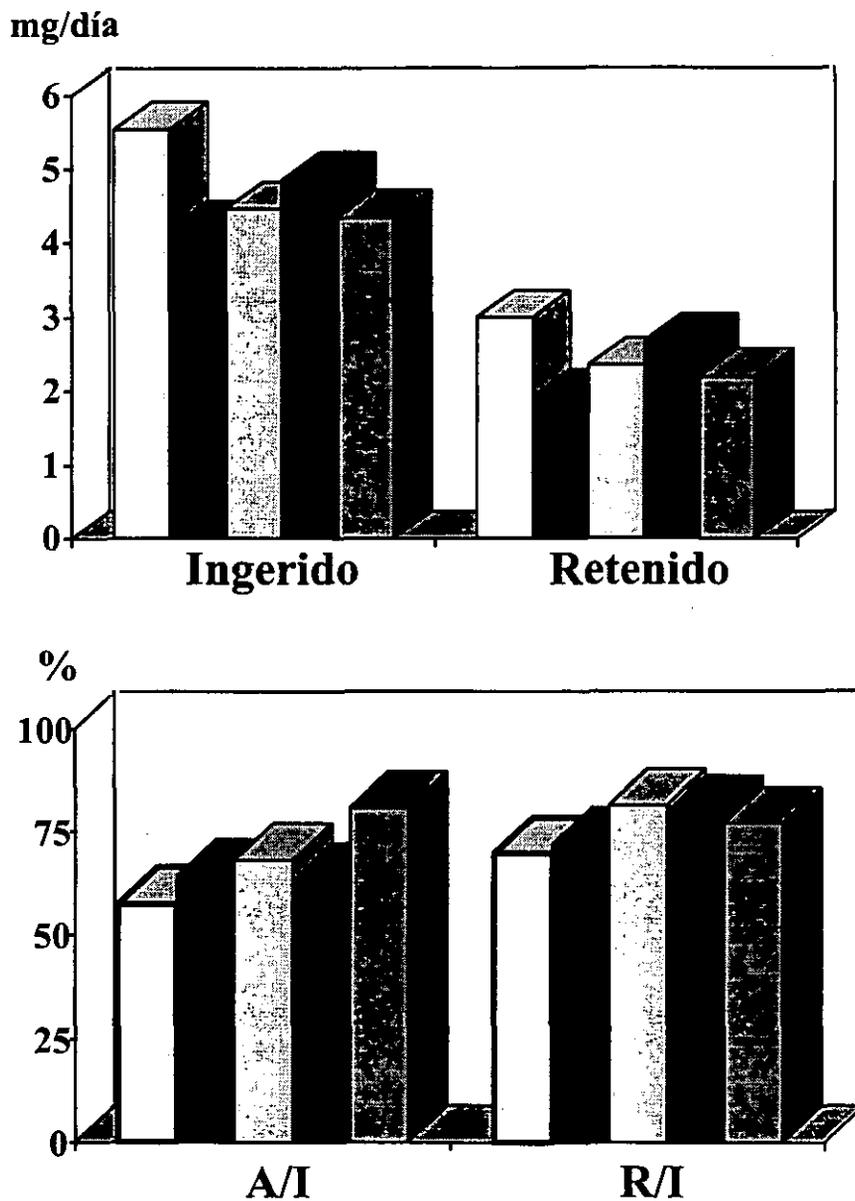


Figura 27. Utilización digestiva y nutritiva de magnesio

Ratas alimentadas con la dieta control □ o dietas que contenían fórmulas:
 A polvo ■ A líq. esterilizada ■ B polvo □ B líq. UHT ■

La eliminación de magnesio a través de la orina fue bastante uniforme en todos los casos, y el balance disminuyó respecto al control en los grupos que tomaron la dietas que contenían la fórmula A polvo y la B-UHT (figura 27); en éste grupo último debido fundamentalmente a que la ingesta fue algo inferior y en primero sobre todo a que la eficacia de utilización metabólica fue significativamente menor respecto al control, y también quizá a que su ingesta fue inferior. A primera vista estos resultados no coinciden completamente con los de la experiencia II donde el parámetro %A/I fue significativamente mayor en los animales que tomaron la fórmula en polvo frente a la esterilizada (tabla 25). Estos resultados se podrían explicar teniendo en cuenta la distinta edad de las ratas empleadas en cada modelo experimental: en las ratas lactantes el magnesio es transportado por un mecanismo pasivo, exclusivamente, a través de la mucosa intestinal (Lønnerdal y col., 1993) de manera que la mayor ingesta de este mineral por parte de los animales que tomaron la fórmula en polvo condicionó que sus índices anteriormente indicados también fueran más altos (tabla 25). Sin embargo, en el modelo correspondiente a la experiencia III, las ratas eran mayores y por lo tanto además del sistema de transporte pasivo también contaban con un sistema de transporte activo bien desarrollado.

Teniendo presente que las variaciones aquí descritas son muy leves y que no se han detectado en ningún momento diferencias debidas al tipo de procesamiento industrial aplicado en la fabricación de las fórmulas infantiles estudiadas, podríamos indicar que estos resultados son parecidos a los obtenidos en el balance de fósforo y nitrógeno, donde también se encontró que la utilización nutritiva y/o metabólica tendía a disminuir con la dieta que contenía la fórmula A polvo (tablas 55 y 58). El estudio de marcadores de daño térmico reveló que dicha fórmula contenía determinada cantidad de productos iniciales de la reacción de Maillard, los cuales pueden absorberse en el organismo (Langedries, 1992; Hurrell, 1990) y proteínas alteradas, y es posible por tanto que la alteración proteica debida al daño térmico haya tenido alguna repercusión en las utilidades nutritivas de nitrógeno y los minerales relacionados: magnesio, componente esencial del músculo y del esqueleto (Saeedy col., 1994) y fósforo, constituyente fundamental del hueso y cuya retención se produce paralelamente a la del nitrógeno (Harrison, 1980).

La concentración sérica de magnesio no se afectó por ninguno de los tratamientos estudiados (tablas 64 y 65), y estuvieron de acuerdo con los valores normales citados en la bibliografía (Saeedy col., 1994; Pérez Granados, 1997).

4.3.6. Biodisponibilidad del Hierro

4.3.6.1. Ensayos in vitro

Los valores de hierro obtenidos para el dializado, no dializado soluble y precipitado de la fórmula A fueron bastante parecidos a los de la experiencia anterior (tabla 28), aunque se puede observar que en ésta se favorecieron ligeramente las formas no dializadas solubles a costa fundamentalmente del precipitado (tabla 66). En diversos trabajos referentes a la dializabilidad del hierro de distintos alimentos o dietas no suelen indicarse los valores correspondientes al hierro que no dializa; por lo que se refiere al dializado, los porcentajes reseñados varían mucho de un estudio a otro. Concretamente Alegría y col., (1997) en cinco tipos de fórmulas infantiles, que diferían en su base proteica, hallaron porcentajes de diálisis de hierro mucho menores que las de esta memoria, siendo mayores para la fórmula a base de hidrolizado proteico, 16,8%.

Tras la digestión in vitro de las cuatro fórmulas ensayadas no se produjeron diferencias en ninguna de las fracciones. Es decir, las presentaciones en polvo y líquidas de los preparados infantiles estudiados no influyeron en la disponibilidad in vitro de este metal. A diferencia del calcio y el magnesio, la distribución del hierro en las distintas fracciones durante la digestión simulada no pareció modificarse por el tipo de marca del preparado, lo que podría ser la consecuencia de que el tipo de sal de hierro empleada y la presencia de otros componentes que afectan su disponibilidad, debió de ser muy semejante en ambos preparados infantiles.

4.3.6.2. Ensayos in vivo

La ingesta de hierro de las ratas que consumieron la dieta control fue ligeramente mayor que la correspondiente de las alimentadas con la AIN 76, debido a las diferencias en la ingesta alimentaria ya comentadas, al igual que su eliminación por heces y su absorción aparente; pero en ninguno de estos parámetros las diferencias fueron significativas (tabla 67). Sin embargo, sí fue significativamente inferior la excreción urinaria de hierro del grupo control, pero ya que las pérdidas urinarias de este metal son cuantitativamente muy pequeñas y no constituyen una vía normal de regulación homeostática (Linder 1988; Hurrell, 1997), no llegó a incrementarse el balance significativamente y sólo se produjo una elevación significativa del coeficiente de utilización metabólica.

Al final del experimento, el contenido corporal de hierro en valor absoluto y relativo no varió (tabla 74), ya que tampoco lo hizo la retención diaria o balance. Asimismo, el hierro hepático que fue algo mayor en valor absoluto y relativo en el grupo control no llegó a diferenciarse significativamente del grupo de referencia (tabla 76). La concentración sérica (tabla 82), hemoglobina y hematocrito (tabla 83) permanecieron inalterados y estuvieron dentro de la normalidad (Saiz, 1983).

Nuestros resultados se verían refrendados por los de Van Dokkum y col. (1983) que no observaron modificaciones sobre la absorción de hierro en humanos debidas a los niveles de grasa dietética. Por el contrario, otros autores señalan que la absorción aparente de este metal mejora con un mayor porcentaje de grasa en la dieta (Kauffman y col., 1987; Sorensen, 1965; Boweing y col., 1977; Mahoney y col., 1980; Mahoney y col., 1980; Kies, 1988), y que una alimentación abundante en grasas saturadas produce un balance de hierro mucho más positivo que otra idéntica pero rica en grasas poliinsaturadas (Van Dokkum y col., 1983). En este ensayo, ambas dietas contenían aceite de maíz como fuente de grasa y por tanto principalmente la cantidad, 5 o 14%, y no el tipo de grasa sería el determinante de las diferencias encontradas.

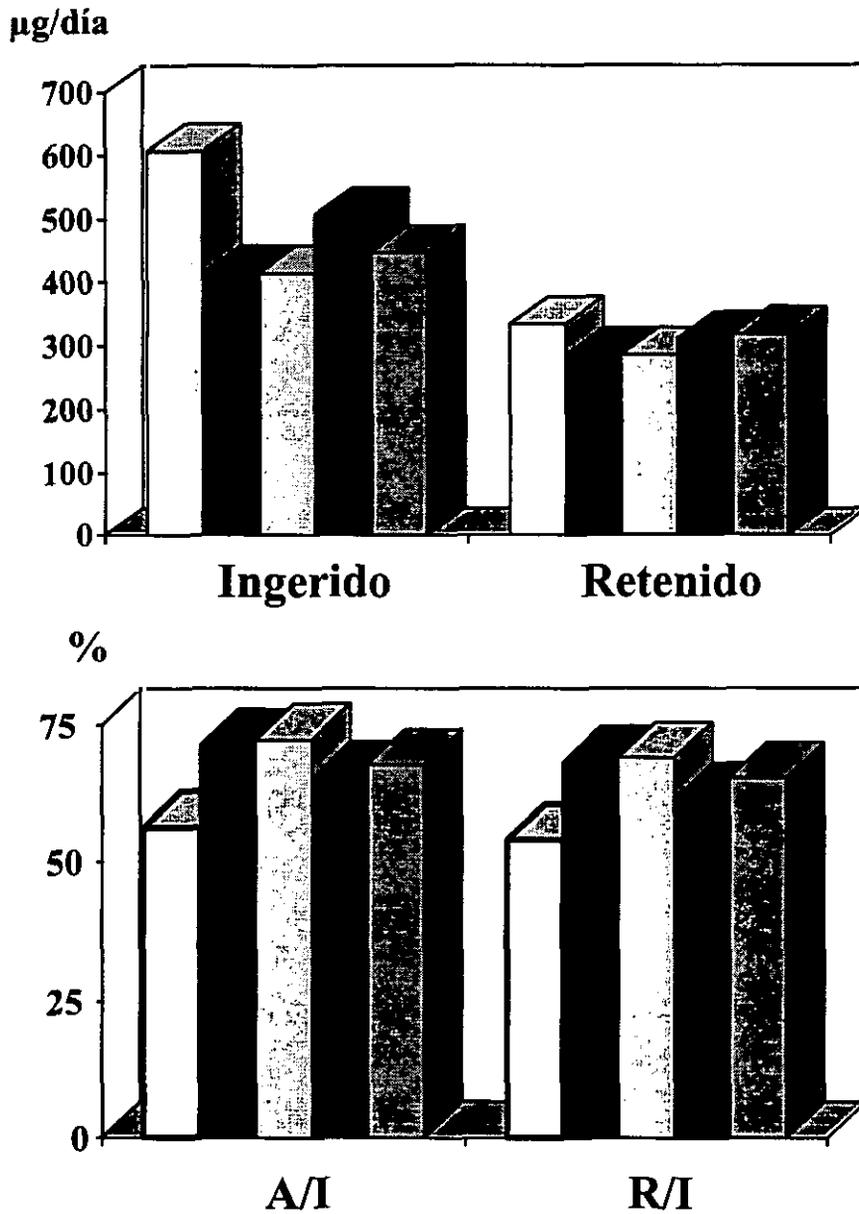


Figura 28. Utilización digestiva y metabólica de hierro

Ratas alimentadas con la dieta control o dietas que contenían fórmulas:
 A polvo A líq. esterilizada B polvo B líq. UHT

Las ratas que tomaron en su dieta fórmula infantil ingirieron menor cantidad de hierro que las del grupo control porque tomaron menos cantidad de alimento (tabla 68). También eliminaron menos hierro por heces, existiendo cierto paralelismo entre la ingesta y la eliminación fecal en los grupos experimentales, como también se muestra en la estabilidad de los coeficientes de utilización digestiva que no varió por el tipo de fórmula consumida (fig. 28). Así, las ratas cuya dieta contuvo la fórmula A en polvo fueron las que excretaron mayor cantidad del metal pero las absorciones aparentes fueron similares en todos los grupos. Por otro lado, el hecho de que la absorción de hierro de los animales del grupo control se situara en valores similares a los de los grupos experimentales, y que los porcentajes de absorción se incrementaran debido a la presencia de los preparados para lactantes, sugiere un efecto positivo de algunos componentes de dichos preparados sobre la biodisponibilidad de este micronutriente.

a) El tipo de grasa. Según Lukaski y col. (1982) y Van Dokkum y col. (1983) una alimentación abundante en grasas saturadas produce un balance de hierro mucho más positivo que otra idéntica pero con una proporción elevada de grasas poliinsaturadas. También los resultados de Chao y Gordon (1983) apoyan esta hipótesis, ya que en sus estudios en ratas observaron un descenso de la absorción del elemento en las dietas a base de grasa de pescado. Las ratas alimentadas con las dietas que contenían fórmulas infantiles ingirieron una grasa con una relación de ácidos grasos insaturados/saturados más baja, que la correspondiente a la dieta control, porque dicho cociente en las fórmulas infantiles utilizadas fue de 1,3-1,5 y aproximadamente 2 en la dieta cuya grasa era aceite de maíz.

b) Tipo de proteínas. La caseína se ha descrito como una proteína poco favorecedora de la absorción de hierro, frente a la proteína de la carne y el pescado (García-Arias, 1991; Aspe, 1992). Debido a la presencia de proteínas séricas y caseína en las fórmulas infantiles las dietas elaboradas con ellas habrían estimulando la absorción del micronutriente respecto a la dieta control para la rata que contiene como única proteína caseína láctica. Los mecanismos por los que el tipo de proteína influye en la absorción de hierro no están claros. Kapsokefalou y Miller (1993) afirmaron que la presencia de carne en la dieta aumentaba la

absorción del metal, y se habla del denominado "efecto carne" que sería el resultado de una interacción entre las fracciones magras y grasas de este alimento. La interacción puede ocurrir en el lumen; los productos de la digestión de la proteína y de la grasa podrían participar en una secuencia de hechos que darían como consecuencia la reducción del hierro y se sabe que este hecho aumenta la absorción del elemento (Muir y col., 1984; Wollenberg y Rummel, 1987; Wien y Van Campen, 1991). Esta reducción del hierro vendría seguida del acomplejamiento del hierro ferroso por los ácidos grasos libres, formándose complejos lipofílicos que atravesarían rápidamente las membranas de las células de la mucosa, pero este hecho parece estar relacionado con la carne, y también con el pescado, cordero, cerdo y el pollo (Hurrell, 1997). La cisteína es el único aminoácido libre que parece que tiene un efecto semejante (Taylor y col., 1986), ya que presenta la capacidad de quelar el hierro y reducirlo a hierro ferroso que es más soluble (Hurrell, 1997).

Según todo ello, la conjunción la grasa y la proteína en las dietas que contenían fórmulas infantiles ha podido ejercer ese efecto positivo en la absorción del hierro no hémico.

c) Ácido ascórbico. La presencia de un mayor contenido de vitamina C en las dietas que contenían fórmula infantil respecto a la dieta control ha podido activar la absorción de hierro; este efecto parece que es muy importante tanto cuando se trata de la vitamina en su estado nativo, como se encuentra en la frutas y las verduras (Ballot y col., 1987), como si se añade en forma libre (Cook and Monsen, 1977). Pero hay que considerar que este compuesto se reduce cuantitativamente cuando el alimento es procesado y almacenado (Hurrell, 1992).

A pesar de lo antedicho en la cantidad de hierro absorbida las diferencias entre los grupos de fórmula infantil y el control no llegaron al nivel de significación sino que los grupos experimentales tendieron a presentar menor absorción (tabla 68). Igualmente, la retención o balance no varió significativamente (fig. 28), aunque los animales del grupo que tomó la fórmula B en polvo excretaron mayores cantidades de hierro por orina, probablemente porque fueron los que comieron más. Respecto al coeficiente de utilización metabólica, se

produjo una diferencia significativa entre las dos formas de presentación del preparado B, a favor de la UHT.

Por último, cabe indicar que la utilización nutritiva del hierro de las dietas que contenían fórmula infantil fue en general superior a la de la dieta control (fig. 28), especialmente debido a su elevada digestibilidad, pero que en este índice se acusó esa mayor eliminación fecal y urinaria del elemento con la dieta que contenía la fórmula B en polvo, porque para este grupo la utilización nutritiva del elemento no difirió de la del grupo control, pero en ningún caso se produjeron variaciones de la absorción o retención aparentes del metal.

Aspe (1992) estudió la influencia del consumo de dietas que contenían caseína y aceite calentados con o sin adición de glucosa y fructosa sobre la utilización nutritiva del hierro en ratas en período de crecimiento, y obtuvo que sólo el calentamiento de la caseína ya originaba un aumento de las pérdidas urinarias del metal y disminuía el índice de utilización metabólica, más aún cuando se trataba de la mezcla de caseína, glucosa, fructosa y aceite, que fue la que condicionó la menor utilización nutritiva. En el ensayo que se realizó con ratas lactantes que se alimentaron con la fórmula A en polvo o líquida sí se observó un empeoramiento de la utilización metabólica del hierro y de la utilización nutritiva cuando se trataba de la fórmula esterilizada, que según los análisis efectuados posteriormente, debió contener más productos de la reacción de Maillard. No obstante, en el presente ensayo dichos cambios no se han llegado a producir seguramente por haber quedado atenuados al emplear las fórmulas en combinación con la dieta de referencia y probablemente también porque los animales eran más mayores y el período experimental no muy largo.

La cantidad total de hierro presente en los hígados de las ratas al final del ensayo varió en función del peso del órgano, resultando significativamente superior en las que tomaron la fórmula líquida UHT respecto a las alimentadas con la fórmula en polvo A, aunque las concentraciones de este metal en el órgano no variaron entre los distintos grupos (tabla 77). No se produjeron diferencias en los contenidos de hierro en bazo, piel y hematíes (tabla 77), ni siquiera en las concentraciones séricas (tabla 65) y eritrocitarias de hierro (tabla 77). Sin

embargo, el análisis de hemoglobina (tabla 83) y del contenido corporal total de hierro (tabla 75) indican que el consumo de las dietas que contenían fórmula infantil era más favorable que el de la dieta control sin existir diferencias debidas al tratamiento térmico aplicado en la elaboración de estos preparados para lactantes.

En conjunto, podría decirse que la biodisponibilidad de hierro se alteró poco por la presencia en las dietas de fórmulas infantiles obtenidas por deshidratación, esterilización convencional o esterilización UHT. Cuando se comparó el preparado líquido esterilizado con su correspondiente forma en polvo en las ratas en período de lactación, se observó que el primero condicionó una peor utilización nutritiva de hierro (tabla 29) pero no se afectaron ni los contenidos tisulares (tabla 38) ni el hierro sanguíneo (tablas 37 y 43).

4.3.7. Biodisponibilidad de zinc

4.3.7.1. Ensayos in vitro

Después de dos horas de digestión pancreática el zinc dializado y no dializado, tanto soluble como insoluble (tabla 69), fue cuantitativamente similar al que se obtuvo previamente para la fórmula en polvo y esterilizada sin tratar (tabla 30). Sin embargo, en esta ocasión no se aprecia una menor diálisis con la fórmula esterilizada respecto a su homólogo en polvo, sino que las diferencias se producen entre la fórmula esterilizada y los dos preparados de la marca B y las dos fórmulas en polvo. Existió más zinc soluble pero no dializado con las fórmulas A que con las B y por el contrario el precipitado fue mayor con los preparados de la marca B. Además de estas diferencias atribuibles a la marca comercial, se observó que el zinc de la fórmula UHT se solubilizaba peor en comparación con su correspondiente fórmula en polvo, ya que el dializado y no dializado solubles eran más bajos y el precipitado mayor.

Sandström y col. (1983) indicaron que la solubilización del zinc de las fórmulas infantiles puede presentar grandes diferencias debido a que se encuentre unido en mayor o

menor proporción a la fracción grasa, algo que en nuestro estudio podría estar relacionado con las variaciones asociadas a la marca comercial. Por otro lado, los mismos autores indican que la presencia de emulsificantes en la fórmulas líquidas puede condicionar un secuestro de cationes, lo que explicaría en el caso del preparado B el mayor porcentaje de zinc precipitado y menor porcentaje soluble con la forma líquida respecto al polvo.

4.3.7.2. Ensayos in vivo

La utilización nutritiva del zinc fue muy diferente en los animales alimentados con la dieta control en relación con la dieta estandar para la rata. Las diferencias en las cantidades ingeridas no llegaron a ser significativas, pero la absorción y retención aparentes de zinc fueron muy superiores con la dieta control y también fueron bastante más altas las eficacias de utilización digestiva, metabólica y nutritiva global (tabla 70).

No obstante, dichas diferencias no quedaron patentes en los análisis efectuados en el cuerpo entero (tabla 74), o tejidos concretos (tabla 76).

Los animales que se alimentaron con la dieta que contenía la fórmula infantil A, tanto en polvo como líquida, ingirieron una cantidad de zinc significativamente menor que los del control (tabla 71), y a su vez los que tomaron las dietas con la fórmula A ingirieron significativamente menos que los que comieron la fórmula B en cualquiera de sus dos presentaciones. La eliminación fecal de zinc fue algo más alta en el grupo B polvo, significativamente frente a A líquido esterilizado. Ello afectó en alguna medida los valores de absorción, y se observó en este grupo una diferencia significativa en comparación con su homólogo la del UHT. Entre los grupos de fórmulas infantiles, la absorción correspondiente al preparado A polvo fue significativamente inferior que la del control.

La eliminación urinaria de los grupos cuyas dietas contenían fórmula infantil fue significativamente superior frente al grupo control, prácticamente el doble más baja: esto se tradujo en que dichos grupos presentaron una retención de zinc más baja, aunque sólo llegó a ser significativamente inferior para el grupo A polvo. El incremento de la zincuria se puede

a ser significativamente inferior para el grupo A polvo. El incremento de la zincuria se puede

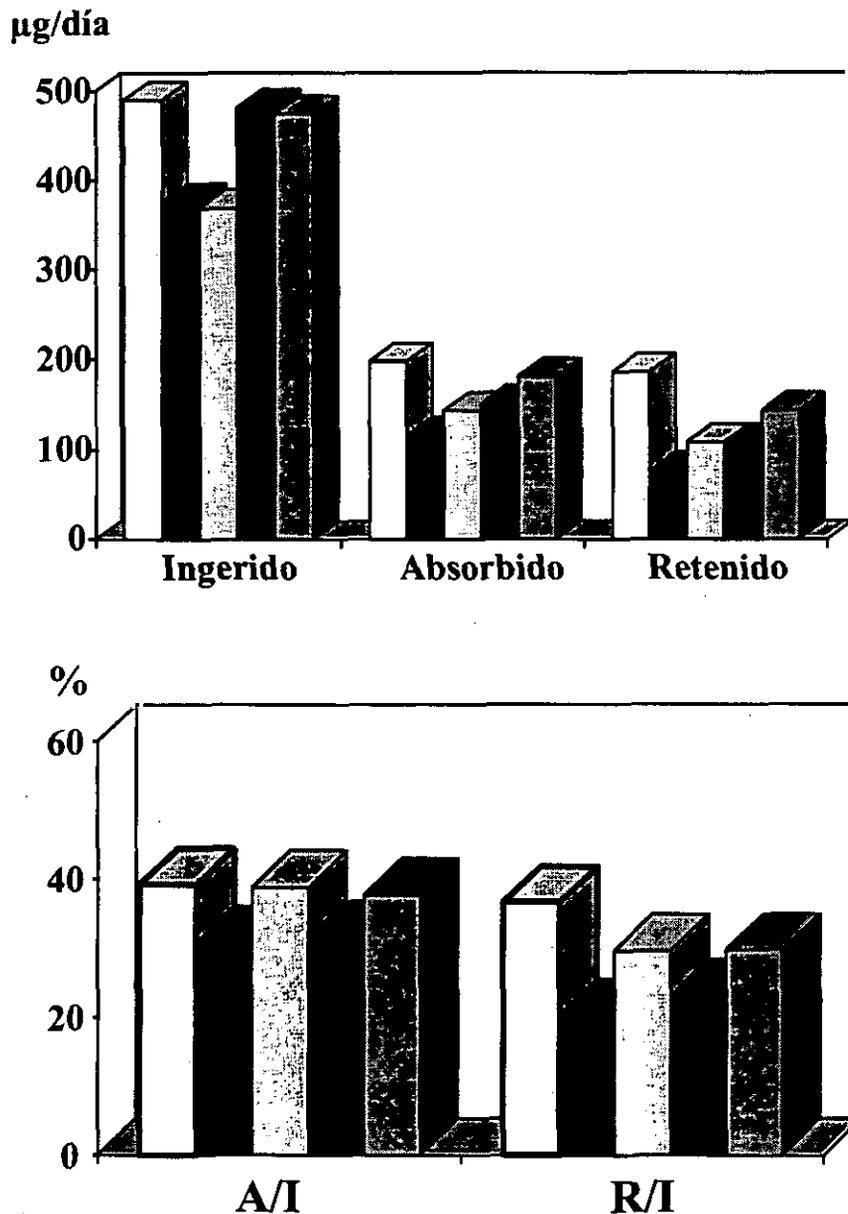


Figura 29. Utilización digestiva y nutritiva de zinc

Ratas alimentadas con la dieta control o dietas que contenían fórmulas:
 A polvo A liq. esterilizada B polvo B liq. UHT

atribuir a las premelanoidinas que quelan al zinc en el intestino o después de su absorción y son excretadas en la orina (Furniss y col., 1977). Otros muchos trabajos experimentales realizados con ratas alimentadas oralmente con dietas que contenían estos productos de la reacción de Maillard, coinciden en que las excreciones urinarias de cationes estaban elevadas y entre estos el zinc suele ser el más señalado (Furniss y col, 1986; Furniss y col., 1989; Fairwather-Tait y Symss, 1989; Hurrell, 1990). Sin embargo, el mayor o menor grado de alteración térmica en los preparados para lactantes estudiados, no afectó la excreción de zinc por orina.

El coeficiente %A/I fue ligeramente inferior en los dos grupos que tomaron una dieta que contenía fórmula en polvo; y los índices %R/A y %R/I fueron significativamente inferiores en estos dos grupos con respecto al control. Estos resultados, aunque discretos, llevan a pensar que el procesamiento industrial de deshidratación ha desencadenado la reacción de Maillard, puesto que como se ha indicado, se produce con más intensidad en medios con un bajo contenido de humedad, como quedó reflejado en los valores de furosina obtenidos para la fórmula infantil en polvo A, pero no la B, frente a las formas líquidas (tabla 71). De acuerdo con Hurrell (1990) las premelanoidinas absorbidas, son responsables de las elevadas excreciones urinarias de zinc, lo que se observaría en nuestro estudio por eso cierta disminución del coeficiente R/A, mientras que las melanoidinas, no absorbibles, interaccionarían con el elemento en el tracto gastrointestinal.

En otros estudios de la bibliografía se ha descrito que el incremento de la eliminación urinaria de zinc no conducía a cambios en los niveles tisulares de este elemento al final del período experimental debido a que a pesar de la hiperzincuria (esta ruta de excreción de zinc es minoritaria en comparación con la excreción fecal) (Hurrell, 1990; Fairweather-Tait y Symess, 1989 Teresa), ya que la homeostasis de zinc se consigue mediante pequeños cambios adaptativos en la cantidad de zinc que elimina vía fecal, bien a través de un incremento de la absorción de zinc o a través del detrimento de la excreción de zinc endógeno, o bien por ambas (Weigand y Kirchgessner, 1980; Wadam y col., 1985).

Ni la composición de los órganos analizados, ni la concentración sérica de zinc mostró diferencias entre los cinco grupos (tablas). Tan sólo la concentración en zinc en la piel de las ratas que tomaron la dieta A polvo fue significativamente superior que la del control. Como ya ha sido señalado, precisamente dicho grupo mostró la utilización digestiva, metabólica y nutritiva más baja y su dieta contenía la fórmula que presentaba más furosina. Una alta concentración de zinc en la piel es indicativo de un estado de "malnutrición" (Varela y col., 1992).

4.3.8. Biodisponibilidad el cobre

Las ratas alimentadas con la dieta control ingirieron significativamente más cobre que las que comieron la dieta de referencia, y sin embargo este segundo grupo eliminó una cantidad de cobre por heces significativamente mayor; esto determinó que su absorción y utilización digestiva fueran aproximadamente la mitad respecto al grupo control y por lo tanto significativamente inferiores. Según estos resultados, se podría concluir que un contenido de un 14% de grasa, frente al 5%, en la dieta para ratas mejora notablemente la utilización del cobre (tabla 72).

La diferencia anteriormente indicada también quedó patente en el contenido y concentración de cobre corporal, siendo mucho mayor, y por supuesto significativamente distinto, los valores obtenidos en el grupo control para ambos parámetros (tabla 74). Nuestros resultados son equiparables a los estudios de Aguirre (1995) en ratas administradas dietas que contenían aceite de oliva, girasol y palma en un 2% y 8%, respectivamente, las carcasas de los animales que tomaban las dietas con un mayor contenido de grasa, de cualquiera de los tres aceites, presentaban una retención de cobre mayor que su homólogo al 2%.

La ingesta de cobre del grupo control fue significativamente superior que la de los cuatro grupos experimentales y paralelamente su eliminación fecal fue más alta que la del resto, aunque sólo llegó a ser significativamente mayor que la del grupo A polvo y A líquido

esterilizada (tabla 73). Todos los animales que consumieron una dieta que contenía alguno de los preparados para lactantes absorbieron significativamente menos cobre en comparación con el control, pero a nivel de la eficacia de utilización digestiva únicamente la correspondiente a los dos grupos de ratas que tomaron fórmula en polvo fue significativamente menor frente al grupo control, lo cual se relaciona con el balance de zinc, donde estos dos mismos grupos presentaron los valores de %A/I más bajos, aunque en este último mineral la regulación se da a nivel metabólico fundamentalmente.

Si comparamos los resultados obtenidos en el presente estudio con los de la experiencia II coincide que en ambas los grupos que ingirieron una fórmula en sometida a deshidratación mostraron una eficacia de absorción más baja respecto a la misma fórmula líquida, pero dichas diferencias no repercutieron en el contenido corporal total de cobre en valor relativo (tabla 36), si en valor absoluto de cobre aunque esto se explica por la diferencia de peso que mostraron los animales de uno u otro grupo al final del ensayo.

Entre los primeros estudios llevados a cabo sobre la reacción de Maillard están los ensayos "in vitro" en los que Herdlicka (1976) señala que cuando se calientan mezclas de glucosa-glicina o fructosa-glicina en presencia de sales de Cu o Fe se forman pigmentos insolubles que actúan como agentes quelantes de estos cationes, y estos pueden incluir en su utilización digestiva. Este mecanismo inhibitorio podría relacionarse con que los iones Cu son fuertemente adheridos por los productos avanzados de la Reacción de Maillard originados en dichas mezclas (Rendleman e Inglett, 1984) y al introducirlos en las dietas para animales estos podrían afectar la biodisponibilidad de los cationes (Rendelman, 1987). En nuestros ensayos solo determinamos la presencia de premelanoidinas a través de furosina, pero según los resultados in vivo cabría pensar que coexistiesen también productos avanzados de la reacción de Maillard, responsables de la presencia más alta de cobre en las heces alterando así su utilización digestiva o bien que las premelanoidinas hayan participado en este proceso.

Sin embargo las diferencias observadas en el balance de Cu no repercutieron sobre el contenido total ni la concentración de este elemento en el hígado, piel y hematíes (tabla 81).

Debido probablemente a su mayor ingesta de cobre, el grupo control mostró un contenido y la concentración de cobre corporal total y en valor relativo significativamente superior a las los grupos cuya dieta que contenía fórmula infantil (tabla 75).

Conclusiones

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se estudia la influencia de calentamiento al baño María y por microondas, en condiciones domésticas, de leche de vaca con diferente composición grasa, entera o descremada, y un preparado para lactantes en dos formas de presentación, polvo y líquida, sobre la biodisponibilidad de calcio, fósforo, magnesio, hierro, zinc y cobre. Para ello se realiza inicialmente un ensayo de disponibilidad *in vitro*. También se llevan a cabo ensayos en ratas lactantes, durante su tercera semana de lactación, a fin de conocer los efectos del calentamiento doméstico de la leche de vaca entera y del preparado para lactantes en sus dos modalidades. En estos animales se efectúa un ensayo de balance y al final del período experimental la mitad de cada grupo se sacrifica para extraer eritrocitos, hígado, bazo y piel para su posterior análisis; la otra mitad se reserva intacta para analizar la composición corporal total.

Una vez conocidos los resultados del estudio anterior, se estudió la influencia del tratamiento térmico industrial implicado en la elaboración de preparados para lactantes y se utilizaron un preparado para lactantes A en forma de polvo y líquida esterilizada convencionalmente, que fue la misma marca comercial empleada en el estudio de los efectos del calentamiento doméstico, y otro preparado B en forma de polvo y líquido UHT. Dichas fórmulas infantiles fueron estudiadas mediante la disponibilidad *in vitro*. Además, se elaboraron dietas para ratas en crecimiento y se realizó un ensayo de balance frente a un grupo control. Las determinaciones efectuadas fueron similares a las indicadas para el estudio anterior.

De todo ello se deducen las siguientes conclusiones:

RESPECTO AL CALENTAMIENTO DOMÉSTICO

CONCLUSIÓN PRIMERA: La disponibilidad *in vitro* de los elementos calcio, fósforo, magnesio y zinc se ve favorecida en la leche de vaca descremada frente a la entera, lo que se relaciona con interferencias de la grasa en dicho modelo que probablemente no tienen repercusiones en el organismo.

CONCLUSIÓN SEGUNDA: El calentamiento previo de la leche de vaca entera al baño María o por microondas no afecta la ingesta voluntaria ni el crecimiento en ratas lactantes. Estos animales alcanzan al final de su lactación pesos correspondientes al momento del destete.

CONCLUSIÓN TERCERA: La utilización digestiva y/o metabólica de los elementos calcio, fósforo, magnesio, zinc y cobre de la leche de vaca entera tiende a favorecerse por el calentamiento doméstico, sin apreciarse diferencias importantes entre el uso del baño María o el microondas. No obstante, dichas variaciones no alteran el balance ni el contenido corporal de dichos elementos al final del ensayo. La biodisponibilidad del hierro de la leche de vaca en ratas lactantes es muy escasa y se produce anemia, incluso con la leche no tratada.

CONCLUSIÓN CUARTA: El calentamiento doméstico de la fórmula infantil en polvo reconstituida favorece la disponibilidad in vitro de calcio, pero en general, a diferencia de la leche de vaca, no se producen cambios tendentes a solubilizar el resto de los elementos. In vivo las consecuencias del calentamiento doméstico de estos preparados infantiles son mínimas y se producen en general por la interacción con el individuo que los consume que se encuentra en un período vulnerable.

RESPECTO AL TRATAMIENTO TÉRMICO INDUSTRIAL DE LAS FÓRMULAS INFANTILES

CONCLUSIÓN QUINTA: La alimentación de ratas lactantes con fórmula infantil determina una ingesta e incremento de peso inferiores respecto a la alimentación con leche de vaca, de modo que no se alcanzan los pesos normales del destete. Este efecto resulta mucho más marcado con la leche líquida esterilizada que con la deshidratada, lo que condiciona la utilización nutritiva del conjunto de los nutrientes. Sin embargo, cuando se emplea el modelo in vivo con ratas más mayores no se aprecian variaciones de la ingesta o el peso en función del tratamiento de deshidratación, esterilización convencional o por UHT.

CONCLUSIÓN SEXTA: La biodisponibilidad el calcio del preparado infantil líquido esterilizado se altera porque los animales beben menos alimento en comparación con los

alimentados con el producto deshidratado, y aunque incrementan su eficacia de absorción, presentan unas pérdidas urinarias relativamente elevadas y en definitiva una retención corporal inferior. Por el contrario, en ratas al destete los preparados en polvo respecto a los líquidos tienden a elevar la absorción y retención cálcica. Ello parece asociado a los distintos contenidos de lactulosa y furosina de dichos productos.

CONCLUSIÓN SÉPTIMA: La retención o balance de fósforo y magnesio también disminuyen en el preparado líquido esterilizado frente al deshidratado, y a diferencia del calcio ni siquiera existe un efecto de regulación a nivel digestivo incrementando la proporción absorbida, sino que ésta se reduce. No se modifica apreciablemente el balance o composición corporal de estos mineral por el consumo de preparados en polvo y líquidos por ratas al destete.

CONCLUSIÓN OCTAVA: La utilización de la proteína se afecta por la ingesta del preparado líquido esterilizado, porque disminuye su digestibilidad, lo que sería consecuencia de la proporción relativamente elevada de melanoidinas en dicha fórmula y de la más elevada desnaturalización proteica en relación a las demás. Y también se afecta, pero a nivel metabólico por el consumo del preparado en polvo que tiene alto nivel de compuestos iniciales de la reacción de Maillard, debido a que dichos productos se absorben pero no se utilizan en el organismo y aparecen en la orina.

CONCLUSIÓN NOVENA: La biodisponibilidad de los elementos traza, hierro, zinc y cobre, es inferior en las ratas lactantes alimentadas con la fórmula infantil esterilizada frente a la del mismo fabricante equivalente en polvo, pero en las ratas más adultas esa diferencia queda diluida, sin encontrarse tampoco variaciones entre los productos deshidratados y esterilizados por UHT.

Bibliografía

6. BIBLIOGRAFIA

AARLE, C., BONTENBAL, E., POTJEWIJD, R.E. (1997). "The dialysability of calcium, magnesium and iron as a method to compare *in vitro* bioavailability of minerals in foods". En: Book of Abstracts, Bioavailability '97. Wageningen, The Netherlands.

ADACHI Y PATTON (1961). J. Dairy Sci., 44, 1375.

ADACHI, S, Y ITOH, T. (1981). Kagaku to Seibutsu 19, 643 Chem. Abst. 96: 85851 (1982).

ADRIAN, J. (1974). "Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction". World Review of Nutrition and Dietetics, 19, 17-22.

ADRIAN, J., Y FRANGNE, R. (1973). "La réaction de Maillard 8. Influence des préémeloidines sur la digestibilité azotée et la protéolyse". Ann. Nutr., 27, 111-123.

AGUIRRE, M. (1995). "Utilización de minerales en dietas hipograsas y en preparados dietéticos empleados en regímenes de adelgazamiento". Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid-Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

AL-RASHID, RA., SPANGLER, J. (1971). "Neonatal copper deficiency". N. Engl. J. Med. 285: 841-3.

ALAIS, CH., KIGER, N. JOLLES, P. (1967). "Action of heat on cow γ -casein. Heat caseinoglycopeptide". J. Dairy Sci., 59, 1738-1743.

ALAIS, C., LORIENT, D., HUMBERT, G. (1978). Ann. Nutr. Aliment. 32, 511-521.

ALEGRIA, A., BARBERA, R., FARRÉ, R., GUILLEM, A., LARGADA, M.J. (1997). "In vitro availability of infant formulas supplemented with zinc salts". In: Books of Abstracts of Bioavailability '97. Wageningen, the Netherlands.

AMANO, T. (1963a). "Absorption of fatty acid-iron from the intestine. I Absorption of iron

Bibliografia

Acta Med. Okayama, 17, 139-146.

AMANO, T. (1963b). "Absorption of fatty acid-iron from the intestine. II Absorption of iron after repeated oral administration of fatty acid-iron and intravenous injection of colloidal fatty acid-iron". Acta Med. Okayama, 17, 147-152.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS (1976). Nutr. Rev. 34, 248.

AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977). "Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee of standards for nutritional studies" J. Nutr. 107, 1340-1348.

AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1993). "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet" J. Nutr. 123: 1939-1951.

ANANTHE NARAYAN, K. Y CROSS, M.E. (1992). "Temperature influence on acetyllysine interaction with glucose in model systems due to Maillard reaction". J. Food Sci., 57, 206-212.

ANDERSON, A.M. (1982). IDF Bull. Doc. 142, 24-31.

ANGELO, A.J. Y BAILEY, M.E. (1987). "Over flavour of meat". Academic Press, Orlando, USA.

ANON. (1969). Report of the international press conference of Milchversorgung, Bochum, held on 19 March 1968. Molkereizeitung Welt der Milch 22, 367.

APRIYANTONO, A. Y AMES, J.M. (1993). "Xylose -Lysine model system. The effect

of pH on the volatile reaction products". J. Sci. Food Agric., 61, 477-484.

ARCE, M.M. (1993). "Algunas Consecuencias nutricionales del consumo de dietas sometidas a reacción de Maillard". Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid-Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

ASHKENAZI, A., LEVIN, S., DJALDETTI, M., FISHEL, E., BENVENISTI, D., (1973). "The syndrome of neonatal copper deficiency." Pediatrics 52: 525-533.

ASMEAD, D.H., GRAFF, D.J., ASHMEAD, H.H. (1985). "Intestinal absorption of metal ions and quelates". Thomas, Springfield, Il. Citado por Ashmead, D.H. (1989). En: " Nutrient Availability: Chemical and biological aspects". Pp. 122-124. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House, Cambridge, England.

ASPE, T. (1992). "Influencia del tratamiento térmico de la proteína dietética sobre la biodisponibilidad de algunos minerales". Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid-Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

ASPE, T. (1992). "Influencia del tratamiento térmico de la proteína dietética sobre la biodisponibilidad de algunos minerales". Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid-Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

ASPE, T., VAQUERO, M.P., NAVARRO, M.P. (1992). "Changes in the speciation and utilization of calcium in rats by the presence of untreated or heated casein, separately or in combination with glucose and fructose" En: Bioavailability '93. Nutritional, Chemical and Food Processing Implications of Nutrient Availability. Ed: Schlemmer, U. pp 68-73.

ASPE, T., VAQUERO M. P., NAVARRO M. P. (1993). "Changes in the speciation and utilization of calcium in rats by the presence of untreated or heated casein, separately or in combination with glucose and fructose". In: Bioavailability

Bibliografía

'93. Nutritional, Chemical and Food Processing Implications of Nutrients Availability. 2, 68-72.

AVIOLI, L. (1988). "Calcium and phosphorus". En: *Modern Nutrition in Health and Disease*. ed., M.E. Shils & V.R. Young, pp. 142-158. Philadelphia: Lea & Febiger.

BALDWIN, R.E., KORSCHGEN, W.M., RUSSELL, M.S., MABESA, L. (1976). "Proximate analyses free amino acids, vitamin and mineral content of microwave cooked meat". *J. Food Sci.*, 41, 762-765.

BALLOT, D., et al (1987). "The effects of fruit juices and fruits on the absorption of iron from a rice meal". *Brit. J. Nutr.* 57:331-343

BARBERA, R. Y FARRE, R. (1992). "Revisión: Biodisponibilidad de los elementos traza". *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 32(4) pp. 381-399.

BARKER, M., CADOGAN, J. JONES, N. EASTELL, R. (1994). "Calcium, protein and phosphorus, intakes and bone density". *Am. J. Clin. Nutr.* 60, 455-456.

BECKER, W.M., HOEKSTRA, W.G. (1971). "The intestinal absorption of zinc; in Skorina, Waldon-Edward, *Intestinal absorption of metal ions, trace elements and radionuclides*". (Pergamon Press, Oxford)

BELEC, J. & JENNES, R. (1962). *J. Dairy Sci.*, 45, 20.

BELIKOV, V.M., ANTONOVA, T.V., BEZRUKOV, M.G. (1981). *Nahrung* 25, 91-97.

BELLOMONTE, G., BONIGLIA, C., CARRATÚ, B., FILESI, S., GIAMMAARIOLI, S., MOSCA, M., SANZINI (1990). "Protein and Lipid composition of human milk and infant formulas: comparison and nutritional consequences". *Ann. Ist. Super.*

Sanità. Vol. 26, N. 2 (1990), pp 131-140.

BEN-GARA, Y ZIMMERMAN, G. (1972). "Changes on the nitrogenous constituents of staple foods and feeds during storage 1. Decrease in the chemical availability of lysine". *J.Food Sci. Tehcnol.*, 9, 113-118.

BENZING-PURDIE, L., RIPMEESTER, J.A., RATCLIFFEC, C.I. (1985). "Effect of temperature on Maillard reaction products". *J.Agric. Food Chem.*, 33, 31-33.

BERNHART, F.W., GAGLIARDI, E.D., TOMARELLI, R.M. & STRIBLEY, R.C. (1965). *J. Dairy Sci.* 48, 399.

BERTEAUD, A. J. Y DELMONTE, M. (1993). "Las microondas de la cocina a la industria". *Mundo Científico*, 135, 449-456.

BIJLEVELD, C.M.A., VONK, R.K., OKKEN, A., FERNANDES (1987). "Fat absorption in preterm infants fed a taurine-enriched formula". *Eur. J. Pediatr.* 146, 128-31.

BILLEAUD, C., GUILLET, J. & SANDLER, B. (1990). "Gastric emptying in infants with or without gastro-oesophageal reflux according to the type of milk". *European Journal of Clinical Nutrition* 44, 577-583.

BJORN-RASMUSSEN, E., HALLBERG, L. (1979). "Effect of animal proteins in the absorption of food iron in man". *Nutr. Metab.* 23: 192-202.

BLEUMINK Y YOUNG (1968). "Nutritional and Physiological Consequences of the Maillard reaction". ADRIAN, J. (1974). *Worñ- Revv. Nutr. Diet.*, 19, 17-22.

BMDP 1992 BMDP Statistical Software. Univ. California Press, Berkeley, CA, USA.

Bibliografía

BORUM, P.R.. (1987). "Role of carnitina in lipid metabolism. En: Lipids in Modern Nutrition. Eds.: M. Horisberger y U. Bracco. New York, Nestlé Nutrition/Raven Press, 1987:51-58.

BOWERS, J., FRYER, B. (1972). "Thiamin and Riboflavin in cooked and frozen reheated turkey". J. Amer. Dietet. Assoc., 60, 399.

BRINK, M.F. (1967). "Relationship between fat and mineral metabolism. A review". Journal of the American dietetic Association, 51, 517-522.

BRUNE, L.; ROSSANDER, L.; HALLBERG, L. (1989) "Iron absorption and phenolic compounds: Importance of different phenolic structures". Eur. J. Clin. Nutr. 43, 547-558.

BRUNNER, J.R. (1973). Personal communication.

BRUNSER, O., ESPINOZA, J., ARAYA, M., CRUCHET, S. & GIL, A. (1994). "Effect of dietary nucleotide dupplementation on diarrhoeal disease in infats". Acta Paediatrica 83, 188-191.

BUERA, M.D., CHIRIFE, J., RESNIK, S.L., WETZLER, G. (1987). "Nonenzymatic browning in liquid model systems of high water activity: Kinetics of color changes due to Maillard's reaction between different single sugars and glycine and comparison with caramelization browning". J. Food Sci., 42, 1063-1067.

BUNJAPAMAI, S., MAHONEY, R.R., FAGERSON, I.S. (1982). "Determination of D-amino acids in some processed foods and effect of Racemization on *in vitro* digestibility of casein". J. Food Science 47, 1229-1234.

BURTON, H. (1988). "Properties of UHT-Processed Milk. In: Ultra-High-Temperature Processing of Milk and Milk Products". (Ed). Elsevier Applied Science: London and New

York publishers.p.254-291.

BURTON, H. (1984). "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., 51,341-63.

BURTON, H., FORD, J.E., PERKIN, A.G., PORTER, J.W.G., SCOTT, K.J., THOMPSON, S.Y.T., TOOTHILL, J., EDWARDS-WEBB, J.D. (1970). J. Dairy Res., 51, 637.

BURTON, H. (1984). "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., 51, 341-363.

BUSH RT.(1970). "Lactulose: an ideal laxative from children". New Zeal. Med. J. 71: 364-365.

BUSTAMANTE, S. A., SANCHES, N., CROSIER, J., MIRANDA, D., COLOMBO, G. & MILLER, M. J. S. (1994). "Dietary nucleotides: effects on the gastrointestinal system in swine". Journal of Nutrition 124, 149S-156S.

BUTEE, N.F., GARZA, C., O'BRIAN SMITH E., WILLIS, C., NICHOLS, B. (1987). "Macro- and trace mineral intakes of exclusively breast-fed infants". Am. J. Clin. Nutr., 45, 42-8.

BUTTE, N.F., WONG, W.W., FERLIC, L., O'BRIAN SMITH, E., KLEIN, P.D. & GARZA, C. (1990). "Energy expenditure and deposition of breast-fed infants during early infancy". Pediatric Research 28, 631-640.

BYRD, C.A., MATRONE, G.(1965). "Investigations of chemical basis of zinc-calcium-phytate interaction in biological systems". Fed. Proc. 119: 347-349.

CALVO, M.S. (1993). "Dietary phosphorus, calcium metabolism and bone". J. Nutr. 123,

1627.

CAMERON, D.J. (1978). *Food Chem.* 3,103-110.

CANDIANO, G., ZETTA, L., BENFENATI, E., ICARDI, G., QUEIROLO, C., GUSMANO, R., GHIGGERI, G.M. (1990). "Characterization of the major browning derivatives of lysine with 2-amino-2-deoxy-D-glucose". En: "The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology". pp. 109-114. Ed. Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrel, R.F., Liardon, R. Birkhäuser Verlag. Basel.

CARLSON, S.E. (1985). "N-Acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation". *American Journal Of Clinical Nutrition* 41, 720-726.

CARPENTER, K.J. (1982). "The Estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reactions". *Nestlé Research News*, 78-86.

CARVER, J. D., PIMENTEL, B., COX, W. I. & BARNES, L. A. (1991). "Dietary nucleotide effects upon immune function in infants". *Pediatrics* 88, 359-363.

CERRUTTI, P., RESNIK, S.L., SELDES, A., FERRO FONTAN, C. (1985). "Kinetics of deteriorative reactions in models food systems of high water activity: glucose loss, 5-Hydroxymethylfurfural accumulation and fluorescence development due to nonenzymatic browning". *J. Food Sci.*, 50, 627-630.

COOK, D.A. (1989). "Nutrient levels in infant formulass: technical considerations". *J. Nutr.* 119, 1773-1778. En: *Nutrición del Lactante*. FOMON, S.J. (1995). Ed.: Mosby/Doyma Libros. Cap.: 27 Leches artificiales para lactantes. pp.415-431.

COOK, D.A. (1973). "Availability of magnesium, balance studies in rats with various inorganic magnesium salts". *J. Nutr.* 103, 1365-1370.

CORZO, N., DELGADO, T., TROYANO, E., OLANO, A. (1994). "Ratio of lactulose to furosine as indicator of quality of commercial milks". *J. Food Prot.* 57, 737-739.

COULTER, S.T., THOMAS, E.L. (1968). "Enrichment and fortification of dairy products and margarine". *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 16, 355-381.

CRESPO, L.F., OCKERMAN, H.W. (1977). "Thermal destruction of microorganisms in meat by microwave and conventional cookery". *J. Food Prot.* 40, 442-4.

CROSS, G. Y FUNG, D. (1982). "The effect of microwave on nutrient value of foods". *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 355-381.

CHAO, L.S. Y GORDON, D.T. (1983). "Influence of fish on the bioavailability of plant iron in the anemic rat". *J. Nutr.* 113, 1643-1652.

CHEFTEL, J.C., Y CHEFTEL, H. (1976). "Brunissement non enzymatique". En: "Introduction a la biochimie et a la technologie des aliments". Vol I. pp. 333-352. SOC. P.I.C., París.

CHEN, S.T., WU S.H. , WANG K.T. (1989). "Rapid isomerization of optically active amino acids by microwave oven-based heating treatment". *International Journal Pept. Protein Res.*, 33, 73-75.

CHENG , A.L.S., MOREHOUSE, M.G., DEUEL, H.J.. Jr. (1949). "The effect of the level of dietary calcium and magnesium on the digestibility of fatty acids, simple triglycerides and some natural and hydrogenated fats". *J. Nutr.*, 37, 237. Citado por: Speckmann, E. W.,

CHRISTIAN, P.; SESHADRI, S. (1989) "Counteracting the inhibitory effect of tea on the in vitro availability of iron from cereal meals" *J. Sci. Fd. Agr.*, 49, 431-436.

DAHL, C.A., MATTEWS, M.E., MARTHE, E.H. (1978). "Cook/chill food service systems, Microbiological quality of beef loaf at five process stages". *J. Food Prot.* 41, 788-93.

Bibliografía

- DALGLEISH, D.G., POULIOT, Y. & PAQUIN, P. (1987). *J. Dairy Res.*, 54,39.
- DALGLEISH, D.G. (1989). "The behaviour of minerals in heated milk" En: *Bulletin of the International Dairy Federation* nº 238/1989, FIL-IDF.
- DALLMAN, M.E. (1989). "Upper limits of iron in infant formulas". *J. Nutr.* 119, 1852-1855. En: *Nutrición del Lactante. FOMON, S.J. (1995). Ed.: Mosby/Doyma Libros. Cap.: 27 Leches artificiales para lactantes. pp.415-431.*
- DALLMAN, P.R. (1990). "Progress in the Prevention of Iron Deficiency in Infants". *Acta Paediatr. Scand. Suppl.* 365: 28-37.
- DANEHY, J.P.(1986). "Maillard reactions: nonenzymatic browning in food systems with special reference to the development of flavor". *Advanced in food Research*, vol 30,77-138.
- DAVIDSON, L.-A. & LÖNNERDAL, B. (1987). "Persistence of human milk proteins in the breastfed infant". *Acta Paediatrica Scandinavica* 76, 733-740.
- DAVIDSON, L.A., LÖNNERDAL, B. (1988). "Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane: ontogeny and effect of glycon chain". *Am. J. Physiol.* 254, G580-5.
- DAVIES, N.T., (1979). "Anti-nutrient factors affecting mineral utilization". *Proc. Nutr. Soc.* 38: 121-128.
- DE JONG, F.A., SCHREIBER, G. (1987). "Messenger RNA levels of plasma proteins in rat liver protein depletion and refeeding". *J.Nutr.* 117, 1795-1800.
- DECAREAU, R.V., PETERSON, R.A. (1986). "Microwave Processing and Engineering" Ellis Horwood, Chichester, England, 39-41.
- DECAREAU, R.V. (1985). "Microwaves in the Food Processing Industry". Academic Press,

New York.

DELGADO, T., CORZO, N., SANTA-MARÍA, G., JIMENO, M.L., OLANO, A. (1992). "Determination of furosine in milk samples by ion-pair reversed phase liquid chromatography". *Chromatographia* 33:374-376.

DELUCA, H.F. (1980). *Nutr. Rev.* 38, 169.

DELUCCHI, C., PITA, M. L., FAUS, M. J., MOLINA, J. A., UAUY, R. & GIL, A. (1987). "Effects of dietary nucleotides on the fatty acid composition of erythrocyte membrane lipids in term infants". *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 6, 568-574.

DEPARTAMENTO DE SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL (1977). "The composition of mature human milk". (Reports on Health and Social Subjects No. 12). Londres, HMSO.

DILL, C.W., ROBERTS, W.M., AURAND, L.W. (1962). "Production of sulfur compounds in skimmilk heated by steam injection" *J. Dairy Sci.* 45, 1332-1335.

DONOVAN, S.M. & LÖNNERDAL, B. (1989). "Non protein nitrogen and true protein in infant formulas". *Acta Paediatrica Scandinavica* 78, 497-504

DRAPER, A., LEWIS, J., MALHOTRA, N., WHEELER, T.,H.,L. (1993). "The energy and nutrient intakes of different types of vegetarian: a case for supplements?". *Brit. J. Nutr.*, 69, 3-19.

DUNDLEY, W.L., FRANKLIN, .D., PANGBORN, R.M. (1962). *Food Technology* 16, 112.

DWORSCHAK, E. (1976). "5-Hidroximetilfurfural as an indicator of the degree of thermal treatment in some preserved food". *Konserved-Paprikaip*, 5,184-7.

DWORSCHAK, E., HEGEDUS, M. (1974). *Acta Alim.* 3, pag. 337. Citado por Hurrell, R.F.

Bibliografía

EK, J., MAGNUS, E. (1980). *Am. J. Clin. Nutr.* 33, 1120-1224.

ERBERSDOBLER, H.F., BRANDT, A., SCARRER, E., VON WANGENHEIM, B. (1970). *Progress in Food and Nutrition Science*. pp 257-263. Ed. Eriksson, C. Pergamon Press. Oxford.

ERBERSDOBLER, H.F. (1986). "Twenty years of furosine-better knowledge about the biological significance of Maillard-reaction in food and nutrition". pp.481-502. In: M. Fujimaki, M. Namiki and H. Kato (eds.) *Amino-carbonyl reactions in food and biological systems*. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam.

ERBERSDOBLER H. (1970). *Milchwiss.* 25, 280.

ESPGAN COMMITTEE OF NUTRITION (1982). "Guidelines on infant nutrition III". *Recommendations for infant feeding. Acta Paediatrica Scandinavica Suppl.*302,1-27.

ESPGAN (1991). *Committee on Nutrition: Comment on the content and composition of lipids in infant formulas. Acta Paediatr. Scand.* 80: 884-896.

ESTUDIO FAO ALIMENTACIÓN Y NUTRICION 51. INFORME DE UNA CONSULTA DE EXPERTOS FAO/OMS. Bethesda, M.D. Estados Unidos 4-8 de diciembre de 1989.

EVANGELISTI, F., CALCAGNO, C., ZUNNIN, P. (1994). "Relationship between blocked lysine and carbohydrate composition of infant formulas". *J. Food Sci.* 59, 335-337.

EVANS, G.W., JOHNSON, P.E. (1978). "Copper-and zinc-binding ligands in the testinal mucosa; in Kirchgessner, *Trace elements metabolism in man and animals*". vol3 (Institut für Ernährungsphysiologie, Freising-Weihenstephan.

EXPERTOS FAO/OMS, (1989). "Evaluación de la calidad de las proteínas" Informe de una consulta de Expertos FAO/OMS, Bethesda, M.D. EEUU. En: ORGANIZACION DE LAS

NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION Roma, 1992.

EZEQUIEL, E. (1967). " Intestinal iron absorption by neonates and some factors affecting it".
J. Lab. Clin. Med. 70, 138-149.

FAIRWEATHER-TAIT, S.J., SYMSS, L.L. (1989). "The effect of Maillard reaction products on zinc bioavailability". Nutrient availability, chemical and biological aspects. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England. pp. 229-231.

FAIRWEATHER-TAIT, S.J., SWINDELL, T.E., WRIGHT, A.J.A. (1985). "Further studies in rats on the influence of previous iron intake on the estimation of bioavailability of Fe".
British Journal of Nutrition, 54, 79-86.

FAIRWEATHER-TAIT, S.J., (1997). "Bioavailability of copper" European Journal of clinical Nutrition 51, Suppl. 1, S24-S26

FAIRWEATHER-TAIT, S.L. SWINDELL, T.E. & WRIGHT, A.J.A. (1985). "Further studies in rats on the influence of previous iron intake on the estimation of bioavailability of iron".
Br. J: Nutr., 54, 79-86.

FAIRWEATHER-TAIT, S.J., BALMER, S.E., SCOTT, P.H. & MINSKI, M.J. (1987). "Lactoferrin and iron absorption in newborn infants". Pediatric Research 22, 651-654.

FAKAMBI, L., FLANZY, J., FRANCOIS, A.C. (1969). "Compétition in vivo entre acides gras et phosphore pour la formation de composés insolubles de calcium" R. Acac. Sc. Paris, 269 (D), 2233-2235.

FARKAS, C.S. y LE RICHE, W.H. (1987) Effect of Tea and Coffe Consumption on Non-Haem Iron Absorption. Some Questions about Milk. Human Nutrition: Clinical Nutrition, 41C: 161-163.

Bibliografía

FARRER, K.T.H. (1982). "Light damage in milks". Farrer Consultants, Victoria, Australia.

FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY (1961). Blood and other body fluids. Biological Handbooks. Washington, D.C., U.S.A. Ed.: Dorothy S. Dittmer.

FERNANDEZ MARTÍN, F., MORAIS, F., OLANO, A. (1980). En: "Food Processing Engineering" Vol. 1, Eds. Linko, P., Malkki, J., Olkku, J., Lankari, J. Applied Sci. Publishers, London, pp.523.

FERNÁNDEZ MÁRQUEZ, M., RUIZ LÓPEZ, M.D., GARCÍA-VILLANOXA, B. (1992). "Determinacion of total solid in milk by microwave drying and its effect on hidroximethylfurfural formation" The Aust. J. Dairy Technol., 47, 56-58.

FERNÁNDEZ PINEDA, M.A., ARTACHO MARTÍN-LAGOS R., LÓPEZ GARCÍA DE LA SERRANA H., LÓPEZ MARTÍNEZ M.C. (1994). "El horno microondas, influencia sobre el valor nutritivo de los alimentos". Alimentaria, Octubre, 94.

FIELDAS, M. (1988). "Esperimental studies of copper absorption". Front. Gastrointest. Res., vol. 14, pp. 111-116.

FILER, L.J., MATTSON, F.H., FOMMON, S.J. (1969). "Triglyceride configuration and fat absorption by the human infant". Journal of Nutrition, 99, 293-298.

FINE, K.D., SANTA ANA, C.A., PORTER, J.L., FORDTRAM, J.S.(1991). "Intestinal absorption of magnesium from food and supplements". J. Clin. Invest. 88:396-402

FINLEY, J.W., SHIPE, W.F., (1968). J. Dairy Sci., 51, 929.

FINOT, P.A., MERABET, M. (1993). "Nutritional and safety aspects of microwaves. History and critical evaluation of reported studies". Inter. J. Food Sci. Nutr. 44, (Suppl. 1). S65 - S75.

- FINOT, P.A., BRICOUT, J., VIANI, R., MAURON, J. (1968). "Identification of a new lysine derivate obtained upon acid hydrolysis of heated milk". *Experientia* 24: 1097-1099.
- FINOT, P.A.,BUJARD, E., ARNAUD, M. (1977). In: Friedmann, M.(edit.) *Protein Crosslinking-B. Nutritional and Medical Consequences*, p. 51-57. New York: Plenum Publ. Corp.En: *Milk and Dairy products in human nutrition*. Edmund Renner. W-GmbH, Volkswirtschaftlicher Verlag, Munchen
- FINOT, P.A.,DEUTSCH, R., BUJARD, E.(1981). "The Extent of the Maillard Reaction During the Processing of Milk.". *Prog. Fd. Nutr Sci.* 5, 345-355.
- FINOT, P.A. (1983). *Nutr. Abst. Rev.*, 53,67.
- FINOT, P.A. (1983). "Lysinoalanine in food proteins". *Nutr. Abst. Rev. clin. Nutr. A* 53, 67-80.
- FINOT, P.A., MAGNENAT, E., GUIGNARD, G., HURRELL, R.F. (1982). "The behaviour of tryptophan during early and advanced Maillard reactions". *nt. J. Vitam. Nutr. Res.* 52, 226
- FINOT, P. A. (1990). "Metabolism and physiological effects of Maillard reaction products (MRP)". In: Finot PA, Aeschbacher HU, Hurrell RF, Liardon R, Eds. *Advances in life sciences, The Maillard Reaction in food processing, human nutrition and physiology*. Basel: Birkhäuser Verlag, : 273-278.
- FOMON, S.J. (1974). En: *Nutrición Infantil. Segunda edición*. Ed. Interamericana, pp 119.
- FOMON, S.J. (1995). En: *Nutrición del Lactante*. Ed.: Mosby/Doyma Libros. Cap.: 27 Leches artificiales para lactantes. pp.415-431.
- FOMON, S.J., OWENM G.M., JENSEN, R.L., THOMAS, L.N. (1963). *Am. J. Clin. Nutr.* 12, 346.

Bibliografía

- FORD, J.E., PORTER, J.W.G., THOMPSON, S.Y. (1974). Int. Dairy Congr. New Delhi, Vol. 1E, 567.
- FORD, J.E., PORTER, J.W.G., THOMPSON, S.Y., TOOTHILL, J., EDWARDS-WEBB, J.D. (1969). "Effects of UHT processing and of subsequent storage on the vitamin content of milk". J. Dairy res. 36, 447-454.
- FORD, J.E., (1967). J. Dairy Res., 34, 329.
- FORD, J.E. (1974). Brit. J. Nutr.31, 243.
- FORD, J.E., THOMPSON, S.Y., (1981)., I.D.F. Bull., 1981, 133,65.
- FORD, J.E., HURRELL, R.F. & FINOT, P.A.(1983). Brit. J. Nutr., 49, 355
- FORD Y SALTER (1966).FOMON, S.J. (1974). En: Nutrición Infantil. Segunda edición. Ed. Interamericana, pp 119.
- FRANSON, G.B. Y LÖNNERDAL, B. (1984). "Disribution of trace elements and minerals in human and cow's milk" *Pediatr. Res.* 17, 912-915.
- FRIEDMAN, M. (1992). " Dietary Impact of Food Processing". *Annu. Rev. Nutr.* 12 119-137.
- FRIEDMAN, M., GUMBMANN, M.R. (1984). "The nutritive value and safety of D-phenylalanine and D-tryosine in mice". *J. Nutr.* 114, 2089-2096.
- FRIEDMAN, M., GUMBMANN, M.R., BRANDON, D.L. (1988). "Nutritional, Toxicological and Immunological Consequences of Food Processing. *Front. Gastrointest. Res.*, 14, 79-90.
- FRIEDMAN, M., ZAHNLEY, F.C., MASTERS, P.M. (1981). "Relationship between *in vitro* digestibility of casein and its content of lysinoalanine and D-amino acids". *J. Food Sci.*

46,127-131.

FRITSCH, R.J. Y KLOSTERMEYER, H.Z. (1981). *Lebensm. Unters. Forsh.* 172, 440. Citado por: SCOTT, K.J. (1989). "Micronutrients in milk products" En: *Micronutrients in milk products and milk based food products* Editado por: Renner, E. Elsevier Science Publishers Ltd. Essex, England, pp 71-123.

FUJIMOTO, K., KANDEA, T. (1973). "Brown discoloration of fish products IV. Nitrogen content of the browning substance". *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1973, 39, 185-90.

FUJIMOTO, K., MARUYAMA, M., KANEDA, T. (1970). "Brown discoloration of food products. I. Factors affecting the discoloration". *Nippon Suisan Gakkaishi*, 34, 519-23.

FUJIMOTO, K., KANDEA, T. (1973). "Brown discoloration of fish products. V. Reaction mechanisms in the early stage". *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1973, 39, 185-90.

FUJIMOTO, K., SAITO, J. y CANEDA, T. (1971). "Nippon Suisan Gakk.", 37, 44-47. Citado por: Adrián J. (1974). "Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction". *World Rev. NUtr. Diet.*, 19, 71-72

FURNISS, D.E., VUICHOUD, J., FINOT, P.A., HURRELL, R.F. (1989). "The effect of Maillard reaction products o zinc metabolism in the rat". *British J. Nutr.*, vol. 62 (3), 739-749.

FURNISS, D.E., HURRELL, R.F., FINOT, P.A. (1986). "Modification of urinary zinc excretion in the rat associated with the feeding of Maillard reaction products". *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 59, 57, 188-191.

GACS, G. Y BALTROP, D. (1977). "Significance of Ca-soap formation for calcium absorption in the rat". *Gut*, 18, 64-68.

GARCIA-ARIAS, M.T., CASTRILLON, A.M., NAVARRO, P. (1994). "Protein, calcium and

phosphorus utilisation in diets containing raw, cooked or canned tuna. Influence of 1 and 3 years' storage time" *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 45, 237-247.

GARNER, S.C., ANDERSON, J.J., AMBROSE, W.W. (1995). "Skeletal tissues and Mineralization". In: *Calcium and Phosphorus in Health and Disease*. Chapter 7, by CRC Press Inc.

GARNIER, J. (1966). *J. Molec. Biol.* 19, 586-590.

GEORGE, D.E. & LEBENTHAL, E. (1981). *Textbook of Gastroenterology and nutrition in infancy*. Raven Press, New York.

GIESE, J. (1992). "Advances in Microwave Food Processing". *Food Technology*, September 1992.

GIL, A., PITA, M., MARTINEZ, A., MOLINA, J. A. & SANCHEZ-MEDINA, F. (1986b). "Effect of dietary nucleotides on the plasma fatty acids in at-term neonates". *Human Nutrition* 40C, 185-195.

GIL, A. & SANCHEZ-MEDINA, F. (1982). "Acid-soluble nucleotides of human milk at different stages of lactation". *Journal of Dairy Research* 49, 301-307.

GLAHN, R.P., WIEN, E.M., VAN CAMPEN, D.R., MILLER, D.D. (1996). "Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels in vivo studies: use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability", *J. Nutr.* 126: 332-339.

GLAHN, R.P., VAN CAMPEN, D.R. (1997). "Iron uptake is enhanced in Caco-2 cell monolayers by cysteine and reduced cysteinyl glycine". *J. Nutr.* 127: 642-647.

GLAHN, R.P., GANGLOFF, M.B., VAN CAMPEN, D.R., MILLER, D.D., WIEN, E.M., NORWELL, W.A. (1995). "Bathophenanthroline disulfonic acid and sodium dithionite effectively remove surface-bound iron from Caco-2 cell monolayers". *J. Nutr.* 125: 1833-1840.

- GOEDHART, A.C. Y BINDELS, J.C. (1994). "The composition of human milk as a model for the design of infant formulas: recent findings and possible applications". *Nutrition Research Reviews*, 7, 1-23.
- GOULD, I. A. (1948). *J. Dairy Sci.*, 28, 367.
- GRAF, E. (1983). "Calcium binding to phytic acid". *J. Agric. Fd. Chem.* 31: 851-855.
- GRAHAM, L.A., CAESAR, J.J., BURGEN, A.S.V. (1960). "Gastrointestinal absorption and excretion of Mg 28 in man". *Metab Clin Exp* 9:646-659.
- GRIVAS, S., OLSSON, K., NYHAMMAR, T. (1983). "Creatinine and Maillard Reaction Products as precursors of mutagenic compounds formed in fried beef. En: *The Maillard reaction in food and nutrition*. Eds: Waller, G.R. y Feather, M.S. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington D.C. pp 507-518.
- HALLBERG (1981). "Bioavailability of dietary iron in man" *Ann. Rev. Nutr.* 1:123-147.
- HALLBERG, L. Y ROSSANDER, L. (1982). "Effect of different drinks on the absorption of non-haem iron from composite meals". *Human. Nut. Appl. Nut.* 36 A, 116-123.
- HALLBERG, L. Y ROSSANDER, L. (1984). "Improvement of iron nutrition in developing countries: comparison of adding meat, soy protein, ascorbic acid, citric acid and ferrous sulphate on iron absorption from a simple Latin American-type meal". *Am. J. Clin. Nutr.*, 39, 577-583.
- HALLBERG, L., BRUNE, M, ERLANDSSON, M., SANBERG, A.S., ROSSANDER-HULTEN, L. (1991). "Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme- iron absorption in humans". *Am J Clin Nutr* 53, 112-119.
- HAMBRAEUS, L. (1984). "Human milk composition". *Nutrition Abstracts and Reviews, Reviews in Clinical Nutrition*, Vol. 54, No. 4

Bibliografia

HAMBREUS, L., LÖNNERDAL, B., FORSUM, E. & GEBRE-MEDHIN, M. (1978). "Nitrogen and protein components of human milk". *Acta Paediatrica Scandinava* 67, 561-565.

HANSON, L.A., ASHRAF, R., ZAMAN, S., KARLBERG, J., LINDBLAD, B.S. & JALIL, R. (1994). "Breast feeding is a natural contraceptive and prevents disease and death in infants, linking infant mortality and birth rates." *Acta paediatrica* 83, 3-6.

HARDWICK, L.L., JONES, M.R., BRAUTBER, N. et al (1991). Magnesium absorption: mechanisms and the influence of vitamin D, calcium and phosphate". *J. Nutr.* 121, 13-23.

HARKNESS, J.E. & WAGNER, J.E. (1995). *The biology and medicine of rabbits and rodents*. 4th ed. Ed.: Williams & Wilkins. Baltimore, U.S.A.

HARPER, W. (1976). In: W. Harper and C. Hall (eds.), *Dairy Technology and engineering*. AVI, Westport, Connecticut, pp. 141-169, 572.

HARRIS, R.S. & KARMAS, E. (1975). "Nutritional Evaluation of Food Processing". The Avi Publishing Company, Inc. 2^a ed.

HARRISON, H.E., HARRISON, H.C., (1979). "Disorders of calcium and phosphate metabolism in childhood and adolescence" Philadelphia, W.B. Saunders Company, a. Calcium and phosphate homeostasis, pp. 15-46, b. Hypocalcemic states, pp. 47-99, c. Hypercalcemic states, pp. 100-140.

HARRISON, G.G., GRAVER, E.J., VARGAS, M., CHURELLA, H.R. & PAULE, C.L. (1987). "Growth and adiposity of term infants fed whey-predominant or casein predominant formulas or human milk". *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 6, 739-747.

HARRISON, D.L. (1980). "Microwave versus conventional cooking methods, effects on food quality attributes". *Journal of Food Protection*. Vol. 43, No. 8, 633 - 637.

HARRISON, H.E. (1984). Phosphorus. En: *Present Knowledge in Nutrition*. 5th edn, ed. RE

Olson, p. 242. Washington, D.C.: The Nutritional Foundation.

HARZER, G., HASCHKE, F., (1989). "Micronutrients in human milk." En: Micronutrients in milk and milk-based products, capítulo 3. Ed. E. Renner, E. Elsevier Science Publishers Ltd., London y New York, pp. 125-237.

HARZER, G., HAUG, M. & BINDELS, J.G. (1986). "Biochemistry of maternal milk in early lactation". Human Nutrition: Applied Nutrition 40A, Suppl.1, 11-18.

HARZER, G., DIETERICH, T., GEIER, H. (1986). Ernähr Umschau 33, 91. Citado en Harzer y Haschke (1989).

HASCHKE, F., ZEIGLER, EE., EDWARDS, BB., FOMON, SJ., (1986). "Effect of iron fortification of infant formula on trace mineral absorption" J Paediatr Gastroenterol Nutr. 5:768-773

HASHIBA, H. (1982). "The browning reaction of Amadori compounds derived from various sugars" Agric. Biol. Chem. 47, 547-8.

HEARN, T. L., SGOUTAS, S.A., SOUTAS, D. S., HEARN, J.A. (1987). "Stability of polyunsaturated fatty acids after microwave cooking of fish". Jour. Food Sci. 52, No. 5, 1430-1431.

HEGARTY, P.V.J. (1982). "Influence of food processing on nutritive value of proteins". En: "Food proteins". Fox P.F. Y CONDON J.J. Applied Science Publishers. London Y New York. pp.: 145-154.

HEGENAUER J, SALTMAN P, LUDWIG D. (1979). "Effects of supplemental iron and copper on lipid oxidation in milk. 2. Comparison of metal complexes in heated and pasteurized milk". J Agricul Food Chem 27:868-871.

HEGSTED, D.M. Y LINKSWILER, H.M. (1981). J. Nutr., 111,24. Citado por Linder, M.C.

Bibliografía

(1988). En: "Nutrición. Aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos". Cap. 6. "Nutrición y metabolismo de los elementos mayoritarios". Ed. Linder, M.C: Editorial Eunsa, Pamplona, pp.169-188.

HEINE, W., TIESS, M. & WUTZE, K.D.(1986). "N-tracer investigations of the physiological availability of urea nitrogen in mother's milk".

HEINE W, ZUNFT H-J, MÜLLER- BEUTHOW W, ET AL (1977). "Lactose and protein absorption from breast milk and cow's milk preparations and its influence on the intestinal flora : investigations on two infants with an artificial anus". Acta Paediatr Scand 66:699-703.

HEINE (1992). "Aspectos cualitativos de las proteínas de la leche humana y de las fórmulas: patrones de aminoácidos". En: Metabolismo de las Proteínas en la Infancia. Nestlé Nutrition Services. Resumen del 33º Seminario de Nestlé Nutrición.

HEINING, M.J., NOMMSEN, L.A., PEERSON, J.M., LÖNNENDAL, B. & DEWEY, K.G. (1993). "Energy and protein intakes of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life and their association with growth velocity:the DARLING study". American Journal Of Clinical Nutrition 58, 152-161.

HENDRICKSE, R .G., WOOLDRIDGE, M. A. W., RUSSELL, A. (1977). Lactulose in baby milks causing diarrhoea simulating lactose intolerance. BMJ 1:1194-1195, 1977.

HENDRICKSE, R. G. (1977). "Lactulose in baby milks" . BMJ 2:187.

HENLE, T., ZEHETNER, G., KLOSTERMEYER, H. (1995). "Fast and sensitive determination of furosine". Z. Lebensm. Unters. Forsch. 200, 235-237.

HENLE T, ZEHETNER G, KLOSTERMEYER H 1995 Fast and sensitive determination of furosine. Z Lebensm Unters Forsch 200 235-237.

HENRY Y KON (1950). En: FOMON, S.J. (1974). En: Nutrición Infantil. Segunda edición.

Ed. Interamericana, pp 119.

HENRY, K. M. Y TOOTHILL, J. (1960). *Journal of Dairy Research*, 27, 77.

HERBERT, V., (1987). "Recommended dietary intakes of folate, vitamin B12 and iron in humans". *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 661-668.

HESTED, M., SCHUETTE, S.A. ZEMEL, M.B. LINKSWILEER, H.M. (1981). "Urinary calcium and calcium balance in young men as affected by level of protein and phosphorus intake. *J. Nutr.* 3, 553-562.

HODGE, J.E. (1967). "Origin of flavors in food". Nonenzymatic browning reactions. En: *Chemistry and Physiology of Flavors*. Eds.: H. W, Schulz, E.A. Day y L.M. Libbey. AVI Publ., Westport, Connecticut. pp. 465-491.

HODGE, J.E. (1953). "Chemistry of browning reaction in a model system". *J. Agric. Food Chem.* 1, 928-948.

HOLT, C. (1985). "The milk salts: their secretion, concentrations and physical chemistry". En: "Developments in Dairy Chemistry.-3: Lactose and Minor Constituents". (P.F.. Fox, ed., pp 143-18. Elsevier, London.

HOMMA, S., FUJIMAKI, MM., (1981). "Growth response of rats fed a diet containing non-dialyzable melanoidin". *Prog. Food Nutr. Sci.* 5, 209-16.

HOWIE, P.W., FORSYTH, J.S., OGSTON, S.A., CLARK, A.& FLOREY, C.DU V. (1990). "Protective effect of breast feeding against infection". *British Medical Journal* 300, 11-16.

HURRELL, R.F., FURNIS, D.E., BURR, J., ET AL. (1989). "Iron fortification on infant cereals: a proposal for the use of ferrous fumarate or ferrus succinate". *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 1274-1282.

Bibliografía

HURRELL, R.F., BERROCAL, R., LYNCH, S.R., ET AL. "The influence of bovine milk proteins on iron absorption in man". En Herberg S, Galan P, Dupin H, editors: "Recent knowledge on iron and folate deficiencies in the world". Colloque INSERM 197:265, 273.

HURRELL, R.F., LYNCH, S.R., TRINIDAD, T.P., DASSENKO, S.A., COOK, J.D. (1989). "Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins". *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 546-52.

HURRELL, R.F., Y CARPENTER, K.J. (1976). "Mechanisms of heat damage in proteins. 7. The significance of lysine-containing isopeptides and of lanthionine in heated proteins". *British J. Nutr.* 35, 383.

HURRELL, R.F., Y CARPENTER, K.J. (1977). "Mechanisms of heat damage in proteins. 8. The role of sucrose in the susceptibility of protein foods to heat damage". *British J. Nutr.* 38, 285-297.

HURRELL, R.F., FINOT, P.A., FORD, J.E. (1983). "Storage of milk powders under adverse conditions, 1. Losses of lysine and other essential amino acids". *British J. Nutr.*, 49, 343-354.

HURRELL, R.F. & FINOT, P.A. (1983). "In: Nutritional adequacy, nutrient availability and needs". J. Mauron (ed.), Birkhäuser Verlag, Basel, p.135.

HURRELL, R.F., Y FINOT, P.A. (1985). "Effects of food processing on protein digestibility and amino acid availability". En: "Digestibility and amino acid availability in cereals and oilseeds". pp.: 233-246. Finley, J.W., y Hopkins, D.T. (Eds.), American Association of Cereals Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota.

HURRELL, R.F., BERROCAL, R., NEESER J.R, SCHWEIZER, T.F., HILPERT, H., TRAITLER, H., COLAROW, L., LINDSTRAND, K. (1989). "Micronutrients in Infant Formula In: Micronutrients in Milk and Milk-Based Food Products". Ed. Renner E. Elsevier Science Publishers Ltd. Essex, England, pp 239-294.

- HURRELL, R.F., DAVIDSSON, L., REDDY, M., KASTENMAYER, P., COOK, J.D. (1998). "A comparison of iron absorption in adults and infants consuming identical infant formulas". *B. J. of Nutrition*, 79, 31-36.
- HURRELL, R.F., FINOT, P.A., FORD, J.E. (1983). "Storage of milk powders under adverse conditions". 1. Loss of lysine and other essential amino acids. *Br. J. Nutr.* 49, 343-354.
- HURRELL, R.F., BERROCAL, R., NEESER, J.R., SCHWEIZER, T.F., HILPER, H., TRAITER, H., COLAROW, L., LIND STRAND, K., (1989). "Micronutrients in infant formula. En: *Micronutrients in milk-based products*" Capitulo 4. Ed. Renner, e. Elsevier Science Publisher LTD, London y New York, pp. 209:303
- HURRELL, R.F. (1984). En: "Developments in Food Proteins", vol. 3 (B.J.F. Hudson, ed). Elsevier, London, pp. 213-244.
- HURRELL, R.F. (1990). "Influence of the Maillard reaction on the nutritional value of foods". En: *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*. Ed. Finot, P.A., AESCHBACHER, H.U., HURRELL, R.F. Y LIARDON, R. BIRKHÄUSER VERLAG. BASEL.
- HURRELL, R.F., (1992). "Prospects for improving the iron fortification of foods" In: Fomon S. Zlotkin S (eds). *Nutritional anemias*. Raven press, New York, pp 193-208.
- HURRELL, R.F., (1997). "Bioavailability of iron." *European Journal Of Clinical Nutrition* 51, Suppl. 1, S4-S8
- HUTTON Y PATTON (1952). "The origin of sulfhydryl groups in milk proteins and their contribution to cooked flavour" *J. Dairy Sci.*, 35, 699.
- IFT (1989). *Microwave food Processing, A Scientific Status Summary by the IFT Expert Panel on Food Safety and Nutrition*. *Food Technology*, 43 (1), 117-126.

Bibliografia

- IYER, S. & LÖNNERDAL, B. (1993). "Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism". *European Journal of Clinical Nutrition* 47, 232-241.
- JANAS, L.M., PICCIANO, M.F. & HATCH, T.F. (1987). "Indices of protein metabolism in term infants fed either human milk or formulas with reduced protein concentration and various whey/casein ratios". *Journal of Pediatrics* 110, 838-848.
- JANAS, L. M. & PICCIANO, M.F. (1982). "The nucleotide profile of human milk". *Pediatric Research* 16, 659-662.
- JÄRVENPÄÄ, A.L., RÄIHÄ, N.C.R., RASSIN, D.K. & GAULL, G.E. (1982A). "Milk protein quantity and quality in the term infant.I.Metabolic responses and effects on growth". *Pediatrics* 70, 214-220.
- JÄRVENPÄÄ, A.L., RÄIHÄ, N.C.R., RASSIN, D.K. & GAULL, G.E. (1982B). "Milk protein quantity and quality in the term infant.II. Effects on acidic and neutral amino acids". *Pediatrics* 70, 221-230.
- JASON,J.M.,NIEBURG,P. & MARKS,J.S.(1984). "Mortality and infectious disease associated with infant-feeding practices in developing countries". *Pediatrics* 74,702-727.
- JELLIFFE, D.B. Y JELLIFFE, E.F.P. (1978). World consequences of early weaning. En: *Human milk in the modern world. Psychosocial, nutritional and economic significance.* Oxford, 1978. Oxford University Press, pp. 241-299.
- Jl, H., BERNHARD, R.A. (1992). "Effect of Microwave Heating on pyzine formation in a model system". *J. Sci. Food Agric.* 59, 283-289.
- JOHNSON, P.E., LYKKEN, G., MAHALKO, J., MILNE, D., INMAN, L., SANDSTEAD, H.H. (1986). "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.* Eds. Waller, G.R. y Feather, M.S. . Am. Chem. Soc. U.S.A. pp. 349-360.

JONSSON, L. (1989). "Nutritional changes during microwave cooking and reheating". *Var Föda* 41 (4), 188-194.

KAANANE, A., Y LABUZA T.P. (1989). "The Maillard reaction in foods". En: "The Maillard reaction in aging, diabetes, and nutrition". Alan R. Liss, Inc. pp: 301-327.

KANNAN, A. Y JENNESS, R. (1961). "Relation on milk serum proteins and milk salts to the effects of heat treatment on rennet clotting" *J. Dairy Sci.*, 44, 822.

KAPSOKEFALOU, M. Y MILLER, D.D. (1993). "Lean beef and beef fat interact to enhance nonheme iron absorption in rats". *J. Nutr.*, 123, 1429-1434.

KASAI, H., YAMAIZUMI, Z., WAKABAYASHI, K., NAGAO, M., SUGIMURA, T., YOKOYAMA, S., MIYAZAWA, T., NISHIMURA, S. (1980). *Chem. Lett.* 1391-1394. Citado por: JÄGERSTAD, M., LASER REUTERSWÄRD, A., ÖSTE, R., DAHLQVIST, A.

KUNZ, C. & RUDOLFF, S. (1993). "Biological functions of oligosaccharides in human milk". *Acta Paediatrica* 82, 903-912.

KASAI, H., YAMAIZUMI, Z., SHIOMI, T., YOKOYAMA, S., MIYAZAWA, T., WAKABAYASHI, K., NAGAO, M., SUGIMURA, T., NISHIMURA, S. (1981). *Chem. Lett.* 485-488. Citado por: JÄGERSTAD, M., LASER REUTERSWÄRD, A., ÖSTE, R., DAHLQVIST, A. GRIVAS, S., OLSSON, K., NYHAMMAR, T. (1983). "Creatinine and Maillard Reaction Products as precursors of mutagenic compounds formed in fried beef. En: *The Maillard reaction in food and nutrition*. Eds: Waller, G.R. y Feather, M.S. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington D.C. pp 507-518.

KATO, Y., MATSUDA, T., KATO, N., NAKAMURA, R. (1988). "Browning and protein polymerization induced by amino-carbonyl reaction of ovalbumin with glucose and lactose". *J. Agric. Food Chem.*, 34, 351-355.

KATO, Y., MATSUDA, T., KATO, N., WATANABE, K., NAKAMURA, R. (1986).

Bibliografia

"Browning and insubilization of ovalbumin by the Maillard reaction with some aldohexoses".
J. Agric. Food Chem., 34, 351-355.

KAUP, S.M., BEHLING, A.R., CHOQUETTE, L., GREGER, J.L. (1990). "Calcium and magnesium utilization in rats: effect of dietary butterfat and calcium and of age" J. Nutr. 20, 266-273.

KAUP, S.M., BEHLING, A.R., CHOQUETTE, L., GREGER, J.L. (1990). "Calcium and magnesium utilization in rats: effect of dietary butterfat and calcium and of age". J. Nutr., 20, 266-273.

KEEN, C.L., LÖNNERDAL, B., CLEGG, M. HURLEY, L.S. (1981). "Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrates and fat". J. Nutr. 111, 226-230.

KEEN, C.L., & HURLEY, L.S. (1980). "Developmental changes in concentration of iron, copper, and zinc in mouse tissues". Mech. Ageing Deve. 13, 161-177.

KEITH, M.O., BELL, J.M. (1988). "Digestibility of nitrogen and amino acids in selected protein sources to fed mice". J. Nutr. 118: 561-8.

KELSAY, J.L., Y PRATHER, E.S. (1983). "Mineral balances of human subjects consuming spinach in a low-fiber diet and in a diet containing fruits and vegetables". Am. J. Clin. Nutr., 38: 12-19.

KIES, C.V. (1988). "Mineral utilization of vegeterians: impact in fat intake". Am. J. Clin. Nutr., 48, 884-887.

KIES, C.V. (1988). "Mineral utilization of vegetarians: impact of variation in fat intake". Am. j. Clin. Nutr., 48, 884-887.

KIES, C.V., (1985). "Effect of dietary fat and fiber on calcium bioavailability" En:

"Nutritional bioavailability of calcium". American Chemical Society, Kies, ed., ACS Symposium Series, 275, pp. 175-187.

KIMIAGAR, M., LEE, T.C., CHICHESTER, C.O. (1980). "Long term feeding effects of browned egg albumin to rats" J. Agric. Fd. Chem. 28, 150-155.

KING, A., BOSCH, N. (1990). "Effects of NaCl and ClK on rancidity of dark turkey meat heated by microwave". J. Food Sci., 55, 1549-1551.

KIRCHGESSNER, M., HARTEL, J. (1977). "Zur intermediären Zinkverfügbarkeit 15 verschiedener Zinkverbindungen". Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 38: 138-146.

KIRIGAYA, N., KATO, H., FUJIMAKI, M. (1968). "Studies on antioxidant activity of nonenzymatic browning reaction products. Part I. Relations of color intensity and reductones with antioxidant activity of browning reaction products". Agric. Biol. Chem., 32, 287-290.

KLEIN, L. B., MONDY, N. I., (1981). "Comparison of microwave and conventional baking of potatoes in relation to nitrogenous constituents and mineral composition". J. Food Sci. 46, 1874-1880.

KLOSTERMEYER (1982). Proceedings Seminar "Challenges to Contemporary Dairy Analytical Techniques". Reading, pp. 236.

KLOSTERMEYER, H., FRITSCH, R.J. (1981). Molkerei-Ztg. (Hildesheim) 35, 1137-1141. En: Milk and Dairy products in human nutrition. Edmund Renner. W-GmbH, Volkswirtschaftlicher Verlag, Munchen

KLOSTERMEYER, H., RABEL, K., REIMERDES, E.-H. (1975) Milchwiss. 30, 194-198.

KORSCHGEN, B., BALWIN, R. (1978). "Moist-heat microwave and conventional cooking of round roast of beef". Journal of Microwave Power, 13 (3), 257-262.

- KUDO, S. N. Z. (1980). *J. Dairy Sci.*, Tech. 15, 258.
- KUNZ, C. & LÖNNERDAL, B. (1992). "Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk". *Acta Paediatrica* 81, 107-112.
- KUNZ, C. & RUDLOFF, S.(1993). "Biological functions of oligosaccharides in human milk".*Acta Paediatrica* 82, 903-912.
- LABUZA, T.P., Y SALT MARCH, M. (1981). "Kinetics of browning and quality loss in whey powders during steady state and non-steady state storage conditions". *J. Food Sci.*, 47, 92-96.
- LABUZA T P, SALT MARCH M 1981 Kinetics of browning and protein quality loss in whey powders during steady state and nonsteady state storage conditions. *J Dairy Sci* 47 92-113.
- LANGHENDRIES J P, HURRELL R F, FURNISS D E, HISCHENHUBER C, FINOT P A, BERNARD A, BATTISTI O, BERTRAND J M, SENTERRE J (1992). Maillard reaction products and lysinoalanine: urinary excretion and the effects on kidney function of preterm infants fed heat-processed milk formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 14 62-70.
- LARSON Y ROLLERI (1955). "Heat denaturation of the specific serum proteins in milk" *J. Dairy Sci.* 38, 351-360.
- LAU, K., (1986). " Phosphate disorders". In kokko JP, Tannen RL, editirs: *Fluids and electrolytes*, Philadelphia. W.B. Saunders,pp. 398-470.
- LAU, B. L. T., KAKUDA Y., ARNOTT, D.R. (1989). "Effect of milk fat on the stability of vitamin A in ultra-high temperature milk". *J. Dairy Sci.* 69, 2052-2059.
- LEE, C.M., SHERR, B., KOH, Y. N. (1984). "Evaluation of kinetic parameters for a glucose-lysine Maillard reaction". *J. Agric. Food. Chem.*, 32, 379.
- LESLIE, A. J. Y KALDOR, I. (1971). "Liver and spleen nonheme iron and ferritin

composition in the neonatal rat". *Am. J. Physiol.* 220, 1000-1004.

LEVEY, G.A. (1982). *Light, Milk and Vitamines*, Paperboard Packaging Council, New York, U.S.A.

LINDBERG, J.S., ZOBITZ, M.M., POINDEXTER, J.R., PAK, CYC. (1990). "Magnesium bioavailability from magnesium citrate and magnesium oxide". *J. Am. Coll. Nutr.* 9: 48-55

LINDER, M.C. (1988). "Nutrición y metabolismo de los elementos mayoritarios". En: "Nutrición. Aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos". Linder, M.C. ed. Editorial Eunsa, Pamplona. Cap. 6. pp. 169-188.

LINDER, M.C. (1988b). "Nutrición y metabolismo de los elementos traza". En: "Nutrición. Aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos". Linder, M.C. ed. Editorial Eunsa, Pamplona. Cap. 7. pp. 189-241.

LINGNERT, H. (1990). "Development of the Maillard reaction during food processing". En: "The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology". Ed. Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrell, R.F. Y Liardon, R. Birkhäuser Verlag. Basel.

LIU Y.M, NEAL P., ERNST J. ET AL.(1989). "Absorption of calcium and magnesium from fortified human milk by very low birth weight infants". *Pediatr Res* 25:496-502.

LÖNNERDAL, B. (1989). "Trace elements nutrition in infants". *Annu. Rev. Nutr.* 9: 109-25.

LÖNNERDAL, B. (1990). "Iron in human milk and cow's milk-effects of binding ligands on bioavailability. En Lönnerdal B, editor: "Iron metabolism in infants, Boca Raton, FI, CRC Press, pp. 87-107.

LÖNNERDAL, B. & CHEN, C.-L. (1990). "Effects of formula protein level and ratio on infant growth, plasma amino acids and serum trace elements.1 . Cow's milk formula". *Acta*

Bibliografía

Paedriatica Scandinavica 79, 257-265.

LÖNNERDAL, B., BELL, J., HENDRICKX, A.G., BURNS, R.A., KEEN, C.L., (1988). "Effect of phytate removal on zinc absorption from soy formula". Am.J. Clin: Nutr. 48: 1301-6.

LÖNNERDAL, B., BELL, J., KEEN, C.L. (1985). " Copper absorption from human milk, cow's milk and infant formulas using a suckling rat model". Am. J. Clin. Nutr. 42, 836-844.

LOPEZ-VARELA, S., SANCHEZ-MUNIZ, F.J., CUESTA, C. (1995). "Decreased food efficiency ratio, growth, retardation and changes in liver fatty acid composition in rats consuming thermally oxidized and polymerized sunflower oil used for frying". Fd. Chem. Toxic., 33, 3, 181-189.

LORENZ, K. (1976). "Microwave heating of food". Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 339-370.

LUBEC, G., WOLF, C., BARTOSCH, B. (1990). "Aminoacid isomerization and microwave exposure". The Lancet, Vol. 334 1392-1393.

LUCAS, A., DAVIES, P.S.W., PHIL, M. (1990). "Physiologic energy content of human milk". En: Breastfeeding, Nutrition, Infection and Infant Growth in Developed and Emerging Countries Eds: Atkinson, S.A., Hanson, L.A. y Chandra, R.K. Newfoundland: ARTS Biomedical Publishers and Distributors. pp. 337-357.

LUND, D.B. (1982). J. Food Project. 45, 367-373.

LYKKEN, G.I., MAHALKO, J., JOHNSON, P.E., MILNE, D., SANDSTEAD, H.H., GARCÍA, W.J., DINTZIS, F.R., INGLETT, G.E. (1986). "Effects of browned and unbrowned corn products intrinsically labeled with ⁶⁵Zn on absorption of ⁶⁵Zn in humans". J. Nutrition, 116, 795-801.

LYSTER, R.L.J. (1979). In: Effects of heating in foodstuffs, R.J. Priestley (ed.). Elsevier Appl., Sci. Publ., Barking, UK, p:353.

MABESA, L., BALDWIN, R.E. (1979). "Ascorbic acid in peas cooked by microwaves". J. Food Sci., 44, 932-933.

MACGILLIVRAY, P.C., FINLAY, H.V.L., BINNS, T.B. (1959). "Use of lactulose to create a preponderance of lactobacilly in the intestine of bottle-fed infants". Scott. Med. J 4: 182-189.

MAGA, J.A., TWOMEY, J.A. COHEN, M. (1977). "Effects of baking methods on the fatty acid composition of potatoes". J. Food Sci. 42, 1669.

MAI, J., TSAI, C. H., ARMBRUSTER, G. , CHU, P., KINSELLA, J.E. (1980). "Effects of microwave cooking on food fatty acids, no evidence of chemical changes or isomerization". J. Food Sci. 45, 1753.

MARCOS, A., VARELA, P., ARCE, M^a M., CASTRILLON, A.M^a (1991). "Maillard reactions products as immunomodulating agents: an "in vivo study". Proceedings of the Interdisciplinary Conference on Effects of Food on The Immune and Hormonal Systems. Ed.: Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology and University of Zürich, Schwerzenbach, Switzerland. pp.: 86-90.

MARCHELLI, R. DOSSENA, A., PALLA, G. AUDHUY-PEAUDECERF, M., LEFEUVRE, S., CARNEVALI, P., FREDDI, M. (1992). "D-amino acids in reconstituted infant formula, A comparison between conventional and microwave heating". J. Sci. Food Agric., 59, 217-226.

MARTINEZ GOMEZ, M. y HERNANDEZ RODRIGUEZ, M. (1993). En: Alimentación infantil. Hernández Rodriguez, M. I.S.B.N.: 84-7978-090-8. Cap. 5, pp. 45.

MARTÍNEZ-CASTRO, I., OLANO, A. (1978). " Determination of lactulose in commercial

Bibliografía

milks". Rev. Esp. Lechería 110, 213-217.

MARTÍNEZ-TORRES, C., EGIDIO ROMANO, E & LAYRISSE, M.D. (1981).: "Effect of cysteine on iron absorption in man". Am. J. Clin. Nutr. 34, 322-327.

MAURON, J. (1977). "General Principles involved in measuring specific damage of food components during thermal processes" Physical, Chemical and Biological Changes in Food caused by Thermal Processing. Applied Science Publishers. London, 1977.

MAURON, J. (1981). "The Maillard reaction in food, a critical review from the nutritional standpoint". in Eriksson, Prog. Food Nutr. Sci. Pergamon Press, Oxford. Vol. 5, pp. 5-35.

MAURON, J. (1985). "Influence of processing on protein quality". (Karger, Basel). *Bibliotheca Nutr, Dieta*, N° 24, pp. 56-81

McCOMAS, M. (1988). Origins of the controversy. En: Dobbing J. editor Infant feeding. Anatomy of a controversy, 1973--1984. Berlin 1988, Springer-Verlag, pp. 29-41.

DIEPENMAAT-WOLTERS, M.G.E.; SCHREUDER, H.A.W. (1993). "A continuous in vitro method for estimation of the bioavailability of minerals and trace elements in foods". En: Bioavailability '93. Vol. 2. Ed.: U. Schlemmer. Bundesforschungsanstalt für Ernährung. pp 43-47.

MEDRANO, A., HERNANDEZ, A., PRODANOV, M., VIDAL-VALVERDE, C. (1994). "Riboflavin, α -tocopherol and retino retention in milk after microwave heating". *Lait* 74, 153-159.

MELA, D.J. (1990). "The basis of dietary fat preferences". *Trends Food Sci. Technol.*, I, 3, 71-73.

MENDEZ, A., OLANO, A. (1979). "Lactulose. A review of some chemical properties and applications in infant nutrition and medicine". *Diary Sci. Abstr.* 41, 531-535.

METAXAS, A.C., MEREDITH, R.J. (1983). "Industrial microwave heating. IEE power engineering series, 4 P. Peregrinus on behalf of Institution of Electrical Engineers.

MILES, J.P. (1982). . J. Assoc Off Anal Chem 65,1482. Citado en Hurrell et al. (1989).

MIZOTA, T., TAMURA, Y., TOMITA, M., OKONOJI, S. (1987). "Lactulose as a sugar with physiological significance". Bulletin 21

MONNIER, V.M. Y CERAMI, A. (1983). " Nonenzymatic glycosilation and browning of proteins in vivo" En: The Maillard reaction in foods and nutrition. Waller, G.R. y Feather, M.S. Ed. Am. Chem. Soc. U.S.A.

MUDGETT, E. (1989). "Microwave food processing". Food Technology 43 (1)., 2-10.

NAGENDRA, R. Y VENKAT, R. (1992). "Effect of incorporation of lactulose in infant formulas on the intestinal bifidobacterial flora in rats". Inter. Journal of Food Sciences and Nutrition 43, 169-173.

NAGENDRA R, VISWANATHA S, NARASIMHA MURTHY K, VENKAT RAO S 1994 Effect of incorporation lactulose in infant formula on absorption and retention of nitrogen, calcium, phosphorus and iron in rats. Int Dairy J 4 779-788.

NAKAI ,S. & LI-CHAN, E. (1987). "Effect of clotting in stomachs of infants on protein digestibility of milk". Food Microstructure 6,161-170.

NAMIKI, M. (1988). "Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reactions mechanism and the development of antioxidants and mutagens". Advances in Food Research, 32, 115-183.

NANGPAL, A., REUTER, H., KIESNER, C.(1990). "Reaction kinetics of lactulose and furosine formation. Influence of dilution of milk during direct UHT treatment". Kiel. Milchwirtsch. Forschungsberi 42 ,53-64.

Bibliografía

NANGPAL, A., REUTER, H., KIESNER, C. (1990). "Reaction kinetics of lactulose and furosine formation. Influence of dilution of milk during direct UHT treatment". *Kiel Milchwirtsch. Forschungsberi*, 422, 53-64.

NAVEH, Y., HAZANI, A., BERANT, M., (1981). "Copper deficiency with cow's milk diet". *Pediatrics* 68: 397-400

NESHEIM Y CARPENTER (1967). FOMON, S.J. (1974). En: *Nutrición Infantil*. Segunda edición. Ed. Interamericana, pp 119.

NICOLAYSEN R., EEG-LARSEN, N., MALM, O.J. (1953). "Physiology of calcium metabolism". *Physiol. Rev.*, 33, 424-436.

NIELSEN, H.K., HURRELL, R.F. (1983). "Content and stability of tryptofan in foods, in Schlossberg et al., L 22. ISTRY-83. Fourth Intern. Meeting on tryptophan metabolism, biochem., pathology and regulation". (de Gruyter, Berlin 1983).

NOVAK, D.A., CARVER, J.D. & BARNES, L.A. (1994). "Dietary nucleotides affect hepatic growth and composition in the weanling mouse". *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 18, 62-66.

OKAMMOTO, E., RASSIN, D.K., ZUCKER, C.L. SALEN, G.S., HEIRD, W.C. (1984). "Role of taurine in feeding the low birth weight infant". *J. Pediatr.* 104, 936-940.

OLANO, A., CALVO, M.M., REGLERO, G.(1989). "Analysis of free carbohydrates in milk using micropacked columns". *Chromatographia* 21, 538-540.

OMURA, H., JOHAN, N., SHINOHARA, K., MUKARAMI., H. (1984). "Formation of mutagens by the Maillard reaction". In: *the Maillard reaction in foods and Nutrition*, Waller GR and Feather Ms, Eds ACS Symp Ser 215: 537-564.

O'BRIEN, J. Y WALKER, R. (1988). "Toxicological effects of dietary Maillard reaction

products in the rat". *Fd. Chem. Toxic.* 26, 775-783.

PACKARD, V.S., (1982). En: *Human milk and infant formula*. Academic Press, New York, pp60. Citado en Hurrell et al. (1989).

PAHWA, A. AND MATHUR, B.MN. (1982). "influence of oral ingestion of bifidobacteria on the intestinal microflora and nutritional absorption among rats". *Indian J. Nutr. Diet.*, 19 267-272.

PAJARON, M., LOPEZ- SANCHEZ, M., MORAN, J.(1995). "Composición nutricional de la leche de mujer en España". En :IIº Symposium internacional. Nuevas perspectivas en nutrición infantil. Editores :Borrajó, E., López, M., Pajarón, M., Morán, J. Ediciones Ergon, S.A. Madrid.

PARNELL-CLUNIES, E., KAKUDA, Y., IRVINE, D., MULLEN, K.(1988). "Heat-induced protein changes in milk processed by vat and continuous heating systems". *J. Dairy Sci.* 71, 1472-1483.

PATTON, J.S. Y CAREY, M.C. (1979). "Atching fat digestion". *Science*, 204, 145-148.

PELET, B. Y DONATHAN, A. (1974). *Helvética Peddiatrica Acta* 29, 35 (from *Diary Science Abstracts* 1975, 37, 1853).

PELLEGRINO L, DE NONI I, RESMINI P 1995 Coupling lactulose and furosine indices for quality evaluation of sterilized milk. *Int Dairy J* 5 647-659.

PÉREZ GRANADOS, A.M. (1997). "Consumo de grasas crudas y fritas y utilización nutritiva de minerales". Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid-Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

PEREZ GRANADOS, A.M., VAQUERO, M.P., NAVARRO, M.P. (1991). "Iron bioavailability in pregnant rats consuming a used frying olive oil". En: "Trace elements in

Bibliografía

man and animals", Tema 7.B. Momcilovic ed. Institute for Medical Research and Occupational Health University of Zagreb. pp. 25.8-25.9.

PEREZ GRANADOS, A.M., VAQUERO, M.P., NAVARRO, M.P. (1995). "Iron Metabolism in rats consuming oil from fresh or fried sardines". *Analyst*, Vol 120, 899-903.

PETRIELLA, C., KUSNIK, S.L., LOZANO, K.D., CHIKIFE, J. (1985). "Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: color changes due to non-enzymatic browning". *J. Food Sci.*, 50, 622-626.

PETUELY, F. (1957). *Z. Kinderheilk* 79, 174.

PICCIANO, M.F. (1985). En: *Trace Elements in Nutrition of Children*. Ed.: Chandra, Raven Press, New York, pp 157.

PICONE, T.A., BENSON, J.D., MORO, G., MINOLI, I., FULCONIS, F., RASSIN, D.K. & RÄIHÄ, N.C.R. (1989). "Growth, serum biochemistries and aminoacids of term infants fed formulas with amino acid and protein concentrations similar to human milk". *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 9, 351-360.

PIEN, J. (1972). *Lait* 51, 176-202.

PIENIAZEK, D., RAKOWSKA, M., KUNACHOWICZ, H. (1975). "The participation of methionine and cysteine in the formation of bonds resistant to the action of proteolytic enzymes in heated casein". *British J. Nutr.*, 34, 163.

PIERGIOVANNI, L. Y VOLONTERIO, G. (1977). *Lait* 2, 603. Citado por: SCOTT, K.J (1989). "Micronutrients in milk products" En: *Micronutrients in milk products and milk based food products* Editado por: Renner, E. Elsevier Science Publishers Ltd. Essex, England, pp 71-123.

PIERRE, A., BRILE, G., FAUQUANT, J., PIOT, M. (1977). *Lait* 57, 646.

POKORNY, C. (1981). "Browning from lipid-protein interactions". *Prog. Food Nutr. Sci.* 5, 421-8.

POWERS, J. H. (1997). "Vitamin requirements for term infants: considerations for infant formulae". *Nutrition Research Reviews*, 10, 1-33.

PRENTICE, A.M., LUCAS, A., VASQUEZ-VELASQUEZ, L., DAVIES, P.S.W., WHITEHEAD, R.G. (1988). "Are current dietary guidelines for young children a prescription for overfeeding?". *Lancet*, II, 1066-1069.

PRONCZUK Y COL. (1973). FOMON, S.J. (1974). En: *Nutrición Infantil*. Segunda edición. Ed. Interamericana, pp 119.

QUAN, R. & BARNES, L. A. (1990). "Do infants need nucleotide supplemented formula for optimal nutrition?". *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 11, 429-434.

RÄIHÄ, N., MINOLI, I & MORO, G. (1986a). "Milk protein intake in the term infant. I. Metabolic responses and effects on growth". *Acta paediatrica Scandinavica* 75,881-886.

RÄIHÄ, N., MINOLI, I., MORO, G. & BREMER, H.J. (1986b). "Milk protein intake in the term infant. II. Effects on plasma amino acid concentrations". *Acta paediatrica Scandinavica* 75,887-892.

RÄIHÄ, N.C.R. (1985). "Nutritional proteins in milk and the protein requirement of normal infants". *Pediatrics* 75, S136-S141.

RANHOTRA, G.S., LOEWE, R.J., PUYAT, L.V (1973). "Bioavailability of magnesium from wheat flour and various organic and inorganic salts". *Cereal Chem.* 53, 770-776.

RASSIN, D.K., GAULL, G.E., JÄRVENPAA, A., RÄIHÄ, N. (1983). *Pediatrics*, 71, 179.

REDDY, B.S., PLEASANTS, J.R., WOSTMANN, B.S. (1972). "Effects of intestinal

Bibliografía

microflora on iron and zinc metabolism and on activities of metalloenzymes in rats". J. Nutr., 102, 101-8.

RENNER, E. (1981b) "Aust. Soc. Dairy Technol. Techn. Publ. 26, 41-53.

RENNER, E. (1983). "Milk and dairy products in human nutrition". W-GmbH, Volkswirtschaftlicher Verlag, München.

RENNER, E. (1983). "The heating of milk". En:"Milk and dairy products in human nutrition". W-GmbH, Volkswirtschaftlicher Verlag, München,pp.280-298.

RENNER, E. (1979). In: Proceedings International Conference on UHT Processing and Aseptic Packaging, Nov. 1979. Dept. of Food Science, North Carolina State University, Raleigh, NC (también ver en: Seminar on UHT Processing. Australian Society of Dairy Technology, Technical Publication No. 26, 1981).

RENNER, E., DORGUTH, H. (1980). Deu. Milchwirtsch.31,505-508. En: Milk and Dairy products in human nutrition. Edmund Renner. W-GmbH, Volkswirtschaftlicher Verlag, Munchen

RESMINI P, PELLEGRINO L, ANDREINI R, PRATI F 1989 Evaluation of milk whey proteins by reversed-phase HPLC. Sci Tecn Latt Cas 40 7-23.

REYKDA, O., Y LEE, K. (1991). "Soluble, dialysable and ionic calcium in raw and processed skim milk, whole milk and spinach". J. Food Sci., 56 No. 3 pp 864-866.

RINGE, M.L., Y LOVE, M.H. (1988). "Kinetics of protein quality change in an extruded cowpea-coru flour blend under varied steady-state storage conditions". J. Food Sci., 53, 584-588.

ROIG, M. J. (1997). "Biodisponibilidad de cobre y calcio en leche y fórmulas para lactantes" Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

ROLLS, B.A., PORTER, J.W.G., (1973). Proc. Nutr. Soc. 32,9.

ROLLS, B.J. Y SHIDE, D. (1992). "The influence of dietary fat on food intake and body weight". Nutrition Reviews, 50, 10, 283-290.

ROSE (1962). "Factors affecting the heat stability of milk" J. Dairy Sci. 45, 1305-1311.

ROSENBERG, U., BÖGL, W. (1987). "Microwave thawing, drying and baking in the food industry". Food Technology, 85-91.

ROSSI, M., POMPEI, C. "1991 Changes in liquid milk-based infant formulas during heat treatments". Ital. J. Food Sci. 1, 39-47.

ROSSI, M., POMPEI, C. (1991). "Changes in liquid milk-based infant formulas during heat treatments". Ital. J. Food Sci., 1, 36-47.

RUBIN, D.H., LEVENTHAL, J.M., KRASILNIKOFF, P.A., KUO, H.S., JEKEL, J.F., WEILE, B., LEVEE, A., KURZON, M & BERGET, A. (1990). "Relationship between infant feeding and infectious illness: a prospective study of infants during the first year of life". Pediatrics 85, 464-471.

RYLEY, J. (1989). "Efectos nutricionales del calentamiento por microondas". Nutrition Bulletin, 55, The British Nutrition Foundation, 14, 1, 46-62.

SAID, A. K., HEGSTED, D.M., HAYES, K.C. (1974). "Response of adult rats to deficiencies of different essential amino acids" Brit. J. Nutr. 31, 47-57.

SAIZ MORENO, L., GARCIA DE OSMA, J.L., COMPAIRE, C. (1983). "Animales de Laboratorio. Cría, Manejo y Control Sanitario". Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid, España.

SALAMA, N.A. (1993). "Evaluation of two cooking methods and precooking treatment of

Bibliografía

characteristics of chicken breast and leg". *Grasa y Aceites*, 44, 1, 25-29.

SALTMARCH, R., VAGNINI-FERRARI, M., LABUZA, T.P. (1981). "Theoretical basis and application of kinetics to browning in spray-dried whey food systems". *Prog. Food Nutr. Sci.* 5, 331-44.

SANCHEZ MUÑOZ, F.J., BASTIDA, S., PEREA, S., CUESTA, C., ARAGONES, A. (1997). "Low dense lipoproteins in neonates with high cord serum cholesterol levels". *Acta Pediátrica* 86, 414-418

SANCHEZ-POZO, A., MORILLAS, J., MOLTO, L., ROBLES, R. & GIL, A. (1994). "Dietary nucleotides influence lipoprotein metabolism in newborn infants". *Pediatric Research* 35, 112-116.

SANDBERG, A.S., CARLSSON, N.G. Y SVANBERG, U. (1989). "Effects of Inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexafosfates on in vitro estimation of Iron Availability". *J. Food Sci.*, 54: 159-161.

SANDSTROM, B., KEEN, C.L., LÖNNERDAL, B. (1983). "An experimental model for studies of zinc bioavailability from milk and infant formulas using extrinsic labeling". *Am. J. Clin. Nutr.* 38, 420-428.

SANDSTRÖM, B., (1997). "Bioavailability of zinc". *European Journal of Clinical Nutrition* 51, Suppl. 1, S17-S19.

SARWAR, G., PEACE, R.W., BOTTING, H.G. (1989b). "Differences in protein digestibility and quality of liquid concentrate and powder forms of milk-based infant formulas fed to rats". *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 806-813.

SARWAR, G., BOTTING, H.G., PEACE, R.W. (1989). "Amino-Acid Rating Method for Evaluating Protein Adequacy of Infant Formulas". *J. Assoc. Off Anal Chem.* 72, 622-626.

SARWAR, G., PEACE, R.W., BOTTING, H.G. (1989). "Differences in protein digestibility and quantity of liquid concentrate and powder forms of milk-based infant formulas fed to rats". *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 806-13.

SCANLAN, R.A. (1978). *J. Dairy Sci.* 61, 855.

SCOTT, K.J., BISHOP, D.R. (1986). *J. Soc. Dairy Technol.* 39, 32.

SCOTT, K.J (1989). "Micronutrients in milk products" En: *Micronutrients in milk products and milk based food products*". Editado por: Renner, E. Elsevier Science Publishers Ltd. Essex, England, pp 71-123.

SCHAAFSMA, G., (1997). "Bioavailability of calcium and magnesium." *European Journal of Clinical Nutrition*, suppl.1, S13-S16.

SCHANLER, R.J., GARZA, C., O'BRIAN SMITH, E. (1985). "Fortified mothers milk for very low birth weight infants: results of macromineral balance studies. *J. Pediatr.* 107: 767-74

SCHLIMME, E., BUCHHEIM, W., HEESCHEN, W. (1993). "Beurteilung verschiedener Erhitzungsverfahren und Hitzeindikatoren fuer Konsummilch". *DMZ-Lebensmittelindustrie-und-Milchwirtschaft* 15, 64-69.

SCHUETTE, S.A., ZIEGLER, E.E., NELSON, S.E., JANGHORBANY, M. (1990). "Feasibility of using the stable isotope ^{25}Mg to study Mg metabolism in infants". *Pediatr. Res* 27: 36-40.

SCHULZ-LELL, G., DÖRNER, K., OLDIGS, H.D., SIEVERS, E. & SCHAUB, J. (1991). "Iron availability from an infant formula supplemented with bovine lactoferrin". *Acta Paediatrica Scandinavica* 80, 155-158.

SCHWARTZ, R., BELKO, A.Z., WEIN, E.M. (1982). "An in vitro system for measuring intrinsic dietary mineral exchangeability: Alternative to intrinsic isotopic labeling". *J. Nutr.*

112, 497-504.

SECRETIN, M.C. (1981). Reunión Soc. Suisse Rech. NUtr., p. 151-174.

SGARBIERI, V.C., AMAYA, J., TANAKA, M., CHICHESTER, C.O. (1973). J. Nutr., 103, 17-31.

SHARMA, R.K. (1980). Indian Dairyman 32, 619-621.

SHEIKH, M.S., SANTA ANA, C.A., NICAR, M.J., SCHILLER, L.R., FORDTRAN, J.S. (1987). "Gastrointestinal absorption of calcium from milk and calcium salts". N. Engl. J. Med. 317, 532-536.

SHEN, L., ROBBERECHT, H., VAN DEAL, P., DEELSTRA, H. (1995). "Estimation of the bioavailability of zinc and calcium from human, cow's, goat and sheep milk by an in vitro method". Biological Trace Element Research. Vol. 49, 107-118.

SHILES, M.E. (1984). "Magnesium. Nutrition reviews". Present knowledge in nutrition. The Nutrition Foundation, Washington D.C. pp 423-437.

SHINOHARA, K., FUKUMOTO, Y., TESNG, Y.K., INOUE, Y., OMURA, H. (1974). J. Agr. Chem. Soc. Japan 48, 499. Citado por OMURA H., JAHAN, n., SHINOHARA, K., MURAKAMI, H. (1983). "Formation of mutagens by the Maillard Reaction" En: The Maillard reaction in food and nutrition. Eds: Waller, G.R. y Feather, M.S. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington D.C. pp 537-563.

SHIPE, W.F., BASSETTE, R., DEAN, D.D., DUNKLEY, W.L., HAMMOND, E.G., HARPER, W.J., KLEYN, D.H., MORGAN, M.E., NELSON, J.H., SLATER, J.E. (1961). "Retention of nitrogen and minerals by babies 1 week old". Br. J. Nutr. 15: 83-8

SMITH, L.L. (1996). "Review of progress in sterol oxidations". Lipids, 31, 453-487.

- SOLOMONS, N.W., JACOB, R.A. (1981). "Studies on the bioavailability of zinc in man. IV. Effect of haem and nonhaem iron on the absorption of zinc". *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 475-481.
- SOLOMONS, N.W., PINEDA, O., VITERI, F., SANDSTEAD, H.H. (1983). "Studies on the bioavailability of zinc in humans: mechanism of the intestinal interaction of nonhaem iron and zinc". *J. Nutr.* 113, 337-349.
- SOUTHGATE, D., JOHNSON, I. Y FENWICK, G.R. (1989). "Nutrient availability: Chemical & Biological Aspects". The Royal Society of Chemistry.
- SOUTHON, S.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; HAZELL, T. (1988) "Trace element availability from the human diet". *Proc. Nut. Soc.*, 47, 27-35.
- SPENCER, H., LEWIN, I., FOWLER, J., et al. (1969). "Influence of dietary calcium intake on Ca⁴⁷ absorption in man". *Am. J. Med.* 46, 197-205.
- STEGINK, L.D., PITKIN, R.M. (1977). "Placental transfer of glucose-amino acids complexes present in parenteral nutrition". *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 265-278.
- STROME, J.H., NESBAKKEN, R., NORMANN, T., SKJORTEN, F., SKYBERG, D., JOHANNESSEN, B., (1969). "Familial hipomagnesemia" *Acta Paediatr. Scand.* 58: 433-7.
- SUGIMURA, T., KAWACHI, T., NAGAO, M., YAHAGI, T. SEINO, Y. OKAMOTO, T., SHUDO, K., KOSUGE, T., TSUJI, K., WAKABAYASHI, K., IITAKA, A., ITAI, A., (1977). *Proc. Japan Acad.* 53, 58. , TESNG, Y.K., INOUE, Y., OMURA, H. (1974). *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 48, 499. Citado por OMURA H., JAHAN, n., SHINOHARA, K., MURAKAMI, H. (1983). "Formation of mutagens by the Maillard Reaction" En: *The Maillard reaction in food and nutrition*. Eds: Waller, G.R. y Feather, M.S. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington D.C. pp 537-563.
- SUGIMURA, T., NAGAO, M., (1979). *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 66, 189-209. Citado por: JÄGERSTAD, M., LASER REUTERSWÄRD, A., ÖSTE, R., DAHLQVIST, A. GRIVAS,

Bibliografía

S., OLSSON, K., NYHAMMAR, T. (1983). "Creatinine and Maillard Reaction Products as precursors of mutagenic compounds formed in fried beef. En: The Maillard reaction in food and nutrition. Eds: Waller, G.R. y Feather, M.S. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington D.C. pp. 507-518.

SUZUKI, K., ENDO, Y., VEHARA, M., YAMADA, H., GOTO, S., IMMANURA, M., SCHIOZU, S. (1985). "Effect of lactose, lactulose and sorbitol on mineral utilization ad intestinal flora" *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi* 38, 39-42.

SUZUKI, K., VEHARA, M., ENDO, Y. YAMADA, H., GOTO, S. (1985). "Effect of lactulose and sorbitol on iron, zinc, copper utilization in rats" *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, 39, 217-219.

SWAISGODOD, H.E., JANOLINO, V.G., SLIWKOWSKI, M.X. (1979). Proc. Int. Conf. UHT Processing, Raleigh/USA, 67-76.

SWEETSUR, A.W.M., MUIR, D.D. (1980). *Journal Soc. Dairy Technology*, 33,101.

TANAKA, M., KIMIAGAR, M., LEE, T.C. CHICHESTER, C.O. (1977). "Effect of Maillard reaction on the nutritional quality of protien. En: Nutritional, Biochemical and Chemical Consequence of Protein Cross-linking. pp. 321-341. Plenum Press. New York.

TERAO, T. & OVEN, C.A. (1977). "Copper metabolism in pregnant and pospartum rat and pups". *Am. J. Physiol.* 232, E172-E179.

THOMAS, E.L., *J. Dairy Sci.* (1981). 64,1023.

TOBIAS (1952). "The origen of sulhydril groups in milk proteins and their contribution to cooked flavour". *J. Dairy Sci.* 35, 699.

TORRE, M., RODRIGUEZ, R., SAURA-CALIXTO, F. (1991). "Effects of dietary fiver and phytic acid on mineral availability". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1(1): 1-22.

TÖTER, D. (1979). Diss. Univ. Gießen.

TÖTER, D. (1980). Ernährungsind. 26-33.

TOVAR, L.R., SCHWASS, D.E. (1983). "D-Amino acids in processed proteins, their nutritional consequences". En, Xenobiotics in Foods and Feeds, eds. Finley J.W. & Schwass, D.E. ACS Symposium Series 234, American Chemical Society Washington, D.C.

TOVERUD, S. Y BOASS, A. (1979). "Hormonal control of calcium metabolism in lactation". En: Vitamins and Hormones. Vol. 37. ISBN 0-12-709837-2. Ed.: Academic Press

TSANG, R.C., STEICHEN, J.J., BROWN, D.R. (1977). Clin. Perinat. 4 385.

TSEN, C.C., REDDY, P.R.K., EL-SAMAHY, S.K. , GEHRKE, C.W. (1983). "Effect of the Maillard browning reaction on the nutritive value of breads and pizza crusts" En, The Maillard reaction in foods and nutrition. Eds., Waller, G.R. y Feather, M.S. Symposium Series 215. American Chemical Society Washington D.C.

TSEN, C.C. (1980). "Microwave energy for baking bread and its effect on the nutritive value of bread, a review". J. Food Protect., 43, 638.

TUCKER, B.W., RIDDLE, V., LISTON, J. (1983). "Loss of available lysine in protein in a model Maillard reaction system". En: The Maillard reaction in food and nutrition. Eds: Waller, G.R. y Feather, M.S. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington D.C.

TURNLUND, J.R., KING, J.C., GONG, B., KEYES, W.R., MICHEL, M.C. (1985). "A stable isotope study of copper absorption in young men: effect of phytate and alfa-cellulose". Am. J. Clin. Nutr. 42: 18-23.

TYSON, J. E., LASKY, R., FLOOD, D., MIZE, C., PICONE, T. & PAULE, C. L. (1989). "Randomized trial of taurine supplementation for infants \leq 1,300-gram birth weight: effect on

Bibliografía

auditory brainstem-evoked responses. *Pediatrics* 83, 406-415.

UAUY, R., STRINGEL, G., THOMAS, R. & QUAN, R. (1990). "Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat". *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 10, 497-503.

VALLE-RIESTRA Y BARNES (1970). FOMON, S.J. (1974). En: *Nutrición Infantil*. Segunda edición. Ed. Interamericana, pp 119.

VAN DEN BERG, GJ., YU, S., VANDER HEIJDEN A., LEMMERS, AG., BEYNEN, AC., (1993). "Dietary fructose versus glucose lowers copper solubility in the intestinal lumen of rats." *Biol. Trace Elem. Res.* 38:107-115.

VAN DEN BERG Y BEYNEN, (1992). "Influence of ascorbic acid supplementation on copper metabolism in rats". *Br J Nutr* 68: 701-715

VAN LEVERINK, J. (1980). *German Pat.* 2, 949, 216.

VAN DOKKUM, W., CLOUGHLEY., F.A., HUSHOLF, K.F., OOSTERVEN, L. (1983). "Effect of variations in fat and linoleic acid intake on the calcium, magnesium and iron balance in young men". *Ann. Nutr. Metab.*, 27, 361-369.

VAN SOEST, P.J. (1982). "Nutritional ecology of the ruminant. Ruminant metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and the chemistry of forages and plant fibers". O & B Books.

VAQUERO, M.P., NAVARRO, M. P. (1993). "Influence of moderate food restriction on calcium metabolism in pregnant rats". *Reprod. Nutr. Dev* 33, 209-221.

VAQUERO, M.P., NAVARRO, M.P. (1996). "Relationship between moderate food restriction during pregnancy and Fe, Zn and Cu contents in maternal tissues and foetuses". *R. Nutr. Dev.* 36, 333-334.

VAQUERO, M.P., VAN DEN HAMER, C.J.A. y SCHAAFSMA, G. (1991) In Vitro and In Vivo Methods for the Determination of Iron Availability from Breakfast Meals. In: Trace Elements in Man and Animals, Moncilovic, B. (ed). Intitute for Medical Research and Occupatinal Health University of Zagreb, Croatia, pp 103-104.

VAQUERO, M.P., VAN DOKKUM, W., BOS, K.D., WOLTERS M.G.E., SCHAAFSMA, G. LUTEN, J.B. (1992). "Disponibilidad in vitro de calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc de pan blanco o integral, asiladamente o en combinación con otros alimentos". Rev. Esp. Cienc. Aliment. 32 (1). pp 47-58.

VAQUERO, M.P., VELDHUIZEN, M., VAN DOKKUM, W., VAN DEN HAMER, C.J.A. y SCHAAFSMA, G. (1994) Copper Bioavailability from Breakfasts Containing Tea. Influence of the Addition of Milk. J. Sci. Food Agric., 64: 475-481.

VARELA, P., MARCOS, A., NAVARRO, M., P. (1992). "Zinc status in anorexia nervosa". Ann. Nutr. Metab., 361, 197-202.

VEISSEYRE, R. (1980). "Lactología Técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche". Editorial Acribia, Zaragoza. I.S.B.N. 84-200-0458-8.

VERALDI, G. (1988). "The charges". En: Dobbing J. editor Infant feeding. Anatomy of a controversy, 1973--1984. Berlin 1988, Spriner-Verlang, pp. 29-41.

VETTER, M. (1988). Thesis Univ. Giessen.

VIDAL-VALVERDE, C. Y REDONDO P. (1992). "Effect of microwave heating on the tiamin content of cow's milk". Journal of Dairy Research 60.

VISSER, J., MINIHAN, A., SMITS, P., TJAN, S.B., HEERTJE, I. (1986). Netherlands Milk Dairy Journal, 40,351.

WALSTRA, P. Y JENNESS, R. (1984). Dairy Chemistry adn Physics. New York: J. Wiley

& Sons.

WASSERHESS, P., BECKER, M. & STAAB, D. (1983). "Effect of taurine on synthesis of neutral and acidic sterols and fat absorption in preterm and full-term infants". *American Journal of Clinical Nutrition* 58, 349-353.

WHARF, S. G., FOX, T.E., FAIRWEATHER-TAIT, S. J., COOK, J. D. (1997). "Factors affecting iron stores in infant 4-18 months of age". *European Journal of Clinical Nutrition* 51, 504-509.

WHITEHEAD, R.G. (1988). "Are current dietary guidelines for young children a prescription for overfeeding?". *Lancet* ii, 1066-1069.

WHITELAW, M.L., WEARER, C.M. (1988). "Maillard browning effects on in vitro availability of zinc". *J. Food Sci.*, 53, n°5, 1508-1510.

WHITING, S.J.; WHITNEY, H.L. (1987) "Effect of dietary caffeine and theophylline on urinary calcium excretion in the adult rat". *J. Nutr.* 117, 1224-1228.

WIDDOWSON, E.M. (1965). "Absorption and excretion of fat, nitrogen and minerals from filled milks by babies one week old". *Lancet*, 3: 1099-1105.

WIDDOWSON, E.M., MCCANCE, R.A., HARRISON, G.E., et al. (1963). "Effect of giving phosphate supplement to breast-fed babies on absorption and excretion of calcium, strontium, magnesium, and phosphorus". *Lancet* ii: 1250, 1963.

WOMACK, M., HOLSINGER, V.H. (1979)., *J. Dairy Sci.* 62, 855.

WONG, W.W., HACHEY, D.L., INSULL, W., OPEKUN, A.R., KLEIN, P.D. (1993). "Effects of dietary cholesterol on cholesterol synthesis in breast-fed and formula-fed infants". *Journal of Lipid Research* 34, 1403-1411.

- WRIGHT, A.L., HOLBERG, C.J., MARTINEZ, F.D., MORGAN, W.J., TAUSSIG, L.M. & GROUP HEALTH MEDICAL ASSOCIATES. (1989). "Breast feeding and lower respiratory tract illness in the first year of life". *British Medical Journal* 299, 946-949.
- YEO, H.C.H., SHIBAMOTO, T. (1991). "Chemical comparison of flavors in microwaved and conventionally heated foods". *Trends Food Sci. Technol.*
- YEO, H.C.H., SHIBAMOTO, T. (1991). "Flavor and browning enhancement by electrolytes during microwave irradiation of the Maillard model system". *J. Agric. Food Chem.* 39, 948-951.
- YIN, Y., WALKER, C. E. (1995). "A quality comparison of breads baked by conventional versus nonconventional ovens, a review". *Sci. Food Agric.* 67, 283-291.
- YOSHIDA, H., KONDO, I., Y. KAJIMOTO, G. (1991). "Microwave heating on relative stabilities of tocopheroles in oil". *J. Food Sci.*, 56 (4), 1042-1046.
- YOSHIDA, H., KONDO, I., Y. KAJIMOTO, G. (1993). "Effects of microwave energy on the relative stability of vitamin E in animal fats". *J. Sci. Food Agric.* 58, 531-534.
- YOSHIDA, H., NOBUHISA, H., KAJIMOTO, G. (1990). "Microwave energy effects on quality of some seed oils". *J. Food Sci.* 55 (5), 1412-1416.
- ZADOW, J.G. (1969). "Studies of the ultra-heat treatment of milk. Part 1. Comparison of direct and indirect heating of whole milk". *Austr. J. Dairy Technol.* 24 (2), 44-49.
- ZADOW, J.G. (1980). *Aust. J. Dairy Technol.*, 140-144.
- ZAMBONI, G., PIEMONTE, G., BOLNER, A., ANTONIAZZI, F., DALL'AGNOLA, A., MESSNER, H., GAMBARO, G. & TATO, L. (1993). "Influence of dietary taurine on vitamin D absorption". *Acta Paediatrica* 82, 811-815.

Bibliografia

ZAMORA, R., HIDALGO, F.J. (1992). "Browning and fluorescence development during microwave irradiation of a lysine/ (E)-4,5 -Epoxy-(E)-2-Heptanal model system". J. Agric. Food Chem., 40,, 2269-2273.

ZIEGLER, E.E., FOMON, S.J. (1983). J. Pediat. Gastroent. Nutr., 2, 288.

ZIEGLER, E., RIPPEL, F., SCHWINGSHACKI, A. (1969). Wiener Medizinische Wochenschrift 119, 233.