

Universidad de Barcelona
Facultad de Farmacia
Departamento de Nutrición y Bromatología
Programa de Doctorado:
“Medicaments, Alimentació i Salut”
Bienio 2001-2003

**ESTUDIO DE LA CONSERVACIÓN DE LA LECHE HUMANA
Y DE LOS PREPARADOS PARA LACTANTES**

Memoria presentada por
Meritxell Romeu Nadal
para optar al grado de Doctor en Farmacia

Directoras:
Dra. M. Carmen López Sabater
Dra. A. Isabel Castellote Bargalló

Barcelona, Septiembre del 2006



Departament de Nutrició i Bromatologia

Facultat de Farmàcia

Av. Joan XXIII s/n

08028-Barcelona

Tel.: 93 402 45 12

Fax: 93 402 18 96

M. CARMEN LÓPEZ SABATER, Doctora en Farmacia y Profesora Titular del departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, y ANA ISABEL CASTELLOTE BARGALLÓ, Doctora en Farmacia por la Universidad de Barcelona

HACEN CONSTAR que el presente trabajo titulado: “Estudio de la conservación de la leche humana y de los preparados para lactantes” y que constituye la memoria presentada por MERITXELL ROMEU NADAL para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizado en el Departamento de Nutrición y Bromatología bajo su dirección. Asimismo, considerándola concluida, autorizan su presentación, a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste, firman la presente en Barcelona, a 12 de septiembre de 2006.

M. Carmen López Sabater

Ana Isabel Castellote Bargalló

AL BERNAT

AGRADECIMIENTOS

Són moltes les persones que amb la seva participació i ajut han col·laborat en aquest projecte i a les que voldria mostrar la meua gratitud.

- Voldria en primer lloc, agrair a la Dra. M. Carmen López Sabater i a la Dra. Ana Isabel Castellote Bargalló, directores d'aquesta tesi, el haver-me donat la oportunitat de fer la tesi en el seu grup, de les qui sempre he rebut un tracte molt amable. Gràcies perquè han estat un anys molt bons en la meua vida que no oblidaré, he gaudit molt treballant en el departament, he après moltíssim i sobretot gràcies per haver confiat en el meu treball i en haver-me ajudat a fer possible la realització d'aquesta tesi. Gràcies Carmen i Ana.

- A la Susanna de qui he après molt sobre diferents aspectes, especialment sobre la llet materna (que per cert, no hem pensava que fos tan important), de qui he rebut molts bons consells i amb la que hem passat moltes anècdotes “en busca de la llet”.

- A tots els meus companys i companyes de Greixos-2 amb els que he compartit tant moments difícils que semblava que no havia de sortir cap resultat, com moments molt divertits. Especialment, al Jorge a qui trobaré molt a faltar quan torni a Mèxic: les intenses xerrades, les anècdotes (recordant els assaigs organolèptics), les bromes, els bons consells, etc.; a la Karina, per la seva innocència al fer i dir les coses que també trobaré molt a faltar quan marxi a Mèxic; a la Isa (Isita) que sempre posa ordre al laboratori i amb la que sempre ens assabentem tard de les coses; a la Carolina, la meua successora de “la llet de les mamis”, que m’ha ajudat molt aquest últim període de la tesi, i a la que espero que li hagin ajudat una mica els meus consells (quan les coses no surten, paciència!!!); a l’Aleix, amb qui vam compartir durant 3 mesos un anglès mig catalanitzat. I igualment a la Marta i a la Olga.

- A tots els companys de tots els grups del departament, que durant aquest anys han realitzat tesines, tesis i altres projectes, als quals no acabaria de dir, que han suposat una ajuda inestimable en moltes ocasions, no només per donar-me una mà quan ho necessitava, sinó per l’actitud que han mostrat al fer-ho. A la Montse i al Fernando, sense l’ajuda dels quals moltes vegades hauria anat perduda.

- També voldria agrair al Dr. Philip C. Calder, director durant l’estada de 3 mesos a Southampton, UK, per la bona rebuda que vaig tenir i per haver-me donat la oportunitat d’introduir-me en una part del seu projecte confiant en el meu treball.

- A tota la gent que vaig conèixer a Southampton, especialment a l’Ali, la Gisela, el Piero, la Caroline i la Denise amb els que espero que l’amistat duri molt de temps, per això hauré d’anar fent alguna visita cap a Southampton i acabar de veure així tots els pubs. Gràcies per no haver deixat que em sentís sola.

- A tots els meus amics i amigues de Vimbodí, pel seu interès en la meua tesi, en especial a la Mireia, a la Ester, a la Glòria, a la Núria i a la Susanna per les bones estones en la estada en un pis d'estudiants a Barcelona, a la Rosa i a l'Àlex, amb els qui anem sortint a fer les nostres xerradetes de la gent de Vimbodí, per tal de no enyorar-nos massa. A la Lourdes, a la Sandreta, a la Ingrid i a l'Eulàlia a les qui he omplert el cap de la gran importància de la lactància materna, que sempre s'han preocupat de mi i de com anava la tesi, especialment quan vaig estar fora.

- A l'Ester (Esti) i a l'Ibarz (Ibi), uns molt bons amics, amb els qui ens coneixem de tota la vida i hem compartit moltes coses.

- A una bona amiga de Vilassà, la Isabel, amb la qui hem compartit pràcticament tots els mals de cap i il·lusions durant aquest període de la tesi.

- A les monadetes de l'Enric i el Biel, amb els qui hem porto 25 i 28 anys, i ric i m'esvaloto moltíssim.

- M'agradaria agrair de tot cor als meus pares l'estima i l'ajuda incondicional que sempre m'han demostrat al llarg de la meua vida, des de que era petita fins a la realització d'aquesta tesi. Als meus iaïos, que també són uns solets. Gràcies per preocupar-vos per mi i per fer que mai hem faltés de res.

- A la meua germana Mireia de la qui sempre he tingut bons consells quan més els necessitava, encara que sempre la molesto perseguint-la per fer-li un interrogatori sobre diferents temes i per saber que fa i que deixa de fer, però també crec que si no ho fes, hem trobaria molt a faltar. Gràcies guapeta. I al Jordi, el meu futur cunyat, amb qui també estic molt bé.

- Finalment, gràcies al Bernat, el meu maridet, amb el qui fa tants anys que compartim moltes il·lusions: instal·lar-nos a Barcelona (ciutat molt diferent del nostre petit poble), comprar pis, la boda, etc. Són massa coses per explicar-ho en quatre línies. Gràcies per la teua paciència, la teua ajuda i la teua comprensió, gràcies per no haver-te posat mai en contra de les meves il·lusions, sinó tot el contrari, ja que també les has fet teves. Moltes gràcies guapo.

Esta tesis ha sido subvencionada por el proyecto “5th Framework Research Programme of the Europe Union” (QLRT-1999-00888) y por la “Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica” (CIRIT) de la Generalitat de Catalunya.

ABREVIACIONES

AA	Ácido araquidónico
AAS	Ácido L-ascórbico
ADA	Ácido dehidro- L-ascórbico
AG	Ácido graso
AGs	Ácidos grasos
AGPIs	Ácidos grasos poliinsaturados
AGPI-CL	Ácido graso poliinsaturado de cadena larga
AGPI-CLs	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
AGE	Ácido graso esencial
ALA	Ácido α -linolénico
BSSL	Lipasa estimulada por sales biliares (Biliar Salt Stimulated Lipase)
CE	Electroforesis capilar
CMV	Citomegalovirus
DHA	Ácido docosahexaenoico
DPA	Ácido docosapentaenoico
DTT	Ditiotreitol
ELSD	Detector de difusión de la luz (Evaporative Light Scattering Detector)
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ESPGAN	Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition). Actualmente se denomina ESPGHAN, Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition)
FAO	Organización de Alimentación y Agricultura (Food and Agriculture Organization).
FID	Detector de ionización de llama
FPL	Mirada preferencial forzada (Forced-Choice Preferential Looking)
FVEP	Potencial visual evocado estimulado por un flash (Flash Visual evoked potencial)
GC	Cromatografía de gases
GC/MS	Cromatografía de gases/Espectrometría de masas
HIV	Virus de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA)
HMBNA	Asociación de bancos de leche humana de Norte América (Human milk banking association of North America)
HTLV	Virus linfoma T humano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HPLC/MS	Cromatografía líquida de alta eficacia /Espectrometría de masas
Ig	Inmunoglobulina
isoAAS	Ácido iso-L-ascórbico
isoADA	Ácido dehidroisoascórbico
ISSFAL	Sociedad internacional del estudio de ácidos grasos y lípidos (International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids)
LA	Ácido linoleico
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPL	Lipoprotein lipasa
NP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia en fase normal
OMS	Organización Mundial de la Salud

RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa
SFC	Cromatografía con fluidos supercríticos
UNICEF	Fundación Internacional de las Naciones Unidas para la Infancia
UV/VIS	Detector ultravioleta/visible
VEP	Potencial visual evocado (Visual Evoked Potential)
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

ÍNDICE

I. PARTE BIBLIOGRÁFICA

1. INTERÉS.....	3
2. OBJETIVOS.....	5
3. EVOLUCIÓN DE LA ALIMENTACIÓN INFANTIL.....	7
4. LACTANCIA NATURAL.....	11
4.1. Introducción.....	11
4.2. Ventajas de la leche materna.....	13
4.3. Dinámica y composición de la leche materna.....	16
4.4. Fracción lipídica.....	21
4.4.1. Ácidos grasos.....	22
4.4.2. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CLs).....	23
4.4.2.1. Origen de los AGPI-CLs en la leche materna.....	23
4.4.2.2. Importancia de los AGPI-CLs.....	23
A. AGPI-CLs y retina.....	25
➤ Métodos para determinar la agudeza visual en recién nacidos.....	26
B. AGPI-CLs y cerebro.....	30
➤ El DHA en la estructura y función de las membranas neuronales.....	30
➤ DHA y aprendizaje.....	31
▪ Pruebas realizadas en animales para evaluar el aprendizaje.....	32
▪ Pruebas realizadas en humanos para evaluar el desarrollo infantil.....	32
➤ El DHA y la regulación de la expresión de genes en el cerebro y otros órganos.....	34
C. AGPI-CLs y crecimiento.....	35

4.4.2.3. AGPI-CLs durante el embarazo.....	35
• Suplementación durante el embarazo con DHA.....	36
• Suplementación durante el embarazo con α -linolénico. Conversión del α -linolénico a EPA y DHA.....	37
4.4.2.4. AGPI-CLs durante la lactancia.....	40
4.5. Vitaminas de la leche materna.....	42
4.5.1. Vitamina E.....	42
4.5.1.1. Introducción.....	42
• Ingestas recomendadas de vitamina E.....	45
4.5.1.2. Funciones de la vitamina E.....	45
4.5.1.3. Deficiencia de vitamina E.....	48
4.5.1.4. Toxicidad de la vitamina E.....	49
4.5.1.5. Métodos de análisis de la vitamina E.....	50
4.5.2. Vitamina C.....	56
4.5.2.1. Introducción.....	56
• Ingestas recomendadas de vitamina C.....	58
• Estabilidad de la vitamina C.....	58
4.5.2.2. Funciones de la vitamina C.....	59
4.5.2.3. Deficiencia de vitamina C.....	61
4.5.2.4. Toxicidad de la vitamina C.....	61
4.5.2.5. Métodos de análisis de la vitamina C.....	62
4.6. Bancos de leche humana.....	66
4.6.1. Introducción.....	66
4.6.2. Posibles beneficiarios de los bancos de leche humana.....	67
4.6.3. Selección de las donantes.....	69
4.7. Métodos de conservación de la leche humana.....	71

4.7.1. Pasteurización.....	71
4.7.2. Otros métodos de conservación de la leche humana.....	75
4.7.2.1. Conservación de la leche materna en el ámbito doméstico y en los hospitales.....	75
4.7.2.2. Conservación de la leche humana en los bancos de leche.....	76
5. LACTANCIA ARTIFICIAL.....	83
6. 5.1. Introducción.....	83
5.2. Historia de los preparados para lactantes.....	84
5.3. Modelo de composición de los preparados para lactantes.....	86
5.4. Legislación referente a los lípidos en preparados para lactantes y de continuación.....	88
5.5. Fuentes de AGPI-CLs utilizados para la elaboración de preparados para lactantes.....	92
5.6. Estabilidad oxidativa de los preparados para lactantes.....	96
 II. PARTE EXPERIMENTAL	
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	99
7. PUBLICACIONES.....	101
7.1. Comparación de dos métodos para la extracción de la grasa de la leche humana.....	101
7.2. Desarrollo de un método rápido por cromatografía líquida de alta eficacia para la determinación de vitamina C en leche humana versus un método enzimático.....	107
7.3. Determinación de γ- y α-tocoferoles en la leche humana por un método directo de cromatografía líquida de alta eficacia con detección por UV/VIS y comparación con un detector de difusión de la luz.....	115
7.4. Efecto de la pasteurización sobre las vitaminas C y E y sobre los ácidos grasos en un “pool” de leche humana.....	123
7.5. Efecto de la conservación en frío sobre las vitaminas C y E y sobre los ácidos grasos en la leche humana madura.....	145

7.6. Desarrollo de un método por cromatografía de gases de espacio en cabeza para la determinación de los compuestos volátiles en preparados para lactantes.....	169
7.7. Estabilidad oxidativa de la fracción lipídica de fórmulas lácteas en polvo.....	177
7.8. Conversión del ácido α-linolénico a los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en ratas macho, hembras embarazadas y hembras no embarazadas.....	187
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	217
9. CONCLUSIONES.....	225
10. BIBLIOGRAFÍA.....	227

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS**TABLAS**

Tabla 1. Composición media de nutrientes en calostro, leche de transición y leche madura.....	17
Tabla 2. Síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados a partir de los ácidos linoleico y α -linolénico.....	24
Tabla 3. Estudios de la agudeza visual en recién nacidos a término alimentados con leche materna (LM) o preparado para lactantes (P).....	29
Tabla 4. Factores de conversión para calcular las unidades internacionales (UI) y las ingestas recomendadas de vitamina E.....	43
Tabla 5. Ingestas recomendadas de vitamina E.....	45
Tabla 6. Métodos de HPLC para la determinación de vitamina E en leche y productos lácteos.....	53
Tabla 7. Ingestas recomendadas de vitamina C.....	58
Tabla 8. Métodos de HPLC para la determinación de vitamina C en leche y productos lácteos.....	65
Tabla 9. Influencia de la pasteurización a 62.5°C durante 30 minutos sobre la función inmunoprotectiva de la leche.....	73
Tabla 10. Conservación de la leche humana en los bancos de leche de Norte América.....	78
Tabla 11. Especificaciones de la Unión Europea (1996) en energía y lípidos para los preparados para lactantes y de continuación.....	90

FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de la influencia del ALA en la formación de DHA a través de dos caminos: uno como precursor y otro como competidor (adaptado de Cleland y col. 2005).....	38
Figura 2. Estructura química del α -tocoferol.....	42
Figura 3. Estructura química del ácido ascórbico.....	56
Figura 4. Conversión del ácido L-ascórbico a ácido dehidro-L-ascórbico y posterior hidratación a ácido dicetogulónico.....	57

I. PARTE BIBLIOGRÁFICA

1. INTERÉS

El periodo neonatal es uno de los más vulnerables de la vida humana. Durante esta etapa de rápido crecimiento y desarrollo, el recién nacido presenta una elevada demanda de nutrientes esenciales, así como de un aporte adecuado de energía.

Cuando la alimentación de la madre es óptima y la cantidad de leche suficiente, la leche materna presenta el patrón de nutrientes más idóneo para el lactante, así como una dinámica en su composición que hace posible que pueda adaptarse a las necesidades del recién nacido.

Sin embargo, hay situaciones en las que no es posible alimentar al recién nacido directamente al pecho, ya sea desde un principio (niños prematuros de muy bajo peso o prematuros enfermos, niños post-quirúrgicos, etc....) o más allá de los cuatro primeros meses, época en la que compaginar la lactancia materna con la actividad laboral se convierte en un auténtico reto que las madres deben superar. De acuerdo con la reunión conjunta OMS/UNICEF, “el mejor alimento para el recién nacido que no puede ser alimentado directamente con el pecho de su madre, es la leche extraída de su propia madre (leche materna) o la extraída de otra madre sana (leche humana)”. En este último caso son necesarios los bancos de leche humana.

De este modo, es importante toda aportación destinada a estudiar los mejores métodos de conservación de la leche materna y/o humana usados en el ámbito familiar, hospitalario o en los bancos de leche. El problema surge cuando la mayoría de las recomendaciones que existen hasta el momento para la conservación en frío de la leche están basadas principalmente en sus propiedades microbiológicas e inmunológicas. Por el contrario, existen pocos estudios que analizan la estabilidad de sus nutrientes, como pueden ser las vitaminas y los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CLs).

Durante la conservación de la leche se pueden producir pérdidas de sus vitaminas C y E debido a su sensibilidad a la luz, oxígeno y temperatura, así como pérdidas de sus AGPI-CLs debido a que son fácilmente oxidables por su elevado número de dobles enlaces, como sería el caso del ácido araquidónico (C20:4n-6, AA) y del ácido docosahexaenoico (C22:6n-3, DHA).

Por ello, el estudio sobre la estabilidad de estas vitaminas y ácidos grasos durante la conservación de la leche en frío es de gran interés para poder recomendar una correcta conservación en el ámbito doméstico, en las unidades de neonatología o en los bancos de leche, ya que dichos componentes son importantes para el recién nacido: las vitaminas C y E juegan un importante papel tanto en el sistema inmune como de agente antioxidante; y el AA y el DHA son componentes estructurales de los órganos en desarrollo, especialmente del tejido neuronal rico en lípidos como el cerebro y la retina.

Del mismo modo, es importante estudiar el efecto que produce la pasteurización de la leche sobre el contenido de sus vitaminas C y E y ácidos grasos, ya que la leche de los bancos debe ser pasteurizada antes de que la reciban los recién nacidos para evitar la posible transmisión de enfermedades.

A pesar de las recomendaciones realizadas por la OMS/UNICEF, en los países desarrollados, cuando por algún motivo el recién nacido no puede ser alimentado al pecho, se suele optar sistemáticamente por la lactancia artificial mediante preparados para lactantes.

Se ha observado que los recién nacidos, especialmente los prematuros, alimentados con preparados para lactantes suplementados con AGPI-CLs presentan una mejor agudeza visual y un mejor aprendizaje en edades posteriores que aquellos alimentados con preparados no suplementados. Esto provoca un gran interés en la industria láctea en saber como las diferentes cantidades de AGPI-CLs y las diferentes temperaturas de almacenamiento pueden afectar a la vida útil de dichos preparados suplementados, más fácilmente oxidables que los no suplementados. De ahí surge la necesidad de realizar más estudios de estabilidad de estos preparados.

Por otro lado, debido a que la conversión de los AGPI-CLs a partir de sus precursores difiere entre hombres y mujeres y debido a la importancia de los AGPI-CLs en el feto y recién nacido, es de gran interés estudiar si dicha conversión es diferente entre las mujeres embarazadas que en aquellas no embarazadas, debido a que las embarazadas tienen una mayor necesidad de dichos ácidos grasos para el feto. Este estudio es necesario cuando se requiera suplementar la dieta de las mujeres embarazadas, para analizar si sería mejor la suplementación con los precursores de los AGPI-CLs o la suplementación directamente con ellos.

Finalmente, el interés de estos estudios, tanto en la leche materna como en los preparados para lactantes es conseguir una adecuada alimentación de los lactantes.

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales de esta tesis son:

1. Adaptar las recomendaciones existentes sobre la conservación en frío de la leche humana utilizadas tanto en el ámbito familiar, en las unidades neonatales de los hospitales así como en los bancos de leche en función de la estabilidad de las vitaminas C y E, y de los ácidos grasos de la leche. Igualmente, es importante conocer la estabilidad de dichos componentes durante la pasteurización de la leche en los bancos.

Para cumplir con este objetivo se plantearon las siguientes tareas:

- Poner a punto un método que permita la extracción de la fracción grasa de la leche humana de forma rápida y sencilla.
- Poner a punto y validar un método cromatográfico rápido y directo que permita identificar y cuantificar el ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico (siendo la suma de estos dos ácidos la vitamina C) en la leche humana.
- Poner a punto y validar un método cromatográfico rápido y directo que permita identificar y cuantificar el α - y γ -tocoferol en la leche humana.
- Estudiar la estabilidad de las vitaminas C y E y de los ácidos grasos de la leche humana conservada a diferentes temperaturas: nevera (4°C), congelador (-20°C) y ultracongelador (-80°C) a lo largo de un periodo de tiempo controlado.
- Estudiar la estabilidad de las vitaminas C y E y de los ácidos grasos de la leche humana después de su pasteurización con un método lento (62.5°C, 30 min.) y un método rápido (100°C, 5 min.).

2. Conocer como repercute en la vida útil de diversas fórmulas lácteas la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en función de su cantidad de ácidos grasos y en función de su temperatura de almacenamiento.

Para cumplir con este objetivo se plantearon las siguientes tareas:

- Poner a punto y validar un método cromatográfico que permita de forma rápida y sencilla identificar y cuantificar los compuestos volátiles mayoritarios de los preparados para lactantes.
- Estudiar la estabilidad de los ácidos grasos y la presencia de compuestos primarios y secundarios de oxidación en las fórmulas lácteas, así como realizar un ensayo organoléptico de estas fórmulas para detectar posibles diferencias entre las oxidadas y las no oxidadas.

3. Conocer si existen diferencias en la conversión del ácido α -linolénico a sus ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 derivados entre hombres y mujeres y entre embarazadas y no embarazadas.

Para cumplir con este objetivo se planteó la siguiente tarea.

- Realizar un ensayo *in vivo* sobre ratas Wistar concretamente sobre hembras vírgenes, hembras embarazadas y machos alimentados con una misma dieta exenta de DHA.

3. EVOLUCIÓN DE LA ALIMENTACIÓN INFANTIL

La duración de la lactancia materna así como la edad de introducción de la alimentación complementaria en los lactantes españoles, al igual que en gran parte de los países desarrollados o en vías de desarrollo, se han visto modificadas a lo largo de los últimos 50 años. En la década de los años 50 el 82% de los lactantes españoles iniciaban la lactancia materna en el momento de su nacimiento, pero este porcentaje fue disminuyendo paulatinamente con el paso del tiempo (Ballabriga y Carrascosa, 1998). Unido a la disminución de la prevalencia de la lactancia materna, en la década de los 70 se produjo una introducción precoz de los diferentes alimentos que integran la alimentación complementaria. Sin embargo, los estudios realizados durante la década de los años 90 parecen indicar que se está produciendo el fenómeno contrario con un incremento de la duración de la lactancia materna y un cierto aplazamiento en el inicio de la toma de nuevos alimentos en la dieta de los lactantes y niños de corta edad. Una situación similar a la española se ha producido en el resto de países desarrollados, como es el caso de Estados Unidos (Fomon, 2001). En el año 1975, únicamente un 33.4% de las madres iniciaban la lactancia materna en el momento del parto, porcentaje que fue incrementándose progresivamente hasta alcanzar un 59.7% en el año 1984, llegando a un 62.4% en el año 1997, con un 26% de madres que la prolongaban durante más de 6 meses (Wright y Schanler, 2001)

Alimentación con la leche de donantes

El origen de las donantes tuvo lugar hace muchos años, cuando los niños no podían ser alimentados con la leche de sus propias madres (leche materna), y eran alimentados con la de otras mujeres (leche humana), ya fuesen familiares o no. Evidencias sobre la práctica de "alimentación al pecho" están presentes en el "Código de Hammurabi" desde 2250 a. d. C. donde se describen las cualidades necesarias para ser una buena donante. En aquellos años, se pensaba que los niños heredarían sus rasgos físicos, mentales y emocionales a través de la ingesta de su leche, por lo que era importante realizar una buena selección de las donantes. En el siglo XIII, las mujeres europeas ganaban más dinero vendiendo su leche que con cualquier otro trabajo disponible para ellas. La figura de la nodriza fue utilizada durante muchos siglos y se consideró en algunas épocas incluso como la mejor manera de alimentar a los recién nacidos (Barness, 1987; Cutbherston, 1999).

Alimentación artificial

Los primeros intentos de alimentación artificial se enfocaron hacia la utilización de la leche de otros mamíferos (vacas, cabras, ovejas, etc.) fruto de la disponibilidad de animales domésticos. Antes de mediados del siglo XIX, la mayoría de estos productos produjeron la muerte de prácticamente el 100% de los niños. Sólo cuando se introducían después del primer mes de vida estos intentos tenían mayor éxito disminuyendo la tasa de mortalidad al 50% de los niños (Barness, 1987; Cutbherston, 1999).

A mitad del siglo XIX, con los primeros estudios de la leche humana, se desarrolló el primer preparado, utilizando leche de vaca debido a su mayor disponibilidad, a pesar de ser muy diferente de la leche humana (Aggett, 2001). A finales del siglo XIX, comenzó a disminuir el riesgo de transmitir enfermedades producidas por

microorganismos a través de los preparados, gracias a la cloración del agua y a la pasteurización de la leche.

A principios del siglo XX, los avances tecnológicos permitieron conocer mejor la composición de la leche humana pudiendo elaborar preparados para lactantes que se asemejasen más. Se produjo una disminución de la mortalidad de niños alimentados con sustitutos adecuados a sus necesidades, hecho que actuó como detonante del proceso de popularización de los preparados para lactantes, en detrimento de la lactancia al seno, cuyas ventajas se empezaron incluso a cuestionar. En los años 50 se hicieron muy populares los preparados para lactantes en polvo que eran más fáciles de usar (Cutbherston, 1999).

Así en 1950, la mayoría de hospitales y profesionales de la salud en los países desarrollados promocionaban la alimentación artificial como el método de alimentación prioritario. Esto se aceleró en los años 60 debido a la introducción de la mujer al trabajo, a una falta de educación sanitaria, y a unas prácticas inadecuadas seguidas en muchas maternidades, especialmente la separación del recién nacido de su madre, la administración de suplementos de biberones y finalmente una postura de indiferencia o claro patrocinio de la lactancia artificial por parte de los pediatras y obstetras (Nogales, 1989; Doménech y Díaz-Gómez, 2001). Actualmente, esta situación ha cambiado gracias al mayor conocimiento entre los profesionales de la salud en relación a los beneficios que ofrece la lactancia materna a corto y a largo plazo, fomentando así la lactancia materna.

Bancos de leche humana

A principios del siglo XX hubo un reconocimiento por parte de la clase médica del aumento de la morbilidad y mortalidad infantil relacionada con el consumo de preparados para lactantes. En respuesta a este problema se crearon los primeros bancos de leche, sobretodo para la alimentación de los recién nacidos a pre-término y de los enfermos. En 1909, se estableció en Viena, Austria el primer banco de leche. En Norte América el primero de los bancos de leche fue establecido en Boston, Massachussets (EEUU) en 1910 (Golden y col. 2001).

Tras la segunda guerra mundial decrece de forma general el interés por los bancos de leche humana, a la vez que disminuye de forma alarmante, especialmente en Norte América, el número de niños alimentados al seno y aumenta el consumo de preparados para lactantes. No será hasta finales de los años 70 cuando resurge de nuevo el interés por la leche humana y los bancos de leche como resultado de los avances tecnológicos en el campo de la neonatología, que muestran estudios con tasas de supervivencia para niños enfermos y/o prematuros alimentados al pecho superior a los alimentados con preparados para lactantes (HMBANA, 2000).

Sin embargo, durante los años 80 la aparición del virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV) afectó dramáticamente a los bancos de leche. Debido a una preocupación por lo desconocido y a la necesidad de incrementar la investigación tanto de las donantes como del tratamiento de la leche, se cerraron muchos bancos (Jones, 2003). Para defenderse, aparecen las primeras asociaciones representativas de los distintos bancos, como la fundada en Brasil por la acción conjunta del “Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno” (PNIAM) y el Instituto Fernández

Figuera y la Fundación Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) en 1984 y la “Human Milk Banking Association of North America” (Asociación de Bancos de Leche Humana de Norte América, HMBANA) en 1985.

La HMBANA fue establecida como estándar para todos los bancos de Norte América y publicó una serie de protocolos por primera vez en 1990 que formaron las bases para los bancos de leche de todo el mundo. Estas publicaciones son guías donde se establecen una serie de protocolos para el funcionamiento de un banco, que van desde la organización (definiendo exactamente la función del director médico y del coordinador, así como los especialistas que deben formar parte del banco), pasando por la metodología para seleccionar las donantes, las instrucciones para la extracción, el tratamiento y la conservación de las muestras hasta el transporte, tratamiento y conservación de las muestras una vez ya en el mismo banco. Estas guías son revisadas y adaptadas anualmente por la HMBANA.

Actualmente, con la seguridad de poder evitar las transmisiones a través de la leche de las donantes y con un mejor conocimiento de los beneficios de la leche humana, el número de bancos de leche humana se ha incrementado globalmente.

4. LACTANCIA NATURAL

4.1. Introducción

Existe una clara evidencia de que la alimentación del recién nacido a través de la lactancia materna presenta numerosas ventajas y beneficios, tanto para el recién nacido como para las madre. Estas ventajas no son únicamente las de mejorar el estado nutricional e inmunológico y el desarrollo físico y psicológico de los niños, sino que también presenta múltiples ventajas frente a otras formas de alimentación desde el punto de vista social, económico e incluso epidemiológico al demostrarse que puede reducir el riesgo de adquirir diversas enfermedades (Levitt, 2001).

Los distintos comités de nutrición de las sociedades encargadas de dar las directrices sobre el método de alimentar a los recién nacidos y niños son la Asociación Española de Pediatría (AEP), la Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (ESPGAN), y la American Academy of Pediatrics (AAP). Estos recomiendan la lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses, y tras la introducción de la alimentación complementaria seguir con el pecho tanto tiempo como lo desee la madre, afirmándose en el concepto de que la leche materna es el mejor alimento para el recién nacido y lactante.

En 1990, tras la reunión conjunta OMS/UNICEF celebrada en Florencia, se aprobó la “Innocenti Declaration”, que propone la lactancia materna exclusiva hasta los 4 o 6 primeros meses de vida como meta mundial. Y a partir de los 6 meses y hasta como mínimo los dos años, se recomienda la lactancia materna junto con otros alimentos apropiados según la edad del niño (Doménech y Díaz-Gómez, 2001; Levitt, 2001). En los casos, que por diversas circunstancias, el niño no puede alimentarse de la leche de su madre, y sobretodo en el caso de los recién nacidos a pre-término, la mejor opción es la leche humana de otras madres sanas (UNICEF, p.48). Los bancos de leche humana deberían ser apropiados en estas situaciones (Wight, 2001).

En los últimos años se han puesto en marcha diversas actividades a nivel mundial para fomentar la lactancia materna. Entre las últimas iniciativas está la conocida como “Los Hospitales Amigos de los Niños”, fruto de la acción conjunta OMS/UNICEF en el año 1990, en la cual se pretende fomentar la lactancia al seno desde los mismos hospitales.

Para poder obtener la mencionada calificación, los centros hospitalarios deben comprometerse a cumplir de forma estricta todos y cada uno de los puntos siguientes (Doménech y Díaz-Gómez, 2001):

- Disponer de una política por escrito relativa a la lactancia natural que sistemáticamente se ponga en conocimiento de todo el personal de atención de salud.
- Capacitar a todo el personal de salud para poner en práctica esa política.
- Informar a todas las embarazadas de los beneficios y práctica de la lactancia natural.
- Ayudar a las madres a iniciar la lactancia durante la media hora siguiente al parto.

- Mostrar a las madres cómo se debe amamantar al niño y cómo mantener la lactancia, incluso si han de separarse de sus hijos.
- No dar a los recién nacidos más que la leche materna.
- Facilitar la cohabitación de las madres y los niños durante las 24 horas del día.
- Fomentar la lactancia natural a demanda.
- No dar a los niños alimentados a pecho chupetes o biberones.
- Fomentar el establecimiento de grupos de apoyo a la lactancia natural y procurar que las madres se pongan en contacto con ellas a su salida del hospital.

En numerosos centros sanitarios, la implantación y seguimiento parcial o total de dichas recomendaciones se ha visto traducido en un incremento de la prevalencia y duración de la lactancia materna.

Según estudios recientes llevados a cabo para conocer el alcance de la “Iniciativa Hospital Amigo de los Niños” en Europa (EU Project Contract N. SCP 2002359, 2003), se ha visto que 8 de los 498 hospitales de España eran “Amigo de los Niños”. En el caso por ejemplo del Reino Unido, lo fueron 44 entre un total de 305 hospitales.

4.2. Ventajas de la leche materna

◆ Ventajas de la lactancia natural sobre el recién nacido

- Menor dificultad de absorción de nutrientes (Bernt y Walker, 1999) y un mejor aprovechamiento de los mismos (Nelson y Innis, 1999) debido a la adaptación de la leche a sus características digestivas y metabólicas. Así como una menor predisposición a desencadenar alteraciones metabólicas cuando se compara con otros tipos de leche (Jiménez, 2001).
- Mejor composición del tejido nervioso (cerebro y retina) del recién nacido alimentado con la leche materna que con la lactancia artificial, aunque el aumento de peso sea más rápido en los recién nacidos alimentados con los preparados para lactantes (Hediger y col. 2000). Estas diferencias de peso desaparecen alrededor del primer año de vida (Jiménez, 2001).
- Mayor protección inmunológica, sobretodo para las infecciones intestinales. Con la lactancia materna hay muy pocas crisis diarreicas (Dewey y col. 1995; Popkins y col. 1990) siendo los casos de enterocolitis necrotizante muy escasos (Lucas y Cole, 1990; Covert y col. 1995; McGuire y Anthony, 2003).
- Menor frecuencia de infecciones respiratorias debido a que la inmunidad está aumentada (Frank 1982; Jiménez, 2001; Heinig, 2001; Wright y col. 1989, 1995; Wight, 2005; Wilson-Clay, 2006). En general la inmunidad aumenta de forma proporcional a la intensidad y duración de la lactancia (Levitt, 2001). La leche materna contiene factores de defensa como son la IgA, la lisozima y la lactoferrina que protegen las superficies mucosas en los niños (Sollid, 2002).
- Menor incidencia de otitis media (Saarinen, 1982; Duncan y Holberg, 1993; Paradise y col. 1994).
- Menor incidencia de bacteriemia (Cochi y col. 1986; Takala y col. 1989) y de meningitis bactericida (Cochi y col. 1986; Istre y col. 1985).
- Posible reducción en el riesgo de enfermedades autoinmunes, como la Diabetes Mellitus tipo 1 (Mayer y col. 1988; Virtanene y col. 1991; Gerstein, 1994).
- Efecto protector frente la enfermedad de Crohn (Koletzko y col. 1989b; Rigas y col. 1993).
- Efecto protector contra enfermedades alérgicas (Lucas y col. 1990; Halken y col. 1992; Saarinen y Kajosaari, 1995) y menor riesgo de sensibilización alérgica por el carácter homólogo de las proteínas de la leche humana (Jiménez, 2001).
- Efecto protector contra la obesidad en niños con una lactancia materna prolongada debido a la baja cantidad de proteínas presentes en la leche a los dos años de lactancia (Rolland-Cachera y col. 1995; Grummer-Strawn y Mei, 2004; Shehadeh, 2006).

- Mejor evolución psicológica debido a la interacción que se establece entre la madre y el recién nacido (Jiménez, 2001).
- Mejor higiene: paso de la leche desde su lugar de producción directamente al interior del aparato digestivo del lactante (Martín, 2005).
- Menor morbilidad y mortalidad infantil, siendo este hecho más acusado, cuanto menor es el nivel higiénico social (Jiménez, Heining, 2001), aunque también se ha comprobado este hecho en los países desarrollados en condiciones higiénico sanitarias correctas (Heinig y Dewey, 1996).
- Prevención de enfermedades a largo plazo: en diferentes estudios se ha manifestado que las influencias nutricionales durante la vida intrauterina y postnatal precoz podrían tener consecuencias a largo plazo sobre la presión arterial, la diabetes y la cardiopatía isquemia (Doménech y Díaz-Gómez, 2001)

♦ **Ventajas de la lactancia natural para la madre**

- La lactancia materna promueve la involución uterina reduciendo las hemorragias post-parto (Levitt 2001, Jiménez 2001; Chua y col. 1994).
- Reduce el flujo de sangrado en los primeros meses post-parto ya que retrasa la aparición de la menstruación.
- Puede ser útil como método anticonceptivo, ya que evita o retrasa la ovulación (Kennedy y Visness, 1992; Gray y col. 1990; Labbock y Colie, 1992).
- Mejora una buena remineralización post-parto (Melton y col. 1993) y reduce el riesgo de sufrir rotura de cadera por osteoporosis post-menopáusica (Cumming y col. 1993).
- Se ha observado una menor incidencia de cáncer de mama y ovario en madres que han amamantado a sus hijos (Levitt, 2001; Jiménez, 2001; Rosenblatt y Thomas, 1993).
- También existen estudios que demuestran que las madres lactantes recuperan antes el peso que tenían comparado con aquellas madres que no practican la lactancia (Dewey y col. 1993).
- Facilidad para la madre en la preparación de la alimentación para su niño, ya que el pecho siempre esta preparado, a cualquier hora, a una adecuada temperatura, sin errores de preparación, sin contaminación bacteriana y sin instrumentos que limpiar ni esterilizar (Jiménez, 2001).
- Ventaja psicológica derivada de la satisfacción que supone la acción de alimentar a su hijo (Jiménez, 2001).

◆ **Ventajas de la lactancia natural para la sociedad**

Desde el punto de vista socio-económico son evidentes las ventajas derivadas de la lactancia materna en países subdesarrollados, siendo imposible imaginar el gasto que supondría para estos la alimentación de todos los recién nacidos con preparados adaptados. En un país como la India, donde lactan 20 millones de niños, se ha calculado que la lactancia artificial costaría al país más de tres veces el presupuesto total de sanidad (Levitt, 2001; Jiménez, 2001).

En el caso de los países desarrollados se sumaría el coste económico que supone la alimentación artificial de los lactantes y el coste derivado del absentismo laboral como consecuencia de un mayor número de enfermedades en los recién nacidos que podrían evitarse con la lactancia materna: durante el primer año de vida, los niños amamantados con leche materna se ponen enfermos un 50% menos que los que reciben leche artificial. (Notas Técnicas de Prevención n.664).

En un estudio realizado por Arnold (2002) se estudiaron tres modelos de análisis de costes que muestran ahorros para el sistema de salud si se utiliza la leche procedente de bancos de leche humana al iniciar la alimentación, en el caso de que la leche de la misma madre no sea disponible. El coste de alimentar niños prematuros con la leche humana procedente de los bancos es factible cuando se compara con los ahorros en la prevención de la enterocolitis necrotizante.

Desde el punto de vista socio-sanitario, no existe ninguna duda de la importancia de la leche materna como método para aumentar la supervivencia de niños de países subdesarrollados con grandes problemas higiénico-sanitarios (Cutbehrson, 1999).

4.2. Dinámica y composición de la leche materna

La leche materna es un **fluido altamente dinámico**, su composición está influida tanto por factores intrínsecos a la propia glándula mamaria como por factores externos. Es precisamente esta característica particular la que la adapta perfectamente a las necesidades del lactante en cada momento (Nogales, 1898; Neville, 1995a). La composición varía a lo largo del tiempo, de manera que la leche secretada en las primeras horas después del parto y la producida al cabo de un mes difieren enormemente en su composición general, esto permite clasificar la leche en tres tipos (Barry Lawrance, 1994):

- **el calostro**, que es la leche inicial y se secreta desde las primeras horas hasta el quinto día post-parto, caracterizada por tener una mayor concentración de proteínas, inmunoglobulinas y lactoferrina, y menor cantidad de grasa que las otras leches (Jensen 1999, Koletzko, 2001).
- **la leche de transición**, que se secreta a partir del sexto día hasta el decimocuarto día, en la que se descienden los niveles de inmunoglobulinas y lactosa, y se incrementa la concentración de grasa.
- **la leche madura** que se secreta desde el final de la leche de transición hasta que finaliza la lactancia, caracterizada por ser la más rica en grasa.

En la **tabla 1** se presenta la composición media de los nutrientes en el calostro, en la leche de transición y en la leche madura. A parte de esta variabilidad de la leche a lo largo del tiempo, también se ha encontrado variabilidad entre las diferentes mujeres, atribuido a diversidad de factores como la dieta materna, la raza, el tiempo de gestación o el estado nutricional de la madre. Koenig y col. (2005), realizaron un estudio sobre el contenido proteico de muestras de calostro en tres grupos de madres (menos de 32 semanas de gestación, entre 32 y 36 semanas de gestación, y más o igual a 37 semanas de gestación), la concentración de proteínas totales fue más elevada en el calostro de las madres con recién nacidos a pre-término, especialmente para la IgA y la IgG, mostrando la adaptabilidad de la composición de la leche a las necesidades del recién nacido (Montagne y col. 1999).

La leche humana contiene una gran cantidad de componentes cuya composición básica la constituyen agua, carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas, minerales y un considerable número de componentes celulares (Jensen, 1999). Como tal fluido y teniendo en cuenta que cada 100 ml de leche materna contienen unos 87 ml de agua, y que en condiciones normales de temperatura y de salud del recién nacido, una ingesta de líquidos de 150 ml/Kg/día es suficiente durante los primeros meses, los requerimientos hídricos del lactante quedan totalmente cubiertos (Doménech y Díaz-Gómez, 2001).

Tabla 1. Composición media de nutrientes en calostro, leche de transición y leche madura (adaptado de Emmett y Rogers, 1997).

NUTRIENTES/100 ml	CALOSTRO	TRANSICIÓN	MADURA
AGUA	88.2 g	87.4 g	87.1 g
ENERGIA	56 Kcal	67 Kcal	69 Kcal
PROTEÍNAS	2 g	1.5 g	1.3 g
LÍPIDOS	2.6 g	3.7 g	4.1 g
HIDRATOS DE CARBONO	6.6 g	6.9 g	7.2 g
NITRÓGENO TOTAL	0.31 g	0.23 g	0.20 g
AG SATURADOS	1.1 g	1.5 g	1.8 g
AG MONOINSATURADOS	1.1 g	1.5 g	1.6 g
AG POLIINSATURADOS	0.3 g	0.5 g	0.5 g
COLESTEROL	31 mg	24 mg	16 mg
RETINOL	155 µg	85 µg	58 µg
CAROTENO	135 µg	37 µg	24 µg
VITAMINA E	1.30 mg	0.48 mg	0.34 mg
TIAMINA	0.01 mg	0.01 mg	0.02 mg
RIBOFLAVINA	0.03 mg	0.03 mg	0.03 mg
NIACINA	0.1 mg	0.1 mg	0.2 mg
FOLATO	2 µg	3 µg	5 µg
PANTOTENATO	0.12 mg	0.20 mg	0.25 mg
BIOTINA	0.2 µg	0.2 µg	0.7 µg
VITAMINA C	7 mg	6 mg	4 mg

• Proteínas

Las proteínas constituyen el 7% de la energía de la leche y son los principales elementos plásticos necesarios para el crecimiento y desarrollo de los humanos. La cantidad y calidad de la ingesta de proteínas influye en el metabolismo y ritmo de crecimiento de los recién nacidos (Jiménez, 2001; Doménech y Díaz-Gómez, 2001). El contenido proteico de la leche humana tiene un elevado valor biológico, es adecuado para mantener el crecimiento del recién nacido durante los primeros meses de vida (Fomon, 1993). A los dos años de lactancia, se produce una disminución del contenido de proteínas de la leche (Shehadeh, 2006), lo que supone un efecto protector frente a la obesidad, ya que una ingesta elevada de proteínas en esta edad se relaciona con una posterior obesidad (Rolland-Cachera y col. 1995; Grummer-Strawn y Mei, 2004).

Una de las proteínas de la leche es en forma de **caseína** (20-30% de las proteínas totales), que a la vez está constituida por varias fosfoproteínas (α , β , σ , κ). En la especie humana la β -fosfoproteína (caseína β) y la κ -fosfoproteína (caseína κ) (Lönerdal, 1985) son las mayoritarias y sus principales funciones son el aporte de aminoácidos, calcio y fósforo al recién nacido a través de la formación de micelas de alto contenido en los citados minerales.

El 70-80% restante está constituido por las llamadas **proteínas séricas** que son muy diferentes a las de la leche de vaca. Entre ellas la más abundante es la α -lactoalbúmina, seguida de lactoferrina, inmunoglobulina A secretoria (IgAs), lisozima y lipasa estimulada por sales biliares (BSSL). También encontramos aunque en menor cantidad, ceruloplasmina, seroalbúmina otras inmunoglobulinas, proteínas fijadoras de vitamina B12 y ácido fólico, glicoproteínas, factor de crecimiento epidérmico y otras enzimas (Nogales, 1989; Jiménez, 2001; Northrop-Cleves, 2001).

La relación proteínas séricas / caseína, en el calostro es de 90:10 y en la leche madura es de 60:40, o incluso de 50:50.

La **lactoferrina** es una glucoproteína que capta el hierro a nivel intestinal, limitando el crecimiento de los microorganismos que lo requieren para su proliferación. De este modo, tiene acción bacteriostática concretamente demostrada frente a *E.coli* y *Staphilococcus*, acción que sin embargo disminuye cuando aumenta su saturación en hierro (Lönerdal 1985, Barry Lawrence, 1994). Se ha observado que la absorción de hierro en niños alimentados con leche es superior a la que se da en niños alimentados con preparados para lactantes, lo que podría sugerir que la lactoferrina tenga además una función como promotora de la absorción de dicho oligoelemento. Los niveles de lactoferrina en la leche humana se mantienen durante los doce meses siguientes al parto, aunque sus niveles sean más elevados en el calostro (Jiménez, 2001).

Como **inmunoglobulinas** destaca la presencia de IgA secretora (IgAs) en todos los estadios de la lactancia, pero principalmente en el calostro, llegando a niveles máximos el segundo día posparto. Igualmente, la leche humana contiene IgG e IgM. La IgA de la leche humana es una IgAs con propiedades antigénicas especiales, como una mayor estabilidad y resistencia frente a las variaciones de pH y a la acción de las enzimas (Hanson y col. 1978; Ñíguez y García, 1987; Jiménez, 2001). La IgA constituye un apoyo defensivo contra las infecciones en general y del tracto digestivo en particular (Ñíguez y García 1987; Northrop-Cleves, 2001).

En la leche humana existen dos lipasas: la **lipoprotein lipasa (LPL)** y la **lipasa estimulada por sales biliares (BSSL)**. La LPL, estimulada por el suero e inhibida por las sales biliares, es vertida a la leche durante el amamantamiento por extravasación de las células directamente al torrente lácteo. Se encuentra en la fracción grasa de la leche, y su papel en la digestión de los triglicéridos no está muy claro debido a la existencia de una gran variabilidad en los niveles de LPL en diferentes muestras. Además sus niveles en la leche humana siempre son muy inferiores a los encontrados en muestras tomadas de otros mamíferos como la rata, el cerdo y la vaca. En dichas especies, al contrario de la leche humana, la LPL parece tener una verdadera función fisiológica (Shahani y col. 1980). No se ha encontrado ninguna función útil de la LPL ni en la leche, ni para el lactante debido a que pierde su actividad al llegar al pH ácido del estómago (Hernell y Bläckberg, 1994b).

La BSSL se encuentra en la fracción acuosa de la leche humana y, a diferencia de la LPL, tiene un importante papel fisiológico en la digestión de los triglicéridos de la leche humana, con suficiente actividad a pH bajos y a determinadas concentraciones de sales biliares como para aumentar los niveles de reabsorción de los lípidos en el recién nacido (Shahani y col. 1980). La BSSL presenta una baja especificidad por el sustrato, hidroliza sustancias solubles en agua, micelas o en emulsión (Wang, 1981; Hernell y

Bläckberg, 1994). Esto le permite hidrolizar enlaces éster tanto en sustancias insolubles en agua (triglicéridos, ésteres de retinol, ésteres de colesterol) como en sustancias solubles en agua (monoglicéridos de cadena corta y media).

La actividad de la BSSL se mantiene constante en la leche secretada a lo largo del día (Freed y col. 1986). Su actividad varía conforme progresa la lactancia, en el calostro es menos activa que en la leche madura. La actividad de la BSSL varía entre mujeres, aunque se mantiene constante en cada mujer. Su actividad no varía entre la leche de mujeres que han dado a luz a un recién nacido a término o un prematuro (Freed y col. 1989). Un factor que sí modifica la actividad de la BSSL es el estado nutricional de la madre, siendo menor la actividad lipásica en madres mal nutridas. De este modo, se observó que la actividad decreció en un 80% durante los 4 primeros meses en comparación a la actividad constante en madres bien nutridas (Dupuy y col. 1991).

La **lisozima** es un enzima resistente a los enzimas digestivos del niño con acción bactericida. Su presencia se mantiene durante toda la lactancia, siendo sus niveles mayores en el calostro.

Otro componente proteico importante son los **nucleótidos**, con valores muy amplios en la leche materna (hasta 70 mg/L). Entre las funciones beneficiosas relacionadas con ellos, se encuentran los efectos que producen sobre la flora intestinal provocando el efecto bifidogénico, permitiendo una mayor biodisponibilidad del hierro, produciendo cambios favorables sobre las lipoproteínas plasmáticas, mejorando la inmunidad y favoreciendo la maduración intestinal (Jiménez, 2001).

- **Hidratos de carbono**

Los hidratos de carbono constituyen aproximadamente el 50% del aporte calórico de la leche humana (Barry Lawrence, 1994). Los hidratos de carbono se encuentran en un 90% en forma de **lactosa** (constituida por galactosa y por glucosa), que estimula el desarrollo de la flora lactobacilar en el intestino, necesario para impedir que dicha flora sea substituida por bacterias con efectos potencialmente negativos como *E. coli*. Se ha observado que esta substitución es más frecuente en niños no alimentados con leche humana (Northrop-Cleves, 2001). Además, la lactosa disminuye la incidencia de estreñimiento debido a que favorece la reabsorción de calcio (Barry-Lawrence, 1994; Northrop-Cleves, 2001).

El 10% restante de hidratos de carbono se identifican como **oligosacáridos**, cuya concentración es superior en el calostro que en la leche madura y entre los que se encuentra el factor de crecimiento de *Lactobacillus bifidus*, la glucosamina y la galactosamina. Los oligosacáridos pueden actuar directamente como compuestos antimicrobianos ya que tienen la capacidad de inhibir la adhesión de las bacterias a las células epiteliales. Igualmente, son precursores del ácido siálico que forma parte fundamental de gangliósidos (glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico) y glucoproteínas cerebrales (Jiménez, 2001; Northrop-Cleves, 2001).

- **Minerales**

El contenido en minerales es en general bajo, sobretodo para los prematuros. En general, la leche humana contiene entre tres y cuatro veces menos minerales que la leche de vaca. Por ejemplo, presenta un bajo contenido en hierro (0.5 mg/L), pero su absorción (aproximadamente del 70%) es muy superior a la que ocurre con otros nutrientes debido a la presencia de lactoferrina, con lo cual asegura un ingreso suficiente hasta los seis meses. Aunque el contenido de calcio es bajo, la proporción Ca/P favorece su absorción. Igualmente, presenta unos niveles de sodio bajos que le confieren una baja osmolaridad, impidiendo de este modo una sobrecarga renal de solutos en un periodo de la vida en que las funciones renales se encuentran inmaduras (Nogales, 1989; Barry-Lawrance, 1994; Jiménez, 2001).

- **Vitaminas**

La composición vitamínica de la leche humana, cuando la madre tiene una nutrición y salud óptima, marca las necesidades que el lactante tiene de ellas para un crecimiento y desarrollo normal, por lo que constituirá la referencia para la lactancia artificial. En general, todas las vitaminas se encuentran en la leche de mujer, pero su concentración es variable, ya que depende de la alimentación materna.

Dentro de las **vitaminas hidrosolubles** encontramos la tiamina (vitamina B₁), la piridoxina (vitamina B₆), la niacina, el ácido fólico, el ácido pantoténico y la biotina que incrementan sus niveles a medida que progresa la lactancia. Por el contrario, las concentraciones de cianocobalamina (vitamina B₁₂) y de ácido ascórbico (vitamina C) son menores en la leche madura que en el calostro.

La dieta materna afecta los niveles de ciertas vitaminas hidrosolubles de la leche materna como las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂. En madres vegetarianas estrictas, las concentraciones de dichas vitaminas son significativamente inferiores a aquellas halladas en la leche de madres con dietas omnívoras. Lo mismo sucede con la vitamina C en dietas con un aporte reducido de vegetales, como sucede en la cultura China, donde las mujeres no comen ni frutas ni vegetales durante los 30-40 primeros días postparto ya que consideran estos alimentos posibles causantes de diarreas (Emmett y Rogers, 1997).

En relación a las **vitaminas liposolubles** de la leche humana, su contenido está relacionado con el estado nutricional de la madre (Barry Lawrence, 1994; Jiménez, 2001). En madres vegetarianas estrictas encontramos carencias de vitamina D (Emmett y Rogers, 1997, Jiménez, 2001).

Los niveles de vitamina K son bajos en la leche materna, especialmente en el calostro. No obstante son raros los signos clínicos por déficit de esta vitamina en recién nacidos a término (Emmett y Rogers, 1997).

Los niveles de tocoferoles son mayores en la leche humana que en la leche de vaca, y dentro de la leche humana, son más elevados en el calostro, sugiriendo que podrían estabilizar los abundantes AGPI-CLs presentes en el calostro, ya que los tocoferoles son compuestos antioxidantes (ESPGAN, 1991).

4.4. Fracción lipídica

La fracción mayoritaria de la grasa la componen los triglicéridos en un 98-99%, contribuyendo en un 40-55% de la ingesta total de energía para los lactantes. El resto la componen fosfolípidos aproximadamente en un 0.8%, esteroides en un 0.5%, y en muy baja proporción se encuentran esfingolípidos, gangliósidos, glicosilceramidas, diglicéridos y ácidos grasos libres, colesterol y vitaminas liposolubles (Barry Lawrence, 1994; Jensen, 1999; Jiménez, 2001).

El contenido en grasa de la leche humana oscila entre el 3% y el 5%, siendo su concentración influida por diversos factores. Su concentración es variable a lo largo de un mismo día o en función del pecho (Jensen, 1999). Esta concentración es mayor con la ingesta de dietas ricas en grasa (Barry Lawrence, 1994; Jensen, 1999) y con un mayor contenido de grasa corporal en la madre. El contenido de grasa también varía en función del periodo de lactancia, siendo menor su contenido en el calostro, aumentando en la leche de transición y siendo aún mayor en la leche madura (Koletzko y col. 2001; Doménech y Díaz-Gómez, 2001; Macías y Schweigert, 2001). Igualmente, se produce variabilidad durante una toma, siendo la concentración de grasa superior al final de la misma proporcionando una sensación de saciedad al lactante (Jensen, 1999).

La grasa se encuentra presente en la leche materna en forma de glóbulos grasos formados por las células alveolares de la glándula mamaria. En el núcleo de los glóbulos se encuentran los triglicéridos, y en la superficie se encuentran moléculas anfipáticas como fosfolípidos, proteínas y ésteres de colesterol. Esta superficie anfipática es necesaria para la dispersión y estabilización de la grasa de la leche en la fase acuosa de ésta. El diámetro de los glóbulos se encuentra entre 1 y 10 μm , siendo la mayoría de 4 μm . La gran área superficial de los glóbulos (4.5 m^2/dl) permite la unión de diferentes lipasas, contribuyendo así a la digestión de los triglicéridos.

Con el incremento de la fracción grasa de la leche a lo largo de las cuatro primeras semanas de lactancia, se produce un aumento del tamaño de estos glóbulos. Esto va acompañado de una disminución de los fosfolípidos y colesterol (presentes en la membrana lipídica) y un incremento de los triglicéridos (lípidos del núcleo) (Harzer y col. 1983; Jensen, 1995).

La formación de la grasa por las células alveolares es estimulada por el vaciado del pecho durante la toma y por la secreción de prolactina en el lóbulo anterior y la glándula pituitaria. La mayor proporción de la grasa de la leche materna se forma a partir de los lípidos de la dieta y del tejido adiposo materno. Además parte de esta grasa puede ser sintetizada “de novo” en la misma glándula mamaria a partir de la glucosa, síntesis que da como productos resultantes ácidos grasos saturados de cadena media (Thompson y col. 1985). La proporción de ácidos grasos resultantes de esta síntesis endógena aumenta cuanto más pobre sea la dieta en grasa y más rica en carbohidratos (Koletzko y col. 1991; Koletzko y col. 2001).

4.4.1. Ácidos grasos

Los ácidos grasos no se encuentran en la naturaleza como tales, están formando parte de los triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos (Jensen, 1995; Hamosh, 1995).

Los ácidos grasos se pueden clasificar de diferentes formas, una de ellas sería en función del número de átomos de carbono que presentan, así existen los ácidos grasos de cadena corta (2-4 carbonos), de cadena media (6-10 carbonos), de cadena larga (12-22 carbonos) y de cadena muy larga (≥ 24 carbonos) (Agostoni y col. 2001). Otra clasificación es en función del número de dobles enlaces que presenta la cadena. De esta manera, se diferencian entre ácidos grasos saturados, cuando no presentan dobles enlaces, monoinsaturados cuando presentan un doble enlace y poliinsaturados, cuando presentan más de un doble enlace (Giovannini y col. 1995; Agostoni y col. 2001). Igualmente, en función de la posición del doble enlace se pueden distinguir tres series metabólicas principales, n-9, n-6 y n-3, también conocidas como ω -9, ω -6 y ω -3 (Agostoni y col. 2001).

A nivel funcional, es importante diferenciar entre los ácidos grasos destinados a la obtención de energía, que serían los ácidos grasos saturados, y los ácidos grasos implicados en el funcionalismo de tejidos, siendo componentes básicos de la grasa estructural de las membranas del cerebro y de la retina (Martínez, 1992).

La composición de los ácidos grasos en la leche humana varía en función del tiempo de gestación, la paridad, las enfermedades, los factores individuales, la evolución de la lactancia y el estado nutricional de la madre (Jensen, 1995; Jensen, 1999; Koletzko y col. 1999).

Los dos ácidos grasos mayoritarios en la leche humana son el ácido oleico (C18:1n-9) y el ácido palmítico (C16:0) (Dotson y col. 1992; Jiménez, 2001; Koletzko y col. 2001). Si la comparamos con la leche de vaca, la grasa de la leche humana es más insaturada y contiene menos ácidos grasos saturados de cadena larga. Ambos factores condicionan la digestibilidad y la biodisponibilidad de los ácidos grasos esenciales en el lactante (Nichols, 1988).

A partir de precursores simples como la glucosa o los aminoácidos, los humanos pueden sintetizar ácidos grasos saturados y monoinsaturados “de novo”, así como elongar las cadenas de ácidos grasos. Estos procesos se realizan en el hígado y en el tejido adiposo principalmente (Agostoni y col. 2001). El ser humano puede sintetizar ácidos grasos saturados mediante la enzima Δ -9-desaturasa, que introduce un doble enlace mediante un proceso de desaturación. Este enzima no es capaz de introducir dobles enlaces más allá del carbono 9, con lo que sólo se pueden sintetizar los ácidos grasos de la serie n-9 (Agostoni y col. 2001).

Sin embargo, existen ácidos grasos incapaces de ser sintetizados por el hombre y que son conocidos como ácidos grasos esenciales al tener que ser aportados por la dieta (Burr, 1929). Los ácidos linoleico (LA, C18:2n-6) y α -linolénico (ALA, C18:3n-3) son esenciales debido a que el ser humano no puede insertar dobles enlaces por la falta de enzimas Δ -12- y Δ -15-desaturasas, responsables de la introducción de dobles enlaces en las posiciones n-6 y n-3.

Los ácidos grasos de cadena larga, tanto los saturados como los insaturados, no se sintetizan “de novo”, sino que son importados del plasma, de donde son obtenidos de los triglicéridos que se encuentran en los quilomicrones o en las VLDL (lipoproteínas de baja densidad) mediante la lipoprotein lipasa. También pueden provenir de los ácidos grasos no esterificados que circulan unidos a la albúmina (Koletzko, 1992). Durante la lactancia, la actividad de la lipoprotein lipasa disminuye en el tejido adiposo e incrementa marcadamente en el tejido mamario, indicando un aumento de la utilización de los ácidos grasos en este tejido.

4.4.2. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CLs)

4.4.2.1. Origen de los AGPI-CLs de la leche materna

Los AGPI-CLs de la leche materna proceden de diferentes fuentes:

- la dieta ingerida por la madre. El DHA y el AA están presentes en el pescado, carne y huevos, pero no en frutas, vegetales o cereales (Chow, 2000).
- las reservas que tiene acumulada la madre.
- la síntesis endógena procedente de sus precursores, los ácidos grasos esenciales, en el hígado, en la glándula mamaria o en otros tejidos. Se sabe que las células epiteliales mamarias tienen los enzimas necesarios para la síntesis de AGPI-CLs (Grammatikos y col. 1994).

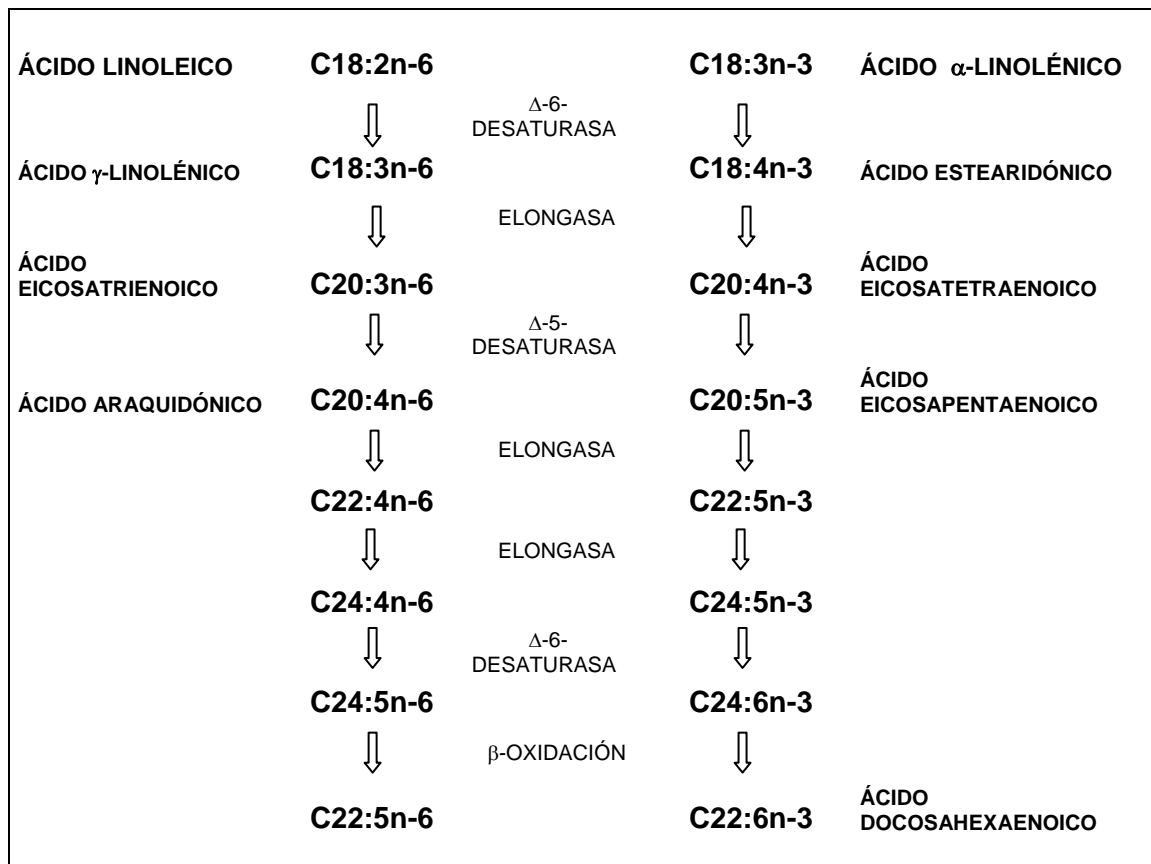
A diferencia del contenido de AA en la leche materna que es bastante estable y no existe mucha variabilidad a nivel mundial, el contenido de DHA puede variar en función de la dieta de la madre. De este modo, las madres que viven en zonas de mar y que comen habitualmente pescado, presentan unos niveles más altos de DHA en sus leches, comparado con aquellas madres que viven en diferentes zonas y con diferentes estilos de vida (Agostoni, 2005).

La dieta de los países Occidentales presenta una relación de n-6:n-3 de 15 a 1 (Simopoulos, 2002). El hecho de tener una dieta rica en ácidos grasos de la serie n-6 es principalmente debido al uso de maíz, aceites de girasol y de cártamo en la dieta Occidental. Estos aceites son ricos en ácidos grasos de la serie n-6 y bajos en ácidos grasos de la serie n-3. Igualmente, a esta relación también influye la baja ingesta de pescado, principal fuente de los ácidos grasos de la serie n-3, especialmente DHA y EPA, y la elevada ingesta de carne de cerdo y pollo los que son típicamente alimentados con dietas basadas principalmente en maíz y así tienen una elevada relación de n-6:n-3.

4.4.2.2. Importancia de los AGPI-CLs

La importancia de los ácidos grasos esenciales (LA y ALA) radica en que son precursores de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CLs), tanto de la serie n-6 cuyo representante es el ácido araquidónico (AA, C20:4n-6), como de la serie n-3 con los ácidos docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3) y eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3) (**tabla 2**). Esto ocurre gracias a un sistema constituido por las enzimas elongasas desaturasas que aumentan el tamaño de la cadena de carbonos y que introducen nuevos dobles enlaces a los ácidos grasos precursores (Sprecher y col. 1995; Ferdinandusse y col. 2001; Innis, 2003). Estos procesos ocurren en el retículo endoplasmático (Brenner y Peluffo, 1969).

Tabla 2. Síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados a partir de los ácidos linoleico y α -linolénico (adaptado de Agostoni y col. 2001).



Con respecto a la elongación y desaturación de la cadena de carbonos, los ácidos grasos de las diferentes familias (n-9, n-6 y n-3) compiten por el mismo sistema enzimático y por eso influyen en el metabolismo de los ácidos grasos de sus respectivas familias. Los tres ácidos precursores (ácido oleico: C18:1n-9, ácido linoleico: C18:2n-6 y ácido α -linolénico: C18:3n-3) compiten por la Δ -6-desaturasa, que se convierte así en una enzima limitante. La mayor afinidad siempre la posee el ácido α -linolénico, seguido del linoleico y finalmente del oleico. El predominio de una u otra vía metabólica depende de la cantidad de ácido graso presente.

Los ácidos grasos de cada familia no pueden convertirse entre sí. Por lo tanto, la síntesis de los diferentes ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga depende directamente de la concentración de los respectivos precursores y es de esencial importancia un aporte correctamente balanceado. La relación ideal entre ácido linoleico y α -linolénico es de 5:1 a 15:1. (Widdowson, 1988; ESPGAN, 1991).

El DHA y el AA son componentes estructurales importantes del sistema nervioso central. Estos ácidos grasos son transferidos a través de la placenta al feto, están presentes en la leche humana, y son acumulados en el cerebro y retina durante el desarrollo fetal e infantil, existiendo una elevada concentración de DHA en la retina, y de DHA y AA en la materia gris del cerebro (Lauritzen y col. 2001; Innis, 2003). Estudios en animales han mostrado que la disminución de DHA desde la retina y

cerebro produce una reducción de la función visual y del aprendizaje (Salem y col. 2001).

El DHA y el AA han sido utilizados para la suplementación de preparados para lactantes. No obstante, los estudios realizados para analizar el efecto que produce dicha suplementación sobre el recién nacido a término no han sido concluyentes (Helland y col. 2003). Algunos de ellos han mostrado una mejora en la agudeza visual, en la resolución de problemas y/o en el desarrollo neurológico del recién nacido a término (Makrides y col. 1995; Agostoni y col. 1995; Carlson y col. 1996; Williatts y col. 1998; Birch y col. 1998, 2000), sin embargo, otros no han mostrado ningún efecto (Horby y col. 1998; Lucas y col. 1999; Makrides y col. 2000b; Auestad, 2001).

Estudios similares se han realizado en recién nacidos a pre-término. Estos niños son más vulnerables a las deficiencias de DHA que los recién nacidos a término debido a que no reciben la suplementación intrauterina de DHA durante el último trimestre de embarazo (Helland y col. 2003) y su vía metabólica para obtener DHA a partir de sus precursores es inmadura (Chambaz y col. 1985; Gibson y Makrides, 1998; Carlson, 2001; Minda y col. 2002). De este modo, en los estudios realizados en prematuros se ha comprobado que la suplementación de DHA incrementa la maduración de la función visual y el procesamiento de la información (Uauy, 1990; Carlson y col. 1993b; O'Connor y col. 2001).

A. AGPI-CLs y retina

El DHA es el principal ácido graso poliinsaturado de la retina, bien sea procedente de la dieta o por síntesis a partir del ALA; además, la retina tiene unos mecanismos muy eficaces para el reciclado y conservación del mismo, que permiten disponer de él aunque no se ingiera durante algún tiempo. El DHA supone hasta el 20% de todos los ácidos grasos de la retina y hasta un 80% de todos los ácidos grasos poliinsaturados (Giusto, 2000). Las membranas de la retina están especializadas en una rápida transmisión de la luz y contienen entre el 90 y 95% de los lípidos como fosfolípidos.

Cada bastón se compone aproximadamente de un millar de discos apilados que contienen el fotorpigmento *rodopsina* (348 aminoácidos y unido en una lisina el *11-cis retinal*). El DHA en la retina se incorpora en dos sectores, en los fosfolípidos estructurales de la bicapa lipídica de la membrana celular y en la membrana de los discos de los bastones.

La rodopsina se forma en los discos membranosos del segmento externo de los bastones, cuando una proteína denominada opsina se une al 11-cis retinal. La captura de fotones por el 11-cis retinal lo isomeriza a la forma de *todo trans retinal* y ello conduce a la formación de *metarrodopsina II*, que es la forma foto-activada de la rodopsina (Brown, 1994). Además, parte del todo trans retinal se separa de la opsina y se convierte en *todo trans retinol*.

La regeneración de rodopsina a partir de estos productos ocurre del siguiente modo: el todo trans retinol es transferido a la primera capa o epitelio pigmentoso de la retina, donde se transforma en 11-cis retinal, el cual será transferido al segmento externo para formar la rodopsina. El 11-cis y el todo trans son retinoides muy insolubles en agua, sin embargo, se mueven en el medio o matriz acuosa que existe entre estas dos capas. Esto

es posible gracias a unas proteínas transportadoras, conocidas como Interphotorreceptor Retinal Binding Proteins (IRBP), que poseen la facultad de unirse tanto a los retinoides como a los ácidos grasos.

El DHA tiene la mayor afinidad por la IRBP, casi el doble que la del ácido araquidónico (AA, 20:4n-6) y tres veces más que por la del ALA. Esta mayor afinidad del DHA tiene dos consecuencias importantes. Por un lado, limita la unión del 11-cis retinal a la IRBP y, por el otro, facilita la disociación de este compuesto desde su sitio de unión a la opsina. Esta afinidad, sin embargo, no afecta a la interacción /disociación del todo trans retinol con la IRBP (Wolf, 1998).

La mayor proporción de DHA existente en el segmento externo (20% de todos los ácidos grasos) frente a la del epitelio pigmentoso (3,5%) hace que la IRBP en la zona del epitelio se una a ácidos grasos saturados, lo cual le proporciona una mayor afinidad por el 11-cis retinal. No obstante, cuando llega al segmento externo, el DHA desplaza a los saturados de la IRBP por su mayor afinidad, lo cual ocasiona una rápida disociación del 11-cis retinal, que iría al segmento externo. El todo trans retinol se movería desde el segmento externo hasta el sitio de unión de la IRBP, que antes ocupaba el 11-cis retinal, y sería transferido hasta el epitelio pigmentoso, cerrando así el círculo.

La experiencia animal (Bush y col. 1994) ha demostrado que el DHA desempeña un importante papel en la regeneración de la rodopsina. El 11-cis retinal necesario para formar la rodopsina es sintetizado en la capa del epitelio pigmentoso, en contacto con la coroides, a partir del todo trans, pero éste no será liberado de forma óptima a la opsina de los bastones si no existe DHA. Otro mecanismo distinto y en el que interviene el DHA se ha aclarado gracias a los estudios in vitro (Litman y Mitchell, 1996). Elevadas concentraciones de DHA y otros ácidos poliinsaturados en la membrana del disco provocan unos cambios biofísicos que facilitan la difusión de proteínas fototransductoras, especialmente la transducina, pero también otras como la rodopsina quinasa y la recoverina, y ocurre sobretodo cuando el DHA está en posición n-2 del fosfolípido. La difusión más lenta de estas proteínas a través de la membrana discal implica retrasos en el electroretinograma y retraso en la recuperación de los bastones, a la que contribuye.

➤ **Métodos para determinar la agudeza visual en recién nacidos**

▪ ***Mirada preferencial forzada (Forced-Choice Preferential Looking, FPL)***

La técnica de la mirada preferencial forzada sólo valora la desviación de la mirada, y no se ha extendido su utilización debido al número de pruebas requeridas y al tiempo necesario para las mismas (Teller Acuity Card Handbook, 1989).

▪ ***Cartas Teller***

Inicialmente, se utilizó para medir la agudeza visual, el método de las *Cartas Teller* (Teller Acuity Card Handbook, 1989) que consiste en la presentación de una rejilla de franjas blancas y negras, y de un campo homogéneo y gris de la misma luminiscencia. Cuando las rejillas contienen franjas anchas, los lactantes miran preferentemente a esta figura en vez de al campo gris. Eso indica que han resuelto la rejilla, cosa que no ocurre

si ésta esta formada por franjas estrechas. El lactante joven está en esta situación, pero al cabo de unos meses es capaz de resolver la rejilla de franjas estrechas. Esto sugiere que existe una mejora de la agudeza en relación con la edad.

En el procedimiento de tarjetas de agudeza, el examinador valora cuándo el niño es capaz de resolver una rejilla con una determinada frecuencia de franjas. Inicialmente, las cartulinas eran rectángulos de cartón gris de 71 cm de longitud por 28 cm de altura, con un agujero central de 4 mm para que el examinador viese al niño. En la derecha se colocaban las rejillas con distintas frecuencias de ancho de franjas y en la izquierda, la gris. Este procedimiento, y tras casi 30 años de aplicación, puede considerarse como válido para su aplicación en estas edades de la vida.

Sin embargo, al descansar sobre un estímulo de rejilla, no es equivalente a los tests de agudeza de reconocimiento que se aplican en otras edades. Así, este procedimiento no descubriría el déficit de agudeza de reconocimiento que se da en la ambliopatía o en trastornos que selectivamente afecten a la fovea. Si a esto añadimos las frecuentes e importantes variables de confusión, tales como la subjetividad de la valoración de la prueba, la reproductibilidad de las mismas o aspectos propios del niño como es la maduración de la visión binocular, todo ello hace que sólo muy pocas unidades puedan dar resultados rigurosos. Esta gran variabilidad, que lo convierte inaplicable a estudios multicéntricos, ha motivado que este método, en definitiva de conducta, vaya siendo suplantado por otro más objetivo.

- **Potencial visual evocado (Visual Evoked Potencial, VEP)**

El método de VEP presenta dos ventajas sobre el método de las cartas Teller. En primer lugar, la menor variabilidad que implica el análisis de un resultado analógico (o digitalizado) frente a una respuesta conductual. En segundo, su mayor sensibilidad para detectar trastornos de la vía óptica y visual, especialmente la agudeza iniciada en la fovea. La técnica original (Norcia y Tyler, 1985) consiste en una fuente de estímulos que aparecen en un monitor conectado a un programa que permite crear un enrejado con franjas verticales (o curvas sinusoidales o sinusoides cuadradas), de anchura decreciente, denominada Frecuencia Espacial (FE). El concepto de barrido (*sweep VEP acuity*) significa comenzar con FE más baja (franjas más anchas) e ir aumentándolas hasta el límite de la agudeza (Norcia y Tyler, 1985). Estas franjas alternan entre sí con un ritmo determinable entre 2,5-23 inversiones/segundo. Otras variables, como contraste, movimiento, luminiscencia de la pantalla, tiempo, ángulos y distancia al monitor, se pueden modificar y normalmente están estandarizadas.

El electroencefalograma es filtrado en tiempo real para obtener la fase y la amplitud de la segunda respuesta armónica mediante un *software* que utiliza el análisis discreto de Fourier. El tratamiento del ruido de base es un requisito indispensable. La agudeza por VEP de barrido viene expresada en *log MAR* (ángulo mínimo de resolución, Minimum Angle Resolution), permitiendo valoraciones precisas y diferentes en lactantes según hayan recibido AGPI-CLs o no (Skoczinski y Norcia, 1999; Birch y col. 2002), o sus precursores esenciales (Makrides y col. 2000). Cuando el estímulo visual del método de VEP es en forma de flash, el método se denomina **FVEP**.

Los estudios realizados en recién nacidos a pre-término muestran como la mejoría de la función visual acontece en etapas importantes del desarrollo al ingerir ácidos

grasos de la familia n-3, especialmente el DHA (Gibson y Makrides, 1999; Simmer, 2000). Se sabe que la mayor acumulación de DHA en el cerebro fetal acontece durante el último trimestre de la gestación y que este acumulo no es regular, sino que varía de una gestación a otra. (Clandinin y col. 1980). En general, un recién nacido a término tiene niveles plasmáticos cuatro veces más altos de DHA en fosfolípidos que un recién nacido a pre-término extremo. Las cantidades absolutas dependen, o al menos están influidas, de los hábitos alimentarios de las madres, y concretamente de la ingestión de mayores cantidades de pescado durante la gestación (Moya y col. 2000).

Se ha observado que la función retinal en mamíferos alimentados con dietas carentes de ácidos grasos n-3 se ve claramente afectada. De la misma manera, estudios publicados en la última década han puesto de manifiesto una relación positiva entre el contenido de DHA en preparados para lactantes y la función visual en niños sanos nacidos a pre-término obteniendo unos resultados parejos a recién nacidos alimentados al pecho (Lauritzen y col. 2001).

No obstante, los resultados son menos concluyentes en recién nacidos a término: algunos estudios han puesto de manifiesto que la ingesta de AGPI-CLs conlleva a una mejora en la agudeza visual. Sin embargo, en otros no se han encontrado efectos apreciables. Pero ninguno ha mostrado efectos negativos en la agudeza visual. La **tabla 3** agrupa los diferentes estudios en recién nacidos a término en relación a la influencia de la ingesta de AGPI-CLs sobre la agudeza visual.

Los resultados contradictorios obtenidos en los diferentes estudios en recién nacidos a término pueden ser explicados por una serie de factores inherentes al diseño y ejecución del estudio como variabilidad en el número de participantes, duración del estudio y edad del neonato en el momento de realizar el estudio.

Tabla 3. Estudios de la agudeza visual en recién nacidos a término alimentados con leche materna (LM) o preparado para lactantes (P). (adaptado de Uauy y col. 2003).

Referencia	Nutrición/ muestra (n)	% AGPI-CLs respecto el total de lípidos	Estudio, periodo evaluación	Principales resultados
Makrides 1995	P1/13 P2/19 LM/23	DHA 0.36; EPA 0.58; GLA 0.27 LA 16.8; ALA 1.6	VEP 16, 30 semanas	P1 y LM mejor agudeza visual
Carlson 1996	PI/19 P2/20 LM/19	DHA 0.1; AA 0.43 LA 21.8; ALA 2.2	Cartas Teller 2,4,6,9,12 meses	P1 y LM mejor agudeza visual (sólo a los 2 meses)
Auestad 1997	P1/26 P2/28 P3/28	DHA 0.12; AA 0.43 DHA 0.23 LA 21.9; ALA 2.2	VEP 2,4,6,9,12 meses FPL 2,4,6,9,12 meses	No diferencias en el VEP No diferencias en la FPL
Horby 1998	P1/14 P2/12 P3/11 LM/25	DHA 0.3; GLA 0.5 DHA 0.3 LA 12; ALA 1.2; DHA 0.38; AA 0.4	VEP 4 meses	LM mejor agudeza visual que las fórmulas. P1 y P2 no presentaron una mejora significativa en la agudeza respecto la P3
Birch 1998	P1/23 P2/22 P3/23 LM/21	DHA 0.36; AA 0.72 DHA 0.35 LA 14.6; ALA 1.49; DHA 0.29; AA 0.56	FPL 6,17,26,52 semanas VEP 6,17,26,52 semanas	No diferencias en la FPL P1, P2 y LM mejor agudeza visual que P3 a las 6,17,26 y 52 semanas
Makrides 2000	P1/24 P2/23 P3/21 LM/46	DHA 0.34; AA 0.34 DHA 0.35 LA 16.8; ALA 0.13; DHA 0.2; AA 0.4	Flash VEP 16,34 semanas	No diferencias en el Flash VEP
Auestad 2001	P1/80 P2/82 P3/77 LM/165	DHA 0.14; AA 0.46 (Triglicéridos derivados del huevo) DHA 0.14; AA 0.46 (procedente de aceite de pescado y de hongo) LA 20; ALA 2; DHA 0.14; AA 0.46	FPL 2-12 meses	No diferencias en la agudeza visual
Khedr 2004	P1/23 LM/30	No suplementada con DHA ni AA	Flash VEP 12 meses	LM mejor agudeza visual que P1

Abreviaturas de la tabla: AA: ácido araquidónico; AGPI-CLs: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; ALA: ácido α -linolénico; DHA: ácido docosahexaenoico; EPA: ácido eicosapentaenoico; **Flash VEP**: potencial visual evocado estimulado por flash; **FPL**: mirada preferencial forzada; **GLA**: ácido γ -linolénico; LA: ácido linoleico; **VEP**: potencial visual evocado.

B. AGPI-CLs y cerebro

El sistema nervioso y particularmente el cerebro son tejidos cuya composición es principalmente lipídica ya que aproximadamente un 10% del peso del cerebro y un 50% de su peso seco está constituido por lípidos, especialmente por fosfolípidos (Svennerholm, 1968; Rapoport, 2001; Innis, 2003). Dentro de estos lípidos encontramos en un 50% los fosfolípidos, en un 20% el colesterol, entre un 15% y un 20% cerebrósidos, y en pequeñas cantidades hay gangliósidos y sulfátidos (Sastry, 1985). El 60-65% de los lípidos totales del cerebro son ácidos grasos poliinsaturados y de este porcentaje más del 85% está constituido por el DHA (35-40%) y por el AA (40-50%) (Valenzuela y Nieto, 2001). Los fosfolípidos de la materia gris del cerebro contienen elevadas cantidades de DHA en fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, y elevadas cantidades de AA en fosfatidiletanolamina (Tam y Innis, 2006).

➤ El DHA en la estructura y función de las membranas neuronales

La fluidez de las membranas está relacionada con el grado de insaturaciones de sus ácidos grasos, de modo que los ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (16:0) son más rígidos (Feller y col. 2002). En su estructura espacial, el DHA adopta una conformación semi helicoidal debido a la longitud de su cadena y a las seis insaturaciones (dobles enlaces) que presenta y que le otorgan una alta flexibilidad (Gawrisch y col. 2003). Esta conformación permite que los fosfolípidos que poseen DHA sean estructuras moleculares muy expandidas, por lo cual por unidad de volumen en una membrana se van a acomodar menos moléculas (Salem y col. 2001). Esto significa que las membranas que posean fosfolípidos que contienen DHA van a ser estructuras de gran fluidez y con muy baja tendencia a la formación de estructuras cristalinas de carácter más denso (Crawford y col. 1999). Muchos investigadores han propuesto que ésta sería una característica fundamental de las membranas que poseen DHA ya que la mayor fluidez facilitaría el movimiento de moléculas en la membrana (receptores, proteínas G, canales iónicos, enzimas, factores de crecimiento neuronal) y la transducción de señales que es propia de las células excitables, como es el caso de las neuronas.

Las membranas de los sinaptosomas y de las mitocondrias neuronales son las que presentan mayor proporción de DHA, incrementando la eficiencia del transporte de electrones por incrementar el movimiento lateral de proteínas en la bicapa, así se facilitará la unión proteína-proteína (Teague y col. 2002; Niu y col. 2004; Valentine y col. 2004). Adicionalmente existe una relación directa entre el contenido de DHA en los fosfolípidos de la mitocondria y la permeabilidad de la membrana a los protones (Hulbert, 2003). Así, el contenido de DHA de los fosfolípidos influye en la función mitocondrial.

Es destacable el hecho que las neuronas no tienen la capacidad de formar DHA a partir de su precursor, ácido α -linolénico (ALA), y son las células gliales, especialmente los astrocitos los que desaturan y elongan al ALA para convertirlo en DHA, el que posteriormente es traspasado a las neuronas (Moore y col. 1991; Williard, 2001). Los astrocitos y los oligodendrocitos presentan una proporción mucho menor de DHA, y también de AA que las neuronas (Moore y col. 1991). De esta forma, la mayor fluidez de las membranas neuronales estaría vinculada a la función del DHA en el tejido cerebral facilitando la formación de los conos de crecimiento axonal, el establecimiento

de las sinapsis y la interacción de las dendritas, mejorando así la plasticidad del tejido cerebral (Jumpsen y col. 1997). Cabe destacar que esta misma propiedad es de gran importancia en los procesos de neurogénesis, migración neuronal y de sinaptogénesis, propias del desarrollo del sistema nervioso.

➤ DHA y aprendizaje

Numerosos autores han asociado la mayor incorporación de DHA en el tejido cerebral con una mayor capacidad de aprendizaje y de memorización. Los estudios se han realizado en ratones (Lim y Suzuki, 1999; Carrié y col. 2000b) ratas (Yonekubo y col. 1993), primates (Champoux y col. 2002) y en humanos (revisada por Cockburn, 2003). En el caso de los ratones, ratas y primates no humanos, ha sido posible correlacionar la mayor incorporación de DHA en el hipocampo y en la corteza frontal con un mejor desempeño en pruebas realizadas en **laberintos elevados con espacios ciegos** (Nakashima y col. 1993), en **el laberinto de agua de Morris** (Lim & Suzuki, 1999; Carrié y col. 2000b; Moriguchi y col. 2000) o en **la caja de Skinner** (Valenzuela y col. 2003b). Estos experimentos consisten en la suplementación de la madre con DHA y en la evaluación del contenido de DHA en diferentes tejidos de la madre, en su secreción láctea y en el cerebro de las crías. En este último caso, se ha analizado el contenido total de DHA, el contenido del ácido graso de diferentes segmentos cerebrales, y la presencia del DHA en los diferentes tipos de fosfolípidos que forman la estructura lipídica del cerebro (Lim y Suzuki, 1999; Carrié y col. 2000b; Valenzuela y col. 2004). La suplementación de las madres se ha realizado antes de la etapa gestacional, durante la etapa gestacional, o durante ambos períodos (Valenzuela y col. 2005).

En el caso de los humanos, hay evidencias de que la alimentación es un factor determinante en el contenido de DHA en la corteza cerebral, siendo significativamente mayor la concentración de este AGPI-CL en el caso de lactantes alimentados con leche humana que en los alimentados con preparados para lactantes (Farquharson y col. 1992). Diferentes estudios han mostrado una relación positiva entre la lactancia y el desarrollo cognitivo (Lucas y col. 1992, 1994; Rogan y goleen, 1993; Anderson y col. 1999; Angelsen y col. 2001). Lucas y col. 1992, 1994 concluyeron que la leche humana contenía factores biológicos que podrían ser favorables para el desarrollo mental en recién nacidos a pre-término, atribuyendo esta importancia al AA y al DHA.

Diferentes autores (Colombo, 2001; Uauy y col. 2000; Wainwright, 2000) que han comparado diversas formas de alimentar al recién nacido (leche materna, preparados para lactantes no suplementados y preparados para lactantes suplementados con AGPI-CLs) han correlacionado las mayores puntuaciones obtenidas por niños nacidos a término de diferentes edades, provenientes de madres que han aportado exclusivamente lactancia natural, o lactancia natural apoyada con preparados para lactantes suplementados con DHA, o sólo aporte de preparados suplementados con DHA, en la aplicación de tests que determinan habilidades de aprendizaje tales como el **test de Kaufman** (Bakker y col. 2003), las **escalas de Bayley** para la evaluación del desarrollo infantil (Birch y col. 2000), el test de **desarrollo psicomotor de Brunet-Lézine** (Agostoni y col. 1995, Agostoni y col. 1997), el test de evaluación de **inteligencia de Fagan** (Werkman y Carlson, 1996), la **capacidad para resolver problemas** según Willatts y col. 1998 o la **adquisición de un mejor vocabulario** (O'Connor y col. 2001).

En cambio, existen otros estudios que no observaron diferencias en el desarrollo infantil, evaluado por las escalas de Bayley, entre recién nacidos a término alimentados con leche materna y aquellos alimentados con preparados para lactantes suplementados con AGPI-CLs (Lucas, 1999; Makrides, 2001; Auestad, 2001).

▪ ***Pruebas realizadas en animales para evaluar el aprendizaje***

El **laberinto elevado con espacios ciegos** es una estructura de conductos en forma de cruz que se coloca a cierta altura del suelo siendo dos conductos abiertos y dos cerrados (ciegos). El animal se coloca en el conducto ciego y se evalúa el tiempo que el animal necesita para percibir el peligro que consituye el acercarse a los conductos abiertos (File y col. 1996). También se evalúa el tiempo de latencia que media entre el aprendizaje y la pérdida de esta habilidad.

La utilización del **laberinto de agua de Morris**, 1984 se basa en la medición del tiempo que toma un ratón o una rata en conocer donde se encuentra una plataforma sumergida y no visible que le permite al animal salvar un estado de inmersión en el líquido del laberinto. El test mide el aprendizaje espacio-temporal de los animales. En este caso, se ha observado en las crías provenientes de madres suplementadas con DHA un menor tiempo en la adquisición de la habilidad para aprender a conocer donde está la plataforma que les permite salir del líquido, y un mayor período de latencia en la pérdida de la habilidad cuando se deja de aplicar el entrenamiento periódico. Los resultados se interpretan como una mayor capacidad de aprendizaje y una mejor retención o memorización de la habilidad adquirida.

La caja de Skinner es un test de habilidades donde se evalúa el tiempo que le toma a una rata asociar la presión de una palanca con el aporte de alimento, todo esto operado en un contenedor de material sintético. Una versión más compleja del test permite asociar la presión de la palanca por parte de la rata sólo cuando está prendida una luz de la caja que es accionada por el operador. De esta forma, este test no sólo evalúa la capacidad de aprendizaje y retención de este, sino además permite determinar la capacidad de discriminación en la aplicación de la habilidad adquirida frente a una variable de mayor complejidad, en este caso la luz. Valenzuela y col. 2003a determinaron que la suplementación de la madre con DHA preformado permite a las crías una significativa mayor capacidad de discriminación que las crías provenientes de madres suplementadas con el precursor ALA y éstas a su vez muestran puntuaciones muy superiores a los animales controles (Valenzuela y col. 2003b). Es interesante destacar que la suplementación con DHA y ALA permite obtener una acumulación similar de DHA en los diferentes segmentos cerebrales estudiados (corteza frontal, cerebelo e hipocampo) (Valenzuela y col. 2004).

▪ ***Pruebas realizadas en humanos para evaluar el desarrollo infantil***

La Escala de Bayley del Desarrollo Infantil (Rodríguez y col. 2005) es una de las pruebas de desarrollo más utilizadas para evaluar el desempeño del niño en la primera infancia. Esta escala fue creada por Nancy Bayley en los Estados Unidos de Norteamérica en el año 1933, revisada en 1969 y en 1993, siendo esta la última versión. Ha sido diseñada para valorar el estado de desarrollo en niños con edades comprendidas entre un mes y tres años y medio. A través de la misma se obtiene una comprensión

integral del niño ya que consta de tres secciones que se complementan: escala mental, escala motora y registro del comportamiento.

La *escala mental* mide capacidades como la percepción, la memoria, el aprendizaje, y la vocalización. La *escala motora*, evalúa las actividades motoras gruesas (músculos grandes) y finas (de manipulación), incluyendo la coordinación sensoriomotora. La *escala de calificación del comportamiento* proporciona información sobre la naturaleza de las conductas sociales y objetivas del niño hacia su ambiente, según se expresen en actitudes, intereses, emociones, nivel de actividad y tendencia a alcanzar o abandonar la estimulación. También recoge información cualitativa de la conducta del niño en interacción con la madre y con extraños (evaluador) en una variedad de situaciones.

Estos instrumentos de evaluación tienen por finalidad detectar demoras en el desarrollo, se utilizan principalmente en aquellos en quienes se sospecha un riesgo de desarrollo anormal, lo que posibilita actuar de manera inmediata, atenuando así el daño que diferentes noxas han provocado en el sistema nervioso. Esto es posible ya que el cerebro postnatal es “moldeado” por la experiencia; especialmente durante los primeros meses de vida, cuando la corteza está aún creciendo y organizándose rápidamente (Black, 2003). El término técnico para esta maleabilidad o elasticidad del cerebro es plasticidad. Las conexiones sinápticas iniciales, algunas de las cuales dependen de la estimulación sensorial, refinan o estabilizan los circuitos cerebrales genéticamente diseñados. Incorporar la escala Bayley entre los instrumentos habituales para evaluar al niño pequeño aporta una manera óptima de indagar en el desarrollo temprano contribuyendo sin duda a la prevención primaria de la salud.

La Escala de Brunet-Lézine (Maganto C, 1995) se usa para la valoración del desarrollo psicomotor en la primera infancia, surgió como consecuencia del estudio comparado con diversas escalas de Baby-Tests, especialmente los de Búlher-Hetzer y A. Gessel. Los autores querían conocer al niño en su propia espontaneidad, en el desarrollo mismo de su vida, en el seno de su medio ambiente familiar, al cual permanece intensamente ligado en estas edades.

En 1994 Denise Josse comienza la revisión de esta escala, manteniendo una parte importante del contenido original así como su principio de construcción y sus características de base en las siguientes áreas:

- Desarrollo postural
- Coordinación óculo – manual
- Estudio del lenguaje comprensivo – expresivo
- Relaciones sociales y adaptación

Las modificaciones aportadas se centran fundamentalmente en la evaluación del desarrollo del lenguaje. Cada una de estas áreas se evalúa mediante 10 ítems. Los ítems están jerarquizados según criterios de maduración evolutiva y se puntúan ponderadamente, dando una cifra final en días. La razón entre la puntuación final en días y la edad cronológica, nos da un cociente de desarrollo.

El test de Kaufman (Kaufman Assessment Battery for Children, K-ABC) es una técnica utilizada en niños de edades comprendidas entre los 2.5 y 12.5 años para determinar la inteligencia y la conducta de los mismos (Kaufman y Kaufman, 1983).

Este test implica 4 escalas: procesado secuencial, procesado simultáneo, conducta y habilidades no verbales. Las escalas del procesado secuencial y simultáneo pretenden reflejar la manera que tienen el niño de resolver los problemas y de procesar la información. Las puntuaciones de estas dos escalas sirven para medir la inteligencia del niño. La escala de procesado secuencial mide la capacidad que posee el niño para resolver problemas que requieran del uso de estímulos secuenciales, en cambio, la escala de procesado simultáneo mide la capacidad para resolver problemas espaciales, analógicos, que requieran del procesado de diferentes estímulos a la vez. La escala no verbal depende de las dos anteriores, está formada por subtests de las escalas de procesado secuencial y simultáneo que no requieren palabras. El examinador podría comunicarse con el niño a través de gestos, y el niño podría responder con movimientos.

➤ **El DHA y la regulación de la expresión de genes en el cerebro y otros órganos**

Este es un aspecto de la función del DHA mucho menos estudiado, pero sobre el cual se ha acumulado cierta evidencia en los últimos años. El DHA produciría una sobreexpresión selectiva de ciertos genes neuronales al mismo tiempo que reprimiría la expresión de otros genes en las neuronas (Kitajka y col. 2002). De esta forma, el DHA regularía los procesos de apoptosis que son determinantes en la neurogénesis (Kim y col. 2000). Recientemente se describió el efecto regulador del DHA en la expresión de genes de la retina que es un tejido de derivación neuronal (Rojas y col. 2003). El efecto inductor de la expresión de genes del DHA ha sido descrito en el tejido hepático (Clarke y Jump, 1994) y adiposo (Raelot y col. 1997). Los genes particularmente regulados por el DHA estarían relacionados con la función de generación de energía en las neuronas, esto es con la síntesis de ATP y con el funcionamiento de la cadena respiratoria y particularmente con la expresión de las synucleinas (proteínas relacionadas con el control de la plasticidad cerebral y el aprendizaje) (George y col. 1995). Cabe destacar que más de un 50% del ATP formado por las neuronas es consumido por la Na⁺/K⁺ ATPasa, cuya función es el mantenimiento del equilibrio iónico, fundamental para la actividad eléctrica neuronal (Kitajka y col. 2002).

La suplementación con ácidos grasos n-3, particularmente con DHA, produciría una estimulación de la termogénesis al desacoplar la oxidación mitocondrial y estimular la oxidación peroxisomal de los ácidos grasos (Ikeda y col. 1998). Este efecto termogénico produciría una menor acumulación de tejido adiposo en el recién nacido, la que ha sido observada en animales de experimentación (Ide y col. 2000), y también en humanos (Couet y col. 1997).

La mayor termogénesis se debería a una estimulación por parte de los ácidos grasos n-3 en la actividad de los receptores nucleares de los proliferadores peroxisomales (PPARs), en sus diferentes isoformas (PPARa, b,g), pero particularmente del PPARa (Clarke, 2000). Este receptor se expresa principalmente en el hígado y es el factor más importante de transcripción que estimula la sobreexpresión de productos génicos relacionados con la termogénesis (Baillie y col. 1999). Este efecto podría explicar la menor tasa de ganancia de peso y menor grosor de la piel observada en lactantes alimentados con preparados suplementados con ácidos grasos n-3 (Carlson y Neuringer, 1999).

C. AGPI-CLs y crecimiento

El contenido de AA en los tejidos se ha correlacionado positivamente con el crecimiento del recién nacido, de este modo podría actuar como promotor del mismo durante la vida postnatal temprana (Koletzko y Braun, 1991; Carlson y col. 1993b). Carlson y col (1991) encontraron en recién nacidos a pre-término alimentados con preparados para lactantes suplementados con aceite de pescado, una disminución del peso a las 40 semanas de edad posparto y posteriormente durante el primer año de vida. Dicha disminución fue atribuida al desplazamiento de los tejidos del AA por el EPA procedente del aceite de pescado empleado para suplementar los preparados para lactantes (Carlson y col. 1993a). Posteriormente, Jensen y col (1997) encontraron un menor crecimiento en niños alimentados con preparados que contenían cantidades elevadas de ácido α -linolénico (C18:3n-3), relacionándose también con una reducción de los niveles de AA. Nuevos estudios usando preparados suplementados con DHA y preparados con DHA más AA en proporciones similares a las de la leche humana han demostrado que la incorporación de estos ácidos grasos no tiene efectos negativos sobre el crecimiento y el desarrollo del recién nacido (Uay y col. 1994; Uauy y Hoffman, 2000a).

4.4.2.3. AGPI-CLs durante el embarazo

Una gran parte del cerebro humano se desarrolla en el periodo prenatal; es en el último trimestre de la gestación y primeras semanas postnatales cuando se produce más incorporación de AGPI-CLs al sistema nervioso central como consecuencia de un incremento en la transferencia materno-fetal (revisado por Griffiths y Morse, 2006).

Es conocido que para los prematuros, y posiblemente para los recién nacidos a término, la conversión de los ácidos grasos esenciales, LA (n-6) y ALA (n-3), a sus precursores, AA para la serie n-6 y, EPA y DHA para la serie n-3, es limitada, no siendo suficiente para cubrir sus necesidades (Chambaz y col. 1985; Gibson y Makrides, 1998; Carlson, 2001; Minda y col. 2002). Así el feto es dependiente de los niveles de DHA que le llegan a través de la circulación materna, ya sean procedentes de la dieta de la madre, de la reserva de los tejidos o de la síntesis a partir del ALA.

Debido a que el desarrollo del feto depende de los niveles de AGPI-CLs de su madre (Crawford, 2000; Al y col. 1996), los niveles de estos ácidos grasos podrían no ser óptimos en aquellas madres con unas condiciones dietéticas no correctas (Al y col. 1995; Hornstra y col. 2000).

En el año 2003, el Congreso de la “Sociedad internacional del estudio de ácidos grasos y lípidos” (ISSFAL, International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids) recomendó una ingesta de DHA para mujeres embarazadas y mujeres en periodo de lactancia de 300 mg/día. Sin embargo, en un estudio reciente realizado en mujeres embarazadas de Canadá se encontró que su ingesta era inferior a los 160 ± 20 mg de DHA/día, siendo de este modo una necesidad la suplementación de DHA durante el embarazo (Innis y Elias, 2003). Igualmente, esta ingesta reducida se produce en otros países como Australia (60-70 mg/día), y EEUU, donde la ingesta es inferior a los 54 mg/día. En el mismo estudio se encontró que la ingesta de AA en mujeres de Canadá era de 121 ± 8 mg/día. Si tenemos en cuenta que durante el tercer trimestre de gestación el feto acumula aproximadamente unos 250-400 mg de AA/día, la baja ingesta

encontrada de AA, junto a los efectos negativos de estos bajos niveles en el feto, sugieren también la suplementación de AA durante el embarazo (revisado por Griffiths y Morse, 2006).

Los recién nacidos a pre-término suelen experimentar problemas en el desarrollo neuronal (Wolke y col. 1994; Wolke y col. 1999), y a pesar de que no se ha comprobado una relación causal con sus bajos niveles de AGPI-CLs al nacer, los resultados de estudios de intervenciones postnatales sugieren una posible asociación, ya que generalmente estos estudios muestran que una suplementación temprana con AGPI-CLs mejora el desarrollo neuronal (Simmer y col. 2000; SanGiovanni y col. 2000, O'Connor y col. 2001). En recién nacidos a término, que tienen niveles más elevados de AGPI-CLs que los prematuros al nacer (Foreman-van Drongelen, 1995), la suplementación con AGPI-CLs ha mejorado también el desarrollo neuronal, a pesar de que los resultados son menos convincentes que los estudios en prematuros (SanGiovanni y col. 2000; Agostoni y col. 1995; Willatts y col. 1998; Birch y col. 2000).

Por todo ello, es importante que las mujeres embarazadas tengan unos buenos niveles de AGPI-CLs, así su dieta podría ser suplementada directamente con AGPI-CLs (DHA y/o AA) o con sus precursores (LA y/o ALA).

- **Suplementación durante el embarazo con DHA**

Se ha relacionado una deficiencia de DHA en la dieta de la madre con una incidencia en tener niños con bajo peso al nacer, así como un menor diámetro de la circunferencia de la cabeza del recién nacido (Hornstra, 2000) y un menor peso de la placenta (Crawford, 2000). De la misma manera, los niveles de DHA presentes en el recién nacido podrían tener efectos a largo plazo en el niño.

Un estudio realizado en casi 9000 mujeres de Dinamarca mostró que las mujeres que consumían pescado una vez por semana durante las primeras 16 semanas de embarazo presentaban 3.6 veces menos riesgo de tener un recién nacido de bajo peso (menos de 2500 g) o prematuros (nacidos antes de los 259 días) que las mujeres que nunca consumían pescado (Olsen y col. 2002). Szajewska y col. (2006) observaron que la suplementación durante el embarazo con AGPI-CLs n-3 alargaba el estado de embarazo en una media de 1.6 días e incrementaba el diámetro de la circunferencia de la cabeza de los recién nacidos en 0.26 cm.

Connor y col. (1996) realizaron un estudio en 31 mujeres embarazadas, 15 de las cuales fueron suplementadas con 2.6 gramos /día de ácidos grasos n-3 procedentes del pescado (1.01 gramos DHA/día) desde la semana 26 hasta la semana 35 del embarazo, y el resto de mujeres se utilizaron como control. La suplementación del aceite de pescado fue una combinación entre latas de sardinas y cápsulas de aceite de pescado. El nivel de DHA en los eritrocitos de las mujeres suplementadas con el aceite de pescado incrementó desde el 4.69% (del total de ácidos grasos) a la semana 26 hasta el 7.15% al final de la semana 34, decreciendo después, como es de esperar hasta 5.97% en el parto. Los niveles de DHA en los niños de las madres suplementadas fueron 35.2% más elevados que los presentes en los niños de las madres que eran control (Connor y col. 1996).

No existe una única conclusión sobre los efectos que produce sobre el niño la suplementación de la dieta de la madre con AGPI-CLs durante el embarazo, existen estudios que no observaron relación entre la suplementación y una mejora en la agudeza visual o en el desarrollo cognitivo del niño (Malcom y col. 2003), y estudios en los que la suplementación con DHA se relaciona con una mejora en la agudeza visual en niños de 3.5 años de edad (Williams y col. 2001), y con una mejor puntuación en el test de inteligencia de Kaufman a los cuatro años de edad (Colombo y col. 2004).

En un estudio realizado por Helland y col. (2003) se analizó el efecto de la suplementación con AGPI-CLs a mujeres durante el periodo de embarazo y lactancia sobre el desarrollo mental del niño a los 4 años de edad mediante el test de Kaufman. La suplementación se realizó con un aceite de hígado de bacalao (1183mg/10ml de DHA, 803mg/10ml de EPA y 2494mg/10ml de AGPI-CLs n-3 totales) o con un aceite de maíz (4747 mg/10ml de ácido linoleico, 92mg/10ml de ácido α -linolénico). Los resultados mostraron que los niños de 4 años cuyas madres habían tomado el aceite de hígado de bacalao presentaban una mejor puntuación en el test del desarrollo neuronal que aquellos niños cuyas madres habían tomado el aceite de maíz. De este modo, diferentes estudios han mostrado mejor agudeza visual y mejor función intelectual en niños con aportes adecuados de DHA y AA (revisado por Griffiths y Morse, 2006).

La suplementación materna con aceite de pescado ha sido utilizada con éxito para incrementar la disponibilidad fetal de DHA y los niveles de DHA en el neonato. Sin embargo, un incremento en los niveles de DHA de las mujeres embarazadas debido a una ingesta de aceite de pescado, produjo en algunos estudios una disminución en los niveles de AA en los niños (Van Houwelingen y col. 1995; Helland y col. 2001;). Este hecho no es muy deseable, ya que el AA es también importante para el niño, siendo el segundo AGPI-CL más abundante en el tejido neuronal (Lauritzen y col. 2001).

- **Suplementación durante el embarazo con ácido α -linolénico (ALA).
Conversión de ALA a EPA y DHA**

El ácido α -linolénico (ALA) es un ácido graso esencial en la dieta de los humanos, y es más consumido que el EPA y el DHA. El DHA, como ya se ha visto en el apartado 4.4.2.2 de esta tesis, es importante en la agudeza visual y en la capacidad de aprendizaje del niño.

El EPA y el DHA pueden ser aportados directamente por la dieta o pueden ser sintetizados en el organismo a partir de su precursor, el ALA. Los efectos favorables del ALA asociados con sus ácidos grasos derivados, dependerán de la eficacia de esta conversión. El camino de conversión del ALA a EPA y DHA ha estado identificado en ratas (Voss y col. 1991; revisado por Sprecher, 2000), en primates no humanos (Sheaff y col. 1996; Su y col. 1999a, b) y en neonatos humanos (Carnielli y col. 1996; Salem y col. 1996; Sauerwald y col. 1997).

El hombre y los mamíferos en general, con la excepción de los felinos, tienen la capacidad de sintetizar DHA a partir del precursor ALA (Edmond y col. 1996). De esta forma, el ALA tras sucesivas desaturaciones y elongaciones se transforma en EPA y posteriormente en DHA. Sin embargo, recientemente se ha observado que el sistema de síntesis no es un proceso directo ya que el EPA se transforma tras dos elongaciones en el ácido graso C24:5n-3 que se transforma a través de la Δ -6-desaturasa en un ácido

graso de 24 carbonos y 6 dobles enlaces (C24:6n-3), el cual es transferido desde el retículo endoplasmático a los peroxisomas donde sufre un proceso denominado retroconversión (Sprecher y col. 1995).

Así, la conversión de ALA a EPA y DHA implica diferentes etapas secuenciales (**figura 1**):

- **Δ -6-desaturación**: el ALA (C18:3 n-3) se transforma en ácido estearidónico (C18:4n-3).
- **Elongación**: el ácido estearidónico se elonga a C20:4 n-3.
- **Δ -5-desaturación**: el C20:4 n-3 gana otro doble enlace y pasa a EPA (C20:5 n-3)
- **Elongación**: el EPA se transforma en el ácido docosapentaenoico (DPA, C22:5n-3).
- **Elongación**: el DPA se elonga a C24:5n-3
- **Δ -6-desaturación**: el C24:5n-3 pasa a C24:6n-3.
- **β -oxidación peroxisomal**: el C24:6n-3 se transforma en DHA (C22:6n-3).

En la **figura 1** se observa que existe una competencia entre el ALA y el ácido C24:5n-3 por la Δ 6-desaturasa. Además, el otro ácido graso esencial, ácido linoleico (C18:2n-6, LA), es también sustrato de la Δ 6-desaturasa. De este modo, la síntesis de DHA a partir del ALA, podría verse afectada por esta competencia.

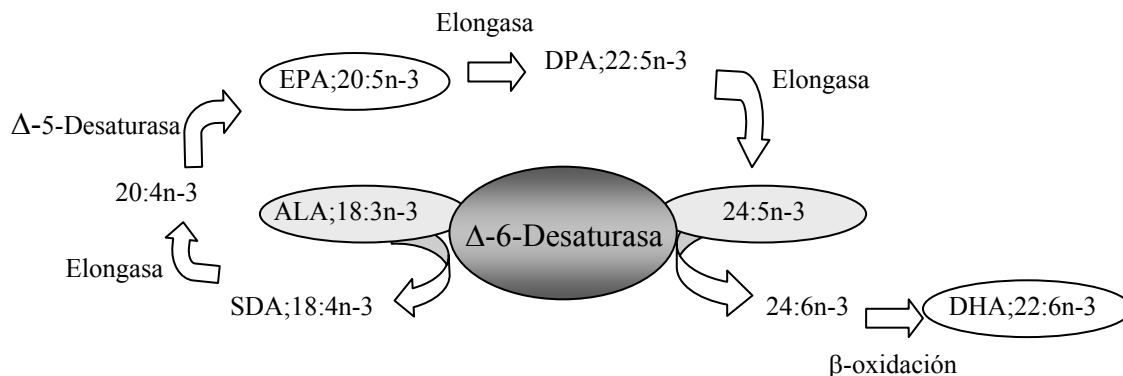


Figura 1. Esquema representativo de la influencia del ALA en la formación de DHA a través de dos procesos: uno como precursor y otro como competidor (adaptado de Cleland y col. 2005). DHA, ácido docosahexaenoico; EPA, ácido eicosapentaenoico; SDA, ácido estearidónico.

Blank y col (2002) realizaron un estudio en cochinillos y observaron que la ingesta de ALA tenía una relación directa en eritrocitos, hígado y cerebro sobre los niveles de EPA, pero no sobre los niveles de DHA. De hecho, la concentración de DHA en los tejidos incrementaba cuando la ingesta de ALA empezaba a disminuir a partir de un cierto nivel. Los autores atribuyeron este fenómeno a la competencia entre el metabolismo del ALA y el C24:5n-3 por la Δ -6-desaturasa en la síntesis de DHA. Posteriormente, estos resultados también fueron apoyados por Cleland y col (2005) en

un estudio en ratas en el que se analizaron dietas con diferente contenido en ALA y observaron que como más rica en ALA era la dieta, más EPA se producía, y al contrario, la dieta más rica en ALA se relacionó con la menor cantidad de DHA.

En estudios realizados en humanos, Burdge y Wootton (2002), usando una técnica de isótopos, observaron que las mujeres en edad de ser madres (sobre los 28 años) tenían una mayor capacidad de convertir el ALA a DHA comparado con los hombres en una edad similar (Burdge y col. 2002). Basándose en sus análisis del área bajo la curva en plasma de los ácidos grasos marcados con ^{13}C , encontraron que había aproximadamente un 9% de conversión del ^{13}C -ALA a ^{13}C -DHA en las mujeres. En cambio, para los hombres no encontraron esta conversión a DHA (0% de conversión). Estos resultados concuerdan con los estudios dónde los incrementos en la dieta de ALA, en hombres, no se asociaron con un incremento de la concentración de DHA en plasma y/o en las membrana celulares (revisado por Gerster, 1998). Así los hombres tienen menor capacidad de conversión del ALA a sus AGPI-CLs n-3, sugiriendo que la demanda de estos AGPI-CLs n-3 en los tejidos del hombre es modesta, y puede ser cubierta con la dieta o con la baja conversión a partir del ALA. Sin embargo, los hombres con una dieta pobre en DHA tendrían más riesgos de presentar unos niveles marginales de DHA que no las mujeres (Burdge, revisión 2004).

Por el contrario, Pawlosky y col (2001) usando procedimientos similares con isótopos, encontraron que tanto los hombres como las mujeres eran capaces de convertir el éster etílico del C18:3n-3 $^2\text{H}_5$ -marcado en los ácidos grasos poliinsaturados C₂₀ y C₂₂, incluyendo el $^2\text{H}_5$ -DHA. Además, encontraron que tanto las mujeres como los hombres eran capaces de sintetizar DHA a partir del ALA cuando subsistían con diferentes dietas (basadas en carne o en pescado, o *ad libitum*) que tenían diferentes concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (Pawlosky y col. 2003).

Las necesidades de DHA por parte del feto y del neonato pueden ser cubiertas a través de las reservas de DHA del tejido adiposo de la madre, que pueden ser movilizadas durante la gestación (Al y col. 1997; Herrera, 2000) y/o por la síntesis de DHA desde sus precursores durante el embarazo. Se sabe que la acumulación de depósitos de grasa es una de las características durante el embarazo, tanto en mujeres (Hyttén y Leitch, 1971; Villar y col. 1992) como en ratas (López-Luna y col. 1986, 1991).

Se ha observado que las mujeres embarazadas presentan una mayor capacidad de conversión de ALA a DHA comparado con aquellas mujeres no embarazadas debido que dicha conversión podría estar regulada por la acción de hormonas sexuales cubriendo las demandas del feto y neonato por estos ácidos grasos (Neuringer y col. 1984; Burdge y col. 1994; Burdge y Posttle, 1994; Posttle y col. 1995; Otto y col. 1997, 1999). Se conoce que los niveles de DHA y su síntesis a partir del ALA pueden estar regulados por estrógenos (Burdge y Wotton, 2002; Giltay y col. 2004b). Así mismo, el incremento de los niveles de estrógenos en plasma que se produce durante el embarazo podría ser importante en una mayor síntesis de DHA a partir de su precursor, y en consecuencia en la suplementación de dicho DHA al feto.

4.4.2.4. AGPI-CLs durante la lactancia

Durante el último semestre de gestación, el AA y el DHA son transferidos a través de la placenta desde la madre al feto y durante el primer año de desarrollo postnatal, son transferidos al niño a través de la leche materna (Martínez, 1992b). El AA y el DHA son incorporados, retenidos y altamente concentrados en los fosfolípidos de las membranas del sistema nervioso (Svennerholm, 1968; Makrides y col. 1994, Farquharson, 1995).

La leche humana contiene más de 150 ácidos grasos diferentes, de los cuales el LA, ALA, AA y DHA y otros AGPI-CLs n-6 y n-3 constituyen entre el 15% y el 20% del total de ácidos grasos presentes. Estudios publicados en los últimos seis años muestran que la leche de mujeres con una dieta Occidental contiene un 10-17% de LA, un 0.8-1.4% de ALA, un 0.3-0.7% de AA y un 0.1-0.5% de DHA (Smith y col. 2000; Jensen y col. 2000; Helland y col. 2001; Auestad y col. 2001; Jorgensen y col. 2001; Birch y col. 2002; López-López y col. 2002). Estudios de otras zonas muestran concentraciones de DHA de 2.8% en la leche de mujeres en Zhangzi, China (Connor, 1995) y 1% de AA y 1.1% de DHA en la leche de mujeres de Japón (Nakajimo, 2000) probablemente debido a una mayor ingesta de DHA procedente del pescado comparado con los países Occidentales.

Se ha observado que a medida que van progresando los días en la lactancia, los ácidos grasos esenciales van aumentando proporcionalmente, y los AGPI-CLs, por el contrario, van disminuyendo de forma importante durante el primer mes tras el nacimiento del recién nacido, concretamente el AA decrece un 38% y el DHA se reduce a la mitad. Sin embargo esta disminución en el contenido relativo de AGPI-CLs no implica una reducción en los aportes al recién nacido puesto que al aumentar el contenido de grasa con la maduración de la leche, el total de AGPI-CLs consumidos por el lactante permanece constante. Una posible explicación a este hecho, sería que la mayor proporción de estos ácidos grasos en el calostro responde a una gran necesidad de los mismos por parte del neonato para llevar a cabo un rápido crecimiento en una época de la vida donde el volumen de leche consumido es todavía muy bajo (Aggett y col. 1991; Martínez, 1992; Koletzko, 2001). Igualmente, los niveles de los ácidos grasos de cadena larga saturados (C20:0 y C22:0) en la leche humana disminuyen en periodos de lactancia superiores a 1 año (Shehadeh y col. 2006).

Después del primer mes de lactancia hay menos cambios en la composición de ácidos grasos (Makrides y col. 1995). El porcentaje de DHA disminuye sobre un 20% desde la sexta hasta la decimosexta semana de lactancia, y a partir de aquí no se han observado cambios hasta la semana 30.

Las cantidades de DHA en los fosfolípidos del plasma de la madre están directamente relacionados con la ingesta de DHA (Fidler y col. 2000; Innis, 2003) y con la cantidad de DHA en la leche humana (Gibson, 1997; Jensen, 2000; Helland, 2001). El aporte de AGPI-CLs de la madre al recién nacido, tanto pre-término como término, es suficiente cuando recibe leche humana. El problema surge cuando el lactante debe alimentarse con los preparados convencionales, generalmente ricos en ácido linoleico, en algunos casos con aportes suficientes de ácido α -linolénico, pero pobres en DHA y AA. Numerosos estudios han mostrado como los lactantes prematuros y a término alimentados con leche humana poseen concentraciones mayores de DHA y AA en las membranas de los hematíes y en fosfolípidos plasmáticos que aquellos que recibieron

preparados convencionales (Carlson y col. 1986; DeLucchi y col. 1988; Pita y col. 1989; Koletzko y col. 1989; Kohn y col. 1990; Van Biervliet y col. 1990; Auestad y col. 1997; Bondía, 1998; Gil y col. 1998, Makrides y col. 1995b; Innis, 1996; Jensen y Heird, 2002). Aunque adicionando aceites ricos en DHA y AA a las preparadas para lactantes en cantidades aproximadas a las de la leche humana se observó una similitud de los niveles de estos dos ácidos grasos en plasma y hematíes del recién nacido que aquellos obtenidos con la alimentación materna (Makrides y col. 1995b; Auestad y col. 1997).

Los niveles de DHA en la leche materna se han reducido en un 30% en los últimos 14 años en algunos países desarrollados (Makrides, 1995c). En China y Japón, los niveles son cuatro veces superiores que aquellos encontrados en los países Occidentales. Durante la lactancia, 70-80mg de DHA al día son transferidos desde la madre al lactante a través de la leche (Makrides y Gibson, 2000). Esto podría suponer un problema para las madres con una dieta pobre en AGPI-CLs n-3. Particularmente, se han encontrado niveles bajos de DHA en mujeres vegetarianas, en mujeres que habían tenido mellizos, trillizos... y en mujeres con diversos partos poco separados en el tiempo. De aquí la importancia de la suplementación con AGPI-CLs durante el embarazo y la lactancia.

En un estudio reciente realizado por Jensen y col (2005) se analizó el efecto que producía sobre el recién nacido la suplementación de la dieta de las madres en periodo de lactancia con un aceite de algas rico en DHA (aproximadamente 200mg/día) o con un aceite vegetal (sin DHA). La suplementación se realizó durante los 4 primeros meses de lactancia y se observó un incremento de los niveles de DHA en los fosfolípidos del plasma de los recién nacidos a los cuatro meses de edad, así como un mayor índice en el desarrollo psicomotor de Bayley a los 30 meses de edad en los niños cuyas madres habían sido alimentadas durante la lactancia con el aceite rico en DHA.

4.5. Vitaminas de la leche materna

4.5.1. Vitamina E

4.5.1.1. Introducción

Bajo la denominación común de vitamina E se incluyen varios compuestos relacionados químicamente: cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. La diferencia entre ambos grupos reside en su estructura química y su grado de actividad biológica.

El grupo más importante es el de los tocoferoles, formados por el α -, β -, γ - y δ -tocoferol. Su estructura química común está constituida por un núcleo benzopirano o cromano, sustituido en la posición 2 por una cadena lateral saturada (Fernholz, 1938) (**figura 2**). El grupo hidroxilo de la posición 6 del anillo puede estar esterificado, pero debe estar libre para que el compuesto manifieste actividad vitamínica.

Sin embargo, la acilación del grupo hidroxilo en posición 6 mejora su estabilidad, por ello la mayor parte de los preparados comerciales se presentan en forma de ésteres (acetato, succinato). Estos compuestos carecen de actividad antioxidante, pero son hidrolizados en el intestino antes de su absorción, obteniéndose las formas activas.

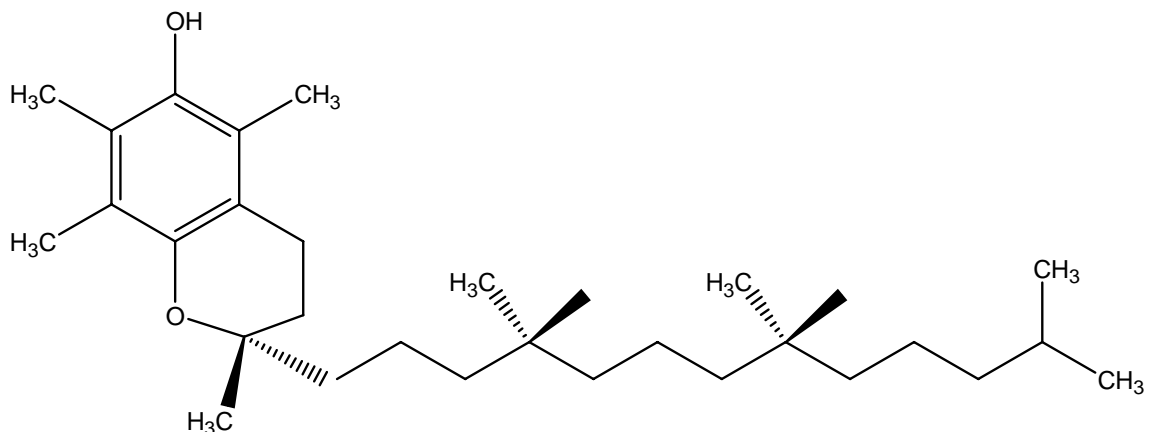


Figura 2. Estructura química del α -tocoferol.

Los diferentes tocoferoles y tocotrienoles se diferencian entre sí por el número y la posición de los diferentes grupo metilo en el anillo fenólico y en la insaturación de la cadena lateral de la molécula. El grupo fenólico permite la fijación de radicales libres, de esta propiedad se deriva su capacidad antioxidante. La cadena lateral, determina su liposolubilidad y facilita la retención de la vitamina E por las membranas biológicas (Fristma, 1983).

Los tocotrienoles (presentes en elevadas concentraciones en el aceite de palma) son en algunas ocasiones más potentes como antioxidantes que los tocoferoles. Debido a su difícil asimilación por el organismo no se encuentran prácticamente distribuidos en los tejidos, ya que son rápidamente metabolizados y eliminados del organismo. En cambio

a nivel cutáneo, los tocotrienoles tienen un nivel óptimo de absorción, siendo utilizados en cremas con vitamina E (Lester y col. 2001).

El α -tocoferol constituye aproximadamente el 90% de los tocoferoles en el tejido animal y es la forma más activa de la vitamina E. Así, las funciones asociadas a la vitamina E se atribuyen a la forma del α -tocoferol.

El α -tocoferol se conocía originalmente como d- α -tocoferol, basándose en su actividad óptica. Posteriormente fue nombrado por la "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC, la cual establece la nomenclatura de los compuestos químicos) como 2R,4'R,8'R-alpha-tocoferol (**RRR-alpha-tocoferol**), teniendo en cuenta sus tres carbonos asimétricos, uno en la posición 2 del anillo y los otros dos en las posiciones 4 y 8 de la cadena alifática. Cuando se sintetizó por primera vez el α -tocoferol, se observó que era menos activo, tenía un 74% de la actividad del RRR-alpha-tocoferol (Diplock 1985, NRC, 1989). El α -tocoferol sintético presenta una mezcla de ocho isómeros denominado **rac- α -tocoferol** (antes dl-tocoferol).

La actividad de 1 mg de acetato de rac- α -tocoferol ha sido definida como equivalente a 1 unidad internacional (UI) de vitamina E. Las equivalencias a UI de otras formas de vitamina E son mostradas en la **tabla 4**. Así, por ejemplo, 1 mg de rac- α -tocoferol equivale a 1.1 UI de vitamina E, 1 mg de acetato de RRR- α -tocoferol equivale a 1.36 UI y 1 mg de RRR- α -tocoferol equivale a 1.49 UI que además corresponde a su vez a 1 equivalente de RRR- α -tocoferol.

Tabla 4. Factores de conversión para calcular las unidades internacionales (UI) y las ingestas recomendadas de vitamina E (adaptado de Ye y Eitenmiller, 2004).

	UI/mg	mg/UI	μ mol/UI	α -Tocopherol (mg/UI)
Vitamina E natural				
RRR- α -Tocoferol	1.49	0.67	1.56	0.67
Acetato de RRR- α -Tocoferol	1.36	0.74	1.56	0.67
Succinato de RRR- α -Tocoferol	1.21	0.83	1.56	0.67
Vitamina E sintetizada				
Rac- α -Tocoferol	1.10	0.91	2.12	0.45
Acetato de rac- α -Tocoferol	1.00	1.00	2.12	0.45
Succinato de rac- α -Tocoferol	0.89	1.12	2.12	0.45

Las fuentes de alimentos más ricas en vitamina E son los aceites vegetales como el de oliva, el de girasol y el de cártamo, el germen de trigo, las nueces y otros cereales. Otros aceites como el de maíz y el de soja contienen buenos niveles de α -tocoferol, pero también contienen elevadas cantidades de γ -tocoferol, la función biológica del cual todavía no está del todo clara (Krinsky, 2003). Los niveles en sangre del γ -tocoferol son generalmente 10 veces inferiores a los de α -tocoferol. Estos bajos niveles se deben a la acción de la proteína α -tocoferol transferasa (α -TTP) en el hígado, la cual incorpora preferentemente α -tocoferol en las lipoproteínas que están circulando en la sangre (Traber, 1999) y entrega en última instancia el α -tocoferol a los diferentes tejidos del

cuerpo. Por otro lado, el hecho de encontrar más metabolitos excretados del γ -tocoferol en relación a los de α -tocoferol, sugiere que el γ -tocoferol no es tan utilizado por el organismo como lo es el α -tocoferol (Traber y col. 1998). Algunos estudios realizados *in vitro* y en animales indican que el γ -tocoferol o sus metabolitos podrían tener un papel en la protección del organismo frente a los daños producidos por los radicales libres (Christen y col. 1997; Li y col. 1999) Aún así, estas hipótesis no han sido demostradas en humanos. Recientemente la preocupación se ha centrado en el hecho de que existen estudios donde se muestra que al tomar suplementos de α -tocoferol se reducen los niveles de γ -tocoferol en sangre. A pesar de esto, no se han demostrado efectos adversos derivados de la suplementación con α -tocoferol. Los pocos estudios realizados, junto con el hecho de que la ingesta de suplementos de α -tocoferol pueda reducir los niveles en sangre de γ -tocoferol, ha hecho que sean necesarios otros estudios para determinar el papel del γ -tocoferol (Jiang y col. 2001).

Los niveles plasmáticos de vitamina E aumentan conforme progresa el embarazo. Este incremento también se encontraría asociado a la normal hiperlipidemia de la embarazada (Knight y col. 1994; Chen y col. 1996). El α -tocoferol y el γ -tocoferol plasmáticos tienen diferentes perfiles a lo largo del embarazo, lo cual es atribuible a sus diferentes respuestas a los cambios en el perfil lipídico durante el embarazo. El α -tocoferol plasmático va aumentando a lo largo de la gestación para disminuir después del parto, mientras el γ -tocoferol alcanza su mayor nivel plasmático en la mitad del embarazo para después ir disminuyendo hasta un mes después del parto (Al Senaidy, 1996).

En la leche materna madura, la vitamina E es secretada fundamentalmente como α -tocoferol (Boersma y col. 1991). Aunque la leche humana contiene todos los isómeros del tocoferol, las sustancias con actividad vitamínica distinta del α -tocoferol sólo representan alrededor del 2% de la actividad de la vitamina E de la leche materna. El contenido de dicha vitamina en la leche influye en los niveles de vitamina E de los niños lactantes. Su contenido en la leche humana es superior que el presente en la leche de vaca, y depende de muchos factores, pero fundamentalmente del estadio de la lactancia y del estado nutricional de la madre (Barry-Lawrence, 1994, Jiménez, 2001). De este modo, los niveles de vitamina E son más elevados en el calostro, sugiriendo que podrían estabilizar los abundantes AGPI-CLs presentes en esta leche debido a su actividad antioxidante (ESPGAN, 1991)

- **Ingestas recomendadas de vitamina E**

En la **tabla 5** se muestran las ingestas recomendadas de vitamina E.

Tabla 5. Ingestas recomendadas de vitamina E (adaptado de Mataix y Ochoa, 2002)

Edad	España (1994) Ingestas recomendadas (mg/día)	Edad	EEUU (1989) Ingestas recomendadas (mg/día)	OMS/FAO (1987) Ingesta diaria aceptable	Europa (1992) Ingesta de referencia
Niños		Niños			
0-5 meses	6	0-6 meses	3	0.15-2 mg/Kg	0.4 mg/g AGPI
6-12 meses	6	7-12 meses	4	0.15-2 mg/Kg	0.4 mg/g AGPI
1-3 años	6	1-3 años	6	0.15-2 mg/Kg	0.4 mg/g AGPI
4-5 años	7	4-10 años	7	0.15-2 mg/Kg	
6-9 años	8				
Mujeres		Mujeres			
16-19 años	12	11 años y más	8	0.15-2 mg/Kg	>3 mg/día
20-39 años	12				
40-49 años	12				
50-59 años	12				
Gestación	15	Gestación	10	0.15-2 mg/Kg	
Lactancia	17	Lactancia	12	0.15-2 mg/Kg	

4.5.1.2. Funciones fisiológicas de la vitamina E

- **Función antioxidante**

La principal función de la vitamina E en humanos es antioxidante. Se considera el principal antioxidante lipídico, el cual inhibe la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares (Ahmed y col. 2004a, 2004b). Es la primera línea de defensa contra la oxidación lipídica, tanto en la membrana de las células como en la de las mitocondrias. El α -tocoferol está localizado en las regiones de la membrana con AGPI-CLs (Urano y col. 1990), parece ser que estaría justo por debajo de la superficie de la membrana formando una barrera que capturaría rápidamente los radicales peróxidos (Fukusawa y col. 1993).

Los radicales libres se forman en el organismo principalmente durante el metabolismo normal y también por factores externos como el humo del tabaco y la polución. Los lípidos, que son una parte integrante de las membranas celulares, son vulnerables a ser destruidos a través de los radicales libres de la oxidación. El α -tocoferol puede interceptar estos radicales libres y actuar interrumpiendo la peroxidación lipídica en cadena (Burton y Ingold, 1989; Packer, 1993). Igualmente, protege a las macromoléculas sensibles a los oxidantes, especialmente a los AGPIs, de las membranas biológicas. Una disminución en su contenido conlleva daños estructurales y funcionales en las membranas.

La vitamina E impide la propagación de la oxidación, extinguiendo los radicales libres, no sólo de biomembranas, sino que también protege enzimas, proteínas y

moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Packer, 1991), así como a la vitamina A y a los carotenos (Sies y col. 1992).

La agresión oxidante sufrida por las membranas puede ser valorada a través de la cuantificación de los radicales formados, del consumo de oxígeno producido, de la cuantificación de los productos de degradación lipídica y a través del análisis de antioxidantes como las vitaminas C y E (Benzie, 1996).

Estudios *in vitro* en membranas eritrocitarias de adultos demuestran que en condiciones de baja demanda oxidativa, las defensas de antioxidantes fisiológicos son suficientes para combatir el estrés oxidativo, pero cuando son expuestos a un elevado estrés oxidativo, las defensas antioxidantes son insuficientes, y la peroxidación lipídica empieza a depender de la cantidad de sustrato de ácidos grasos poliinsaturados (Fraga y col. 1990).

La susceptibilidad a la peroxidación de los eritrocitos de los recién nacidos es mayor que la que presentan los eritrocitos de los adultos (Miyake y col. 1991; Van Zoeren-Grobbe y col. 1998), y esto es aún más acusado en el recién nacido a pre-término por diversos motivos (Georgeson y col. 2002; Baydas y col. 2002):

- Existe una baja transferencia placentaria de esta vitamina (Leger y col. 1998). Además la transferencia de los nutrientes liposolubles de la madre al feto aumenta significativamente durante el tercer trimestre del embarazo y en el niño prematuro se interrumpe esta transferencia normal de nutrientes, entre ellos la de los antioxidantes liposolubles.
- La maduración de los enzimas antioxidantes de los pulmones y del intestino del feto no se realiza hasta la última parte del embarazo (Ripalda y col. 1989; Crawford y col. 1995). Además, el recién nacido soporta tensiones de oxígeno aproximadamente cinco veces superiores a las que experimenta en su vida intrauterina, pero en el caso del recién nacido prematuro son diez veces superiores a ella.
- Los neonatos tienen valores más elevados de AGPI-CLs en sus membranas que los adultos y es bastante frecuente que el prematuro esté expuesto a una mayor peroxidación debido a la oxigenoterapia (Mino, 1993).

Todas estas circunstancias pueden favorecer la aparición de un exceso de radicales libres (Hanna, 2004). De aquí la importancia de la leche humana, principalmente para los prematuros, ya que ésta incrementa rápidamente las concentraciones de antioxidantes en los lactantes (Ostrea y col. 1986; Zoeren-Grobbe y col. 1993; Sommerburg y col. 2000).

Como se ha dicho anteriormente, algunos de los sistemas de defensa antioxidante no tienen la misma actividad en los eritrocitos de los adultos que en la de los recién nacidos. La actividad superóxido dismutasa no cambia excesivamente en los recién nacidos prematuros, a término y adultos, pero en cambio, la actividad glutatión peroxidasa y la actividad catalasa están reducidas en los recién nacidos comparado con los adultos (Ripalda y col. 1989). La actividad catalasa y glutatión peroxidasa en los prematuros aumenta con la edad gestacional del feto. En el cordón umbilical la

concentración de vitamina C y bilirrubina es superior a la de los adultos mientras que la concentración de grupos SH, β -caroteno y vitamina E es inferior (Lindeman y col. 1989).

Diversos autores afirman que los neonatos presentan unos valores del índice vitamina E/lípidos totales del plasma inferiores a los de sus madres o de los adultos pero dentro del rango de la normalidad (Desai y col. 1984; Martínez y col. 1981b; Kaempf y col. 1994b; Chen y col. 1996). De todos modos, el neonato en un par de semanas alcanza valores del adulto, tanto del valor en volumen de vitamina E plasmática como del valor corregido con la concentración de lípidos totales plasmáticos (Ostrea y col. 1986; Decsi y Koletzko, 1995). Los recién nacidos a pre-término necesitan mucho más tiempo para conseguir valores normales en plasma (Tanaka y col. 1988).

- **Otras funciones de la vitamina E en recién nacidos**

Existen evidencias que una baja ingesta de antioxidantes podría relacionarse con *síntomas alérgicos*. Fogarty y col (2000) observaron que existía una relación inversa entre la cantidad de vitamina E ingerida y los niveles de IgE total en plasma. Del mismo modo, también se ha relacionado una elevada ingesta de vitamina E durante el embarazo con un menor riesgo de padecer las enfermedades atópicas por parte del niño, como el asma y la dermatitis atópica, caracterizadas por un elevado estrés oxidativo (Hijazi y col. 2000; Devereux y Seaton, 2005).

Por otro lado, se ha observado que la lesión hepática es menor en los lactantes tratados oralmente con vitamina E, por ello, se propuso la suplementación con vitamina E a todos los lactantes homocigóticos o heterocigóticos para una *deficiencia en α -1-antitripsina* (Pittschieler, 1993), ya que esta deficiencia predispone a un amplio espectro de enfermedades hepáticas. Las lesiones parecen ser resultado del efecto tóxico de los productos de deshecho oxidativo provenientes de las proteasas incontroladas.

Respecto a la *hemorragia periventricular*, enfermedad que en la primera semana de vida afecta a cerca del 40% de recién nacidos prematuros con menos de 33 semanas de gestación (Jonson y col. 1985; Rosenbaum y col. 1985), los suplementos de vitamina E han conseguido disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad (Speer y col. 1984; Chiswick y col. 1990; revisado por Brion y col. 2003).

Otros estudios no pudieron demostrar que el tratamiento preventivo con vitamina E pudiera prevenir la *retinopatía de prematuridad* (Law y col. 1990; Pierce y Mukai, 1994). En cambio, en una revisión realizada por Brion y col. (2003) se observó que la suplementación de vitamina E en recién nacidos de muy bajo peso al nacer (inferior a 2500 gramos) producía una disminución del riesgo de retinopatía y de ceguera en estos niños. No obstante, de igual forma que en el caso de la hemorragia periventricular existe mucha controversia sobre si es o no mayor el riesgo que el beneficio de la administración de vitamina E, ya que una elevada suplementación de vitamina E en prematuros puede aumentar el riesgo de sepsis en estos niños (revisado por Brion y col. 2003).

El uso preventivo de la vitamina E para la anemia de prematuridad tampoco ha sido demostrado (Pinheiro y col. 1991; Berger y col. 1998). Respecto a la displasia broncopulmonar no se ha encontrado un claro efecto beneficioso de tal suplementación

(Saldhana y col. 1982; Berger y col. 1998). Un estudio realizado con niños hospitalizados por neumonía de edad entre 2 y 35 meses no pudo demostrar que la suplementación conjunta de vitamina C y E en estos niños causara algún beneficio (Mahalanabis y col. 2006).

Por todo ello, diversos autores consideran que las aplicaciones terapéuticas de la vitamina E en la infancia sólo están totalmente justificadas en episodios relacionados con la malabsorción de la vitamina y con la degeneración espinocerebelosa ligada al síndrome de deficiencia de vitamina E (Cario, 1990; Mino, 1992). Actualmente, se desaconseja la suplementación rutinaria de vitamina E por vía intravenosa a dosis altas, así como la suplementación cuando los niveles de tocoferol en suero son superiores a 3.5 mg/dl (Brion y col. 2003).

4.5.1.3. Deficiencia de vitamina E

El síndrome de la deficiencia de vitamina E ha permitido establecer claramente que ésta es un nutriente esencial para el correcto desarrollo y mantenimiento de la integridad y de la función tanto del sistema nervioso como del músculo esquelético (Muller y col. 1983; Sokol, 1988).

El intervalo normal de la concentración de vitamina E en plasma se sitúa entre 0.7 a 1.6 mg/100ml, considerándose valores por debajo de los 0.5 mg/100ml indicadores de una situación de déficit.

La deficiencia de esta vitamina en humanos, con un origen exclusivamente alimentario, es bastante rara y queda limitada a los cuadros multicarenciales propios de países subdesarrollados. La mayoría de los síntomas de esta deficiencia están relacionados con la ausencia de la protección antioxidante debido a esta vitamina, siendo uno de los signos más característicos la tendencia de los eritrocitos a la lisis. Suelen manifestarse también otros signos hematológicos, neurológicos, musculares y oftalmológicos.

Pueden asimismo aparecer deficiencias asociadas a patologías como el síndrome de malabsorción (Mino, 1993). Los estados de malabsorción más comunes que causan deficiencia de vitamina E son la colestasis hepática, la cirrosis primaria, la fibrosis quística y la insuficiencia pancreática. Existe también un fenómeno de deficiencia de vitamina E sin síndrome de malabsorción y con LDL normales asociado a una degeneración espinocerebelar, cuya patogénesis es desconocida (Kayden y col. 1989).

Otra enfermedad asociada al síndrome de deficiencia de vitamina E es la abetalipoproteinemia. Las lipoproteínas tienen una superficie constituida por una monocapa de colesterol/fosfolípidos, salpicada de apolipoproteínas (apos) y un núcleo de lípidos neutros. Los pacientes con abetalipoproteinemia, tienen una deficiencia genética en Apo B por la cual no pueden sintetizar VLDL ni en consecuencia LDL, remanentes del catabolismo de las VLDL (Kayden y Traber, 1989). De este modo, la vitamina E no puede ser transportada y en consecuencia se produce una deficiencia en vitamina E.

La prematuridad puede también asociarse a un déficit de vitamina E, debido a varios factores como la existencia de una inadecuada reserva en el cuerpo, reducida

capacidad en el transporte de la vitamina por la sangre y, posiblemente por problemas de absorción (Haga y Lunde, 1978; Haga y col. 1982; Lykkesfeldt, 1995; Thibeault, 2000). En prematuros se ha observado disminución en la capacidad fagocítica y en la actividad bactericida y quimiotáctica, presentando por lo tanto una mayor incidencia de infecciones bacterianas. También se han observado anemias hemolíticas, estructuras anormales de las células rojas, hemorragias intraventriculares, displasia broncopulmonar y fibrosis retrolental como resultado de la deficiencia en vitamina E.

En pacientes con nutrición parenteral total se requiere suplementación con vitamina E para evitar el riesgo de deficiencias.

En caso de deficiencia severa y crónica de vitamina E, se puede instaurar lentamente en el organismo un síndrome neurodegenerativo, que afecta el sistema nervioso central y periférico y que indica la importancia de esta vitamina en el mantenimiento y desarrollo de la función e integridad del sistema nervioso y músculo esquelético. Este síndrome neurodegenerativo incluye ausencia o alteración de los reflejos, ataxia y pérdidas sensoriales en brazos y piernas, observándose asimismo alteraciones neuromusculares, polineuropatía y miopatía con creatinuria, y lesiones a nivel de la retina (Mataix y Ochoa, 2002).

La deficiencia de vitamina E en animales produce un descenso en las concentraciones de AGPIs. De este modo, la vitamina E parece que puede alterar las actividades enzimáticas de la cadena de elongación y desaturación de los ácidos grasos y las relaciones entre la vitamina E y los AGPIs (Clement y Bourre, 1993).

Se suelen administrar dosis de 10-25 mg/día para niños en situaciones de malabsorción y prematuridad, ya que se ha observado que ciertas lesiones en prematuros como la retinopatía, displasia broncopulmonar y sobretodo la fibroplasia retrolental, pueden prevenirse con dosis protectoras de vitamina E (Mataix y Ochoa, 2002).

4.5.1.4. Toxicidad de la vitamina E

Comparada con otras vitaminas liposolubles, la vitamina E está clasificada como una sustancia prácticamente no tóxica, no estando del todo claro el posible riesgo por toxicidad, ya que la mayoría de investigaciones que describen síntomas adversos son bastante subjetivos, a no ser con dosis extremadamente elevadas.

En este sentido, se ha observado que grandes y prolongadas ingestas de vitamina E (superiores a 1200mg/día) parecen interferir en la absorción de las vitaminas A y K, así como dar lugar a un incremento de la creatinuria e interferir en el metabolismo de la vitamina K. De este modo, los pacientes que están tratados con anticoagulantes deben evitar ingerir grandes dosis de vitamina E para prevenir hemorragias (Igarashi, 1993), aunque las ingestas elevadas de dicha vitamina sólo afectan los índices de coagulación si existe una deficiencia de vitamina K (Kappus y Diplock, 1992).

Por otra parte, elevadas dosis intravenosas parecen aumentar el riesgo de sepsis, tanto bacteriana como fúngica, y de enterocolitis necrotizante en prematuros (Jonson

y col. 1985; Brion y col. 2003). La dosis y la vía de administración son críticas para obtener una buena eficacia sin toxicidad (Mataix y Ochoa, 2002).

No se han detectado problemas en adultos con una ingesta de 50 a 100 veces la cantidad recomendada por las Ingestas Dietéticas Recomendadas (Igarashi, 1993; Diplock, 1995; NRC, 1989), aunque la ingesta de varios gramos de vitamina en una única toma puede producir diarrea y debilidad muscular (Benzie, 1996).

4.5.1.5. Métodos de análisis de la vitamina E

- **Métodos de extracción de la vitamina E**

Al realizar la extracción de la vitamina E de una muestra es necesario evitar la oxidación de la misma. En función de la matriz de la muestra, la extracción de los tocoferoles suele realizarse por extracción directa con los disolventes adecuados o por saponificación seguida de extracción.

La **extracción directa** consiste en utilizar un disolvente capaz de penetrar en los tejidos y romper los enlaces entre las lipoproteínas para liberar así los analitos. Por otro lado, el hexano es el disolvente más utilizado para la extracción final de la vitamina E. Otros disolventes serían el éter dietílico, el acetato de etilo o diferentes mezclas. En todos los casos, es importante asegurar una completa extracción de la grasa para asegurar de este modo la extracción total de la vitamina E desde la matriz de la muestra. Esta extracción suele constar de 5 etapas:

- Adición de un reactivo para desnaturalizar las proteínas como el isopropanol, etanol, metanol o acetonitrilo.
- Adición de agua o de una solución reguladora de pH para mejorar la eficiencia del disolvente de extracción.
- Adición de la fase orgánica para extraer la vitamina E.
- Centrifugación.
- Evaporación del disolvente, si es necesario, para concentrar la vitamina E.

El método para la extracción de la vitamina E que implica **la saponificación** consiste en una hidrólisis alcalina de los glicéridos mediante la adición sobre la muestra de una solución de KOH en presencia de un antioxidante como el pirogalol o el ácido ascórbico. Posteriormente, se añade el disolvente orgánico para extraer la fracción no saponificable. Los disolventes utilizados son el hexano, mezclas de hexano y acetato de etilo, u otras mezclas de disolventes. La saponificación destruye eficientemente la matriz de la muestra, facilitando la extracción de la vitamina E (Ye y Eitenmiller, 2004).

La mayoría de aceites con elevados niveles de vitamina E pueden ser diluidos con hexano e inyectados directamente para su análisis por HPLC. En cambio, la mayoría de alimentos requieren una saponificación. En el caso de la saponificación se debe tener presente que la exposición de las muestras a las condiciones alcalinas puede reducir significativamente el contenido en tocoferoles (Rupérez y col. 1998; Gimeno y col. 2000).

Ball (1988) propuso una guía general para la saponificación de muestras biológicas que incluía 5 ml de solución acuosa de KOH al 60% (p/v) y 15 ml de etanol por cada gramo de grasa. Las temperaturas y tiempos de saponificación van desde temperatura ambiente durante 12 horas hasta los 70°C durante 30 minutos. Los parámetros como el tamaño de muestra, los volúmenes, las concentraciones de la solución alcalina, el tiempo y la temperatura pueden ser modificados para optimizar la saponificación.

- **Determinación de la vitamina E**

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es el método analítico más utilizado para la cuantificación de las vitaminas liposolubles. Tiene la capacidad de cuantificar a los analitos sin ser necesaria una derivatización de estos y puede utilizar diferentes detectores en función de sus requerimientos. Igualmente, puede confirmar la estructura de los analitos y diferenciar entre estructuras similares cuando se acopla a espectrometría de masas (**cromatografía líquida/espectrometría de masas, LC/MS**). Las dos técnicas más importantes de HPLC son la cromatografía en fase normal y en fase reversa. En la cromatografía por **fase normal** la muestra es adsorbida en la fase estacionaria polar, normalmente sílica, y desplazada de estos sitios de adsorción por la fase móvil, típicamente hexano. De este modo, los compuestos menos polares eluyen antes que los compuestos más polares. La cromatografía por **fase reversa** se caracteriza principalmente por la partición de la muestra entre una fase estacionaria hidrofóbica (C2, C8, C18 ó cadenas de fenilo unidas covalentemente a partículas de sílica) y una fase móvil más polar (metanol o acetonitrilo con pequeñas cantidades de agua). A diferencia de la fase normal, en la fase reversa los compuestos polares eluyen antes que los compuestos menos polares.

La cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa presenta ciertas ventajas respecto la fase normal:

- Menor sensibilidad a los cambios de los tiempos de retención debido a la presencia de agua.
- Mayor facilidad para eliminar los posibles contaminantes.
- Mayor estabilidad delante de pequeños cambios de la fase móvil.
- Se equilibra más rápidamente cuando se producen cambios de la fase móvil facilitando la utilización de gradientes.
- Mayor capacidad de determinar compuestos con un amplio rango de polaridades (Ye y Eitenmiller, 2004).

Sin embargo, la mayoría de estudios para la determinación de la vitamina E en alimentos utilizan la cromatografía líquida en fase normal debido a que puede separar los isómeros β - y γ -tocoferol, así como los isómeros de posición de los tocotrienoles. Además, el uso de la fase normal con sílica permite la inyección directa de hasta 2 mg de aceite, simplificando el método de análisis para grasas y aceites (Thompson y Hatina, 1979). A diferencia de la cromatografía líquida en fase normal, todos los estudios que utilizan la cromatografía en fase reversa no distinguen entre los isómeros posicionales β - y γ -tocoferol (Eitenmiller y Lee, 2004; Ye y Eitenmiller, 2004).

Tan y Brzuskiwicz (1988) compararon la cromatografía en fase normal y en fase reversa para la resolución de los 8 isómeros de la vitamina E presentes en los alimentos. Con la fase normal, los isómeros eluyeron en el siguiente orden: α -tocoferol, α -

tocotrienol, β -tocoferol, γ -tocoferol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol, δ -tocoferol y δ -tocotrienol. La cromatografía en fase reversa no pudo separar los isómeros de posición β - y γ -tocoferol, y β - y γ -tocotrienol.

La detección de los tocoferoles y tocotrienoles después de la resolución por cromatografía líquida puede ser utilizando el detector UV, de fluorescencia, electroquímico o de difusión de la luz (ELSD). El más utilizado para analizar la vitamina E es el detector de fluorescencia, el cual es más sensible y selectivo que el UV. La fluorescencia depende, en parte, de la composición de la fase móvil. Chen (1967) demostró que la polaridad de los disolventes influía en la intensidad de la fluorescencia de ciertos compuestos orgánicos (Eitenmiller y Lee, 2004).

Por otro lado, la AOAC International (Association of Official Analytical Chemists International) (2002) describe un procedimiento para la determinación de la vitamina E en preparados para lactantes utilizando cromatografía líquida (AOAC Official Method 992.03 (50.1.04) “Vitamin E Activity (All-rac- α -tocopherol) in Milk-Based Infant Formulas”). El método fue revisado en 1993 (Tanner y col. 1993) y utiliza saponificación y cromatografía en fase normal acoplada a un detector UV, la detección se realiza a 280 nm.

En la **tabla 6** se muestra una recopilación de los métodos de HPLC utilizados para la determinación de vitamina E en alimentos lácteos.

En ocasiones, puede ser interesante utilizar la **cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS)** para determinar la absorción y el depósito del RRR- α -tocoferol y del rac- α -tocoferol, así como para cuantificar el α -tocoferol. Recientemente, Melchert y Pabel (2000) mostraron que GC/MS podía utilizarse como una alternativa a la cromatografía líquida para la cuantificación de α - β - γ - y δ -tocoferol en plasma.

Tabla 6. Métodos de HPLC para la determinación de vitamina E en leche y productos lácteos.

Analito	Muestra	Preparación y extracción de la muestra	Parámetros de HPLC			Referencia
			Columna	Fase Móvil	Sistema de detección	
α -, γ -T, ésteres de retinil	leche humana	Adicionar acetato α -T (PI), diluir con EtOH. Extraer con Hex. Evaporar, Redisolver en hexano con 0.1% BHT	Rad-Pak sílica, 5 μ m	Isocrático Hex-DIPE (95:5) 2.5mL/min	UV/VIS 280nm	Chappell y col, 1986
α -, β -, γ -, δ -T	Preparado para lactantes, leche de vaca	Saponificación en caliente. Extracción con PE: DIPE (2:1). Centrifugar. Inyectar 10 μ l de la fase superior	a. Rad-Pak sílica, 5 μ m, RCM-100 b. Rad-Pak C18, 5 μ m, RCM-100	Isocrático a.Hex-IPA (99:1) b. 100% MeOH 1mL/min	Fluorescencia λ_{ex} 295 λ_{em} 330	Indyk, 1988
α -T	Preparado para lactantes	Extracción de la grasa. Saponificación en caliente. Extracción con Hex. Evaporar. Redisolver con IPA-EtOH-Hex (1:0.5:98.5)	LiChrosorb Si60 (120 \times 4.6 mm)	Isocrático IPA-EtOH-Hex (1:0.5:98.5) 1mL/min	Fluorescencia λ_{ex} 295 λ_{em} 320	Dionisi y col, 1995
retinol, α -T	Preparado para lactantes	Saponificación a temperatura ambiente. Extracción con Hex. Evaporar. Redisolver con MeOH	Spherisorb ODS-2 C18 5 μ m (250 \times 4.6 mm)	Isocrático H2O-ACN-MeOH (4:1:95)	UV/VIS 292nm	Albalá-Hurtado y col, 1997
α -, β -, γ -, δ -T, retinol	Preparado para lactantes en polvo	Saponificación en caliente	LiChrosorb RP-18 5 μ m (125 \times 4.5 mm)	Isocrático ACN 0.8mL/min	UV/VIS 292nm	Aké y col, 1998

trans-retinol, 13-cis retinol, α - β -T, β -caroteno, retinil palmitato	Leche de vaca	Saponificación en caliente. Extracción con Hex-DIPE (75:25) que contenga 0.04% BHT. Adicionar H ₂ O milli-Q. Centrifugar. Evaporar. Redisolver con Hex que contenga 0.4% de BHT.	Alltech Econosphere sílica 3 μ m (150 \times 4.6 mm)	Isocrático IPA 0.5% y HAC 0.01% en hexano 1.5 mL/min	Fluorescencia λ_{ex} 295nm λ_{em} 330nm	Hewavitharana y Van Brakel, 1998
retinol, α -T	Preparado para lactantes	Extracción de la grasa con DCM:MeOH (2:1). Saponificación a temperatura ambiente. Añadir MeOH:H ₂ O (20:40) y DEE. Evaporar. Redisolver con EtOH	Spherisorb ODS-2 C18 5 μ m (250 \times 4.6 mm)	Isocrático MeOH: H ₂ O (95:5) 1 mL/min	UV/VIS 292nm	González-Corbella, 1999
Vitamina A, E, D ₂ , D ₃ , K ₁ , acetato de retinil, palmitato de retinil, acetato de α -T, ergosterol, 7-dehidro-colesterol α -T, β -caroteno	Leche de vaca	Adicionar 5ml EtOH con 0.025% de BHT a 5ml de muestra. Extracción con Hex. Evaporar. Redisolver con MeOH.	Hypersil C18 BDS 5 μ m (150 \times 0.3 mm)	Gradiente (A) MeOH-H ₂ O (99:1) (B) MeOH-THF (70:30) 6 μ L/min	UV/VIS 280nm	Gomis y col, 2000
retinol, palmitato de retinil, vitamina D ₂ , α -, β -, γ -, δ -T, acetato de α -T	Leche en polvo, preparado para lactantes	Extracción con fluidos supercríticos	Merck LiChrospher RP-18 5 μ m (250 \times 4 mm)	Gradiente IPA-MeOH	UV/VIS tocoferoles-292nm acetato de α -T-284nm	Turner y col, 2001
α -, γ -, δ -T, acetato de α -T	Preparado para lactantes	Mezclar 1ml fórmula infantil reconstituida con 5ml CHCl ₃ /MeOH (1:2). Adicionar 1ml H ₂ O. Centrifugar. Evaporar. Redisolver con Hex.	Nova-Pak sílica 5 μ m (150 \times 4.5 mm)	Isocrático Hex/EtOAc (98:2) 1 mL/min	Fluorescencia λ_{ex} 295 λ_{em} 330	Rodrigo y col, 2002

Vitamina A, D ₃ , E	Preparado para lactantes	Saponificación en caliente. Extracción con SPE (Chromabond XTR [®]). Eluir con hex. Evaporar. Disolver con Hex/Dioxano/2-propanol (96.7:3:0.3)	Nucleosil sílica 100-5 (250 × 4.6 mm)	Isocrático Hex/Dioxano/2-propanol (96.7:3:0.3) 1.45 mL/min	UV-DAD 292nm	Heudi y col, 2004
Vitamina A, E	Preparado para lactantes	Disolver la muestra con etanol y añadir hexano. Centrifugar. Inyectar la fase orgánica.	Tracer Spherisorb ODS2 C ₁₈ 5 μm (250 × 4.6 mm)	Isocrático Metanol 100% 1 mL/min	UV-DAD tocoferoles-292nm	Rodas y col, 2004

Abreviaturas de la tabla: **BHT**: butilato de hidroxitolueno; **DAD**: detector diodo array; **DIPE**: éter isopropílico; **EtOAc**: acetato de etilo; **EtOH**: etanol; **HAc**: ácido acético; **Hex**: hexano; **IPA**: isopropanol; **ACN**: acetonitrilo; **MeOH**: metanol; **NaOAc**: acetato sódico; **PE**: éter de petróleo; **PI**: patrón interno; **SPE**: extracción en fase sólida; **T**: tocoferol; **T3**: tocotrienol, **THF**: tetrahidrofurano

4.5.2. Vitamina C

4.5.2.1. Introducción

Dentro del reino animal, ni los invertebrados ni los peces pueden sintetizar vitamina C; sin embargo la transición de los vertebrados del agua a la tierra, se asoció con la capacidad de producir esta vitamina. Los reptiles, las aves y la mayoría de los mamíferos retuvieron la capacidad de sintetizar vitamina C a lo largo de la evolución. Las cobayas y las especies más evolucionadas de mamíferos (mamíferos voladores, primates y seres humanos), no obstante, la perdieron debido a la falta de L-gulonolactona-oxidasa, la enzima final de la vía sintética desde ácido glucurónico. El hecho que esta falla genética no llevara a la extinción indica que la vitamina C abundaba en las dietas de las especies que dependían de ella (Bowman y Russell, 2003).

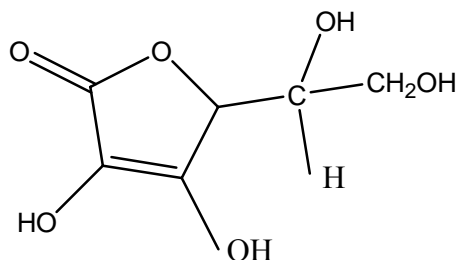
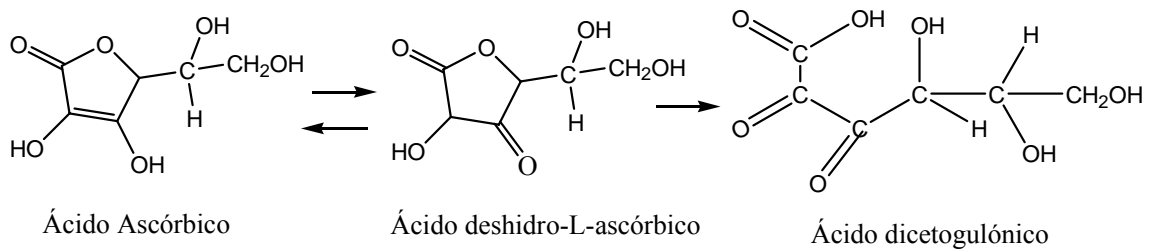


Figura 3. Estructura del Ácido Ascórbico.

La vitamina C es un excelente reductor, que incluye el **ácido L-ascórbico o ascorbato (AAS)**, el radical libre **ácido monodehidro-L-ascórbico**, formado por la pérdida de un electrón a partir del AAS, y finalmente el ácido monodehidro-L-ascórbico sufre una segunda oxidación generando el ácido **dehidro-L-ascórbico (ADA)**. Esta oxidación de AAS a ADA es reversible.

Cuando el ADA no es reciclado a AAS, es deslactonizado de forma irreversible a **ácido 2,3-dicetogulónico** (sin actividad vitamínica C) (**figura 4**), y su posterior degradación a ácido oxálico probablemente represente la principal vía catabólica del AAS. De todas formas, una vez los requerimientos de vitamina C del organismo se han cubierto, una parte importante de su exceso se excreta inalterada por la orina. Por eso, en personas que sí reciben suplementos, la proporción excretada de vitamina C no metabolizada aumenta marcadamente (Bowman y Russell, 2003). Otros productos catabólicos del AAS incluyen los ácidos L-treónico, L-xilónico y L-lixónico, y la L-xilosa.

Figura 4. Oxidación del ácido ascórbico a ácido dehidro-L-ascórbico y posterior hidratación a ácido dicetogulónico.



El AAS alimentario es transportado al interior de las células intestinales mediante un proceso dependiente de sodio y se desplaza rápidamente hacia la sangre por difusión facilitada (Bowman y Russell, 2003). La absorción también ocurre, aunque en menor medida, en la boca y en el estómago (Emadi-Konjin y col. 2005).

Como agente reductor, el AAS es rápidamente oxidado a ADA en la sangre y en los tejidos periféricos. El ADA es inestable en solución acuosa, a pH y temperatura fisiológicos, con una semivida de aproximadamente 6-20 minutos dependiendo de la concentración, pero *in vivo* parece que es rápidamente transportado al interior de las células y reducido de nuevo y de inmediato a AAS, con lo cual puede ser reutilizado. Así, el AAS es la principal forma activa, pero el ADA también presenta actividad biológica ya que puede ser fácilmente convertido a AAS en el organismo humano (Lee y Kader, 2000; Tudela y col. 2002; Graham y Annette, 1992). Así, cuando hablamos de la **vitamina C total** es importante cuantificar tanto el AAS como el ADA.

A pesar de que se distribuye ampliamente por todo el cuerpo, la vitamina C se concentra preferentemente en las glándulas adrenal y pituitaria, seguida del hígado, ojos, páncreas, riñones y cerebro, así como en los neutrófilos y linfocitos (Emadi-Konjin y col. 2005).

La vitamina C no es producida por el organismo, tiene que obtenerse por medio de la ingesta de frutas y vegetales. Algunas excelentes fuentes de vitamina C son naranjas, pimientos verdes, sandía, papaya, pomelo, fresas, kiwi, mango, tomates, coles de Bruselas, coliflor, col, y zumos de la fruta cítrica o zumos fortificados con vitamina C. Las espinacas, las patatas, la calabaza de invierno, las frambuesas y la piña son también fuentes ricas en vitamina C. La vitamina C es sensible a la luz, al aire, y al calor, así es mejor comer las frutas y verduras crudas, o poco cocidas con el objetivo de retener su máximo contenido en vitamina C.

El contenido de vitamina C en la leche humana influye en los niveles de ésta en los lactantes y depende de muchos factores, pero fundamentalmente del estadio de la lactancia y del estado nutricional de la madre. De este modo, los niveles de vitamina C son más elevados en el calostro que en la leche madura.

La vitamina C procedente de la dieta de la madre, no la procedente de suplementos, influye en los niveles de dicha vitamina en la leche materna (Emmet y Rogers, 1997; Hoppu y col, 2005). A diferencia de la vitamina C, la ingesta de vitamina E procedente

de la dieta no tiene tanta influencia en los niveles de α -tocoferol de la leche, debido principalmente a que las vitaminas liposolubles pueden ser movilizadas desde las reservas de la madre (Chappell y col. 1985; Hoppu y col. 2005).

En la leche materna madura, la vitamina C es secretada en un 91% como ácido L-ascórbico (AAS), y el resto como ácido dehidro-L-ascórbico (ADA). Este porcentaje puede variar ampliamente de una madre a otra (Buss y col. 2001).

- **Ingestas recomendadas de vitamina C**

Las ingestas recomendadas de vitamina C se muestran en la **tabla 7**.

Tabla 7. Ingestas recomendadas de vitamina C (mg/día) (adaptado de Mataix y Ochoa, 2002)

Edad	España (1994) Ingestas recomendadas	Edad	EEUU (1989) Ingestas recomendadas	OMS (1970) Ingesta de referencia	Europa (1992) Ingesta de referencia
Niños		Niños			
0-5 meses	50	0-6 meses	30	20	
6-12 meses	50	7-12 meses	35	20	20
1-3 años	55	1-3 años	40	20	25
4-5 años	55	4-6 años	45	20	25
6-9 años	55	7-10 años	45	20	30
Gestación	80	Gestación	70	50	55
Lactancia	85	Lactancia	95	50	70

- **Estabilidad de la Vitamina C**

La degradación de la vitamina C puede ser por vía anaeróbica o aeróbica:

- La **degradación anaeróbica** del AAS es relativamente insignificante en lo referente a la pérdida de dicha vitamina en los alimentos. Es más importante en los productos enlatados como las hortalizas, tomates y zumos de frutas, una vez se ha consumido el oxígeno residual. No obstante, incluso en estos productos la pérdida de AAS a través de la ruta anaeróbica progresa habitualmente de manera muy lenta, de forma que, en la mayoría de los casos, las constantes de velocidad para la degradación anaeróbica del AAS será de dos a tres órdenes de magnitud inferior que las de la reacción oxidativa.

- En la **degradación aeróbica** la oxidación del AAS puede ocurrir en una sola reacción de transferencia de dos electrones (sin detección del intermediario monodehidroascorbato) o en dos pasos, perdiendo primero un electrón y formando el radical libre ácido monodehidro-L-ascórbico y perdiendo después un segundo electrón formándose el ADA, el cual es muy inestable debido a la sensibilidad a la hidrólisis del puente de lactona. Dicha hidrólisis, que irreversiblemente forma ácido 2,3-dicetogulónico, es responsable de la pérdida de la actividad vitamina C.

El AAS es especialmente sensible a la oxidación cuando la reacción está catalizada por iones metálicos como el Cu^{2+} y el Fe^{3+} . Asimismo, el calor y la luz aceleran el proceso, y factores como el pH, la concentración de oxígeno y la actividad del agua influyen poderosamente en la velocidad de la reacción (Fennema, 2000).

Los ácidos L-isoascórbico (isómero óptico en la posición C-5, isoAAS) y D-ascórbico (isómero óptico en la posición C-4) se comportan químicamente de la misma manera que el AAS pero carecen casi por completo de actividad vitamínica C. El iso-AA puede adicionarse a los alimentos como antioxidante (Russell, 2004).

4.5.2.2. Funciones de la vitamina C

- **Función antioxidante**

Como ya se ha indicado en la sección “Función antioxidante de la vitamina E” del apartado 4.5.1.2 de esta tesis, los recién nacidos, especialmente los prematuros, son más susceptibles a la oxidación lipídica que los adultos.

El ácido ascórbico muestra la capacidad de poder sufrir consecutivamente dos procesos oxidativos monovalentes, con la formación del radical ácido monodehidro-L-ascórbico como intermediario, siendo éste un radical relativamente estable. Estas características hacen de esta vitamina un excelente antioxidante hidrosoluble donador, siendo para algunos autores el antioxidante plasmático más eficaz, de este modo:

- ◆ El AAS actúa como antioxidante, inactivando especies altamente reactivas, reacciona directamente con radicales libres en medio acuoso protegiendo las estructuras y funciones celulares. También actúa de forma sinérgica con otros antioxidantes, como el α -tocoferol, mediante la donación de un electrón al radical tocoferil, regenerando el potencial antioxidante de la vitamina E. Entre otros muchos estudios relacionados con el tema, se ha demostrado que el AAS, que se concentra especialmente en las células neuronales, las protege del estrés oxidativo, actuando tanto directamente como indirectamente por su acción combinada con el α -tocoferol.

- ◆ El AAS y la respuesta inmunitaria: numerosos estudios en humanos y animales de experimentación han demostrado que dosis farmacológicas de vitamina C estimulan significativamente la quimiotaxis de los neutrófilos. La capacidad de los leucocitos por la respuesta quimiotáctica y fagocítica depende de la integridad del sistema microtubular en su estructura interna. Los oxidantes producidos por los fagocitos por autooxidación inhiben la quimiotaxis y la fagocitosis, pero el ácido ascórbico protege su membrana del ataque oxidativo. Cuando los neutrófilos están expuestos a las bacterias, producen radicales libres de oxígeno que oxidan el AAS extracelular para formar ADA, que es transportado rápidamente dentro del neutrófilo por los transportadores GLUT1 y GLUT3 e inmediatamente reducido a AAS por la glutaredoxina. Como resultado de este reciclaje, la concentración interna de AAS aumenta 10 veces. Asimismo el glutatión, usado en la reducción del ADA a AAS, es regenerado por la glutathion reductasa y NADPH.

◆ **Metabolismo del hierro y otros metales:** el hierro de los alimentos se halla en forma hemínica (hierro de la hemoglobina y mioglobina), fácilmente absorbible, y bajo forma no hemínica, en la que la absorción depende de la composición del alimento que lo contiene. El AAS favorece la absorción del hierro por formación de un quelato con el Fe^{+2} , la forma soluble en el duodeno, pero el AAS debe ser administrado de forma concomitante con el hierro. El AAS favorece la incorporación del hierro a la ferritina, así como su movilización a partir de esta forma de reserva. El exceso de hierro intracelular es almacenado por la ferritina, cuya estabilidad aumenta por el ácido ascórbico, retardando su degradación y aumentando así la biodisponibilidad del hierro. La administración de AAS aumenta así el contenido intracelular de ferritina. Como el hierro almacenado está en equilibrio con el citoplasmático, el aumento de la concentración de hierro libre podría promover la peroxidación lipídica. El AAS presenta asimismo capacidad detoxificante de metales pesados (plomo, mercurio, cadmio, estroncio) favoreciendo su eliminación o disminuyendo su absorción intestinal (Ortiz de Apocada Ruiz, 2005)

Debido al papel antioxidante de la vitamina C, se pensó que podía tener un papel protector en el síndrome de la pre-eclampsia en mujeres embarazadas. La pre-eclampsia afecta entre un 2 y 3% de las mujeres embarazadas, y se caracteriza por una respuesta inflamatoria generalizada, en la que se activan las células vasculares y los leucocitos de la madre. Se han observado marcadores de estrés oxidativo presentes en la placenta y en la circulación materna de las mujeres afectadas, sugiriendo que la oxidación podría ser uno de los causantes. Sin embargo, en un estudio realizado en mujeres embarazadas con un elevado riesgo de padecer pre-eclampsia, no se observó diferencia en su incidencia entre embarazadas que tomaban una suplementación conjunta de vitamina C y E y aquellas tratadas con placebo (Poston y col. 2006).

- **Otras funciones de la vitamina C en recién nacidos**

Existe un elevado interés en la regulación de los antioxidantes en las enfermedades atópicas. En primer lugar, es importante conocer que en el proceso de inflamación se producen radicales libres de oxígeno, por ello los sistemas antioxidantes de defensa son tan importantes en la inflamación. Las enfermedades atópicas, en particular el asma y la dermatitis atópica, se caracterizan por un incremento del estrés oxidativo (Montuschi y col. 1999; Omata y col. 2001). En segundo lugar, existe evidencia de que una baja ingesta de antioxidantes podría asociarse a síntomas alérgicos: una baja ingesta de vitamina C se ha relacionado con las sibilancias (Bodner y col. 1999) y con una hiperreactividad bronquial (Soutar y col. 1997). Hoppu y col (2005) observaron que la ingesta materna de vitamina C procedente de la dieta, no la procedente de suplementos, determinaba la concentración de vitamina C en la leche materna. Del mismo modo, observaron que una elevada concentración de vitamina C en la leche materna se relacionaba con un menor riesgo de enfermedades atópicas en el niño.

4.5.2.3. Deficiencia de vitamina C

Los valores normales de vitamina C en plasma se encuentran entre 0.4-1.5 mg/dL, considerándose valores bajos entre 0.2-0.4 mg/dL y deficiencia cuando se sitúan por debajo de 0.2 mg/dL. La vitamina C es demandada por el feto, con lo cual la concentración en la sangre del cordón umbilical es 2-4 veces superior a la de la sangre materna. La leche materna con una concentración de vitamina C baja provoca que el aporte al niño sea insuficiente. Además, las necesidades de vitamina C estarán incrementadas en caso de que el niño tenga fiebre, infecciones, diarreas, ferropenia o proteinopenia.

La deficiencia severa de vitamina C da lugar a la aparición del escorbuto en adultos y de la denominada enfermedad de Moeller-Barlow o escorbuto infantil en niños. Esta enfermedad se podría definir como un conjunto de desórdenes cuyo resultado es mayoritariamente una disminución en la capacidad del organismo para sintetizar colágeno, lo que conduce a una fragilidad del sistema de capilares sanguíneos, dando lugar a derrames sanguíneos en la piel, membranas mucosales, órganos y músculo esquelético. Asimismo, se producen malas cicatrificaciones, anemia, somnolencia, dolores osteo-articulares, debilitación de la dentadura y los dientes pierden su sujeción y se desprenden, entre otros síntomas. En el escorbuto infantil, junto a estos síntomas y signos cutáneo-mucosos, las lesiones osteo-articulares son mucho más relevantes.

Síntomas y evolución clínica del escorbuto infantil

Los casos que aparecen en la infancia se observan sobre todo entre los 6 y 24 meses de vida. Los signos típicos del escorbuto son una coloración lívida, encías hinchadas y sangrantes, sobre todo en la arcada superior, hemorragias subcutáneas y dolores articulares. Las hemorragias petequiales son a menudo uno de los síntomas iniciales. Como prueba de la fragilidad capilar presentan un signo de Rumpel-Leede positivo. A menudo aparece en primer lugar una hipersensibilidad dolorosa al tacto, que se revela en los cuidados diarios de niño. Esta observación llevó a acuñar el término de “seudoparálisis”. En este estado, el niño mantiene las piernas en una típica posición de abducción llamada “postura de rana”. En las piernas se suele apreciar un edema y ocasionalmente se pueden palpar las hemorragias subperiósticas.

La confirmación del diagnóstico puede realizarse mediante la determinación de la vitamina C en sangre o leucocitos. El tratamiento del escorbuto se realiza mediante la administración de 100-500 mg/día de vitamina C por vía oral o parenteral, desapareciendo el cuadro sintomático al cabo de una semana (Mataix y Ochoa, 2002).

4.5.2.4. Toxicidad de la vitamina C

La toxicidad de la vitamina C es muy baja, ya que el organismo responde a una ingestión máxima aumentando la excreción renal, por lo que realmente no se puede hablar de toxicidad. Sin embargo, sí se han observado algunos efectos adversos dependientes de la dosis, como pueden ser diarreas, hinchazón abdominal, incremento de los niveles séricos y urinarios de ácido úrico (por la disminución del pH que origina), así como de la producción de ácido oxálico, lo que podría producir litiasis renal por precipitación de cristales de oxalato.

Por otra parte, algunos estudios han indicado que sobredosis de vitamina C pueden incrementar el estrés oxidativo por su capacidad en reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} , y destruir cantidades importantes de vitamina B_{12} en los alimentos, lo que conduciría a una deficiencia indirecta de esta vitamina. Otros efectos descritos por ingestas excesivas de la vitamina son hipoglucemia, infertilidad e incluso mutagénesis. Conviene, no obstante, indicar que muchos de estos efectos están basados en estudios aislados, por lo que no se puede generalizar o asumir estas consecuencias como reales (Mataix y Ochoa, 2002).

4.5.2.5. Métodos de análisis de la Vitamina C

- *Métodos de extracción de la vitamina C*

Los solventes más utilizados para la extracción de la vitamina C son reactivos ácidos, que protegen por una parte a la vitamina C de su oxidación e hidrólisis, y a su vez precipitan proteínas. La mayoría de estos reactivos incluyen los ácidos metafosfórico, tricloroacético, oxálico o perclórico solos o en combinación con otros ácidos o con alcoholes de cadena corta, como el metanol y el etanol. Entre los ácidos citados, se ha documentado que el ácido metafosfórico es el más efectivo para productos vegetales en general. Sin embargo, para productos cítricos se ha observado que es más estable la mezcla ácido oxálico-acético (Russell, 2004).

A estos reactivos de extracción se les podría adicionar un compuesto reductor para proteger al AAS de su oxidación, y para reducir el ADA a AAS, permitiendo la cuantificación de la vitamina C total. De este modo, para poder determinar la vitamina C total, el ADA debe reducirse antes de la separación cromatográfica a AAS con L-cisteína, homocisteína, o ditiotreitól (DTT) o derivatizarse con o-fenildiamina para formar un compuesto detectable fluorométricamente (Dhariwal y col. 1990; Lykkesfeldt y col. 1995; Esteve y col. 1997; Kall y Andersen, 1999; Buss y col. 2001). Entre todos los reductores, el DTT es el más utilizado. Recientemente, se ha demostrado que el hidrocloreuro de Tris (2-carboxietil)-fosfina (TCEP · HCl) ofrece mayor eficiencia en la reducción del ADA a pH bajos comparado con el DTT y mejora la retención (y la separación) de los distintos isómeros del AAS en la columna cromatográfica. La conversión del ADA en AAS en presencia de agentes reductores también es útil para facilitar el análisis de los alimentos, ya que sin estos reductores la cuantificación del ADA resulta difícil debido a su inestabilidad (Fontannaz y col. 2006).

Igualmente, se podrían adicionar compuestos quelantes de metales como EDTA, desferrioxamina o ácido dietilentriaminopentacético para proteger la oxidación producida por metales como el hierro o el cobre.

Otras precauciones a tener en cuenta para evitar la oxidación del AAS serían mantener la muestra en un ambiente con gas inerte como nitrógeno, helio o argón, realizar la extracción a bajas temperaturas, almacenar las muestras rápidamente a -70°C en el caso de no realizar la determinación analítica posteriormente a la extracción y limitar la exposición de las muestras a la luz (Russell, 2004).

- Determinación de la vitamina C

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es el método analítico más utilizado para la determinación de las vitaminas hidrosolubles en alimentos (Wimalasiri

y Wills, 1983; Esteve y col. 1995; Kall y Andersen, 1999; Buss y col. 2001; Steffensen y col. 2002; Tudela y col. 2002; Sánchez-Moreno y col. 2003), sobretodo con columna en fase reversa y fase móvil formada por distintas proporciones de acetonitrilo y metanol en presencia de soluciones reguladoras de pH (ácido cítrico, ácido acético y fosfato) o soluciones acuosas de ácido cítrico.

La forma oxidada (ADA) y reducida (AAS) de la vitamina C han sido determinadas en diferentes muestras usando el *detector UV* a 210 o 254nm. Igualmente, se ha determinado el contenido de vitamina C total en zumos de naranja y otros alimentos, después de reducir el ADA a AAS, utilizando el detector UV. La absorción máxima del ADA, 210-227nm, lo hace particularmente susceptible a interferencias de diferentes compuestos presentes en los alimentos. Además, la absorción del ADA es baja, presentando una falta de sensibilidad analítica. A diferencia del ADA, el AAS absorbe fuertemente, y tiene su máximo de absorción entre 245-270nm, en función del pH de la muestra una vez se ha realizado su extracción.

La determinación del AAS con HPLC y *detector electroquímico* también ha sido utilizada en muestras de zumo de naranja, bebidas, vegetales, carne y plasma. A pesar de que el detector electroquímico presenta unos límites de detección bajos y una elevada selectividad, el ADA y el isoADA son electroquímicamente negativos.

El método de HPLC con *detección por fluorescencia* también ha sido utilizado para la determinación de la vitamina C en alimentos, para ello es necesaria una derivatización previa del ADA y del isoADA a un derivado fluorescente. En cambio, para el AAS y el isoAAS no se conocen derivados fluorescentes. Sin embargo, ellos pueden ser detectados electroquímicamente basándose en sus capacidades reductoras (Russell, 2004).

Resumiendo, el AAS y el isoAAS se detectan directamente con un detector UV o electroquímico y sus formas oxidadas se detectan fluorométricamente después de su derivatización (Ancos y col. 2000; Ostdal y col. 2000; Nielsen y col. 2001; Kall y Andersen, 1999).

Un método de derivatización sería la reacción del ADA con o-fenilendiamina para formar un producto de condensación tricíclico muy fluorescente. Otro procedimiento alternativo a la o-fenildiamina, implica la condensación del ADA con fenilhidracina para formar un derivado detectable espectrofotométricamente, el ascorbil-bis-fenilhidracina. Aunque los dos métodos de derivatización pueden interferir con los carbonilos de los alimentos, el método de la o-fenilendiamina es más específico y sensible que el de la fenilhidracina (Fennema, 2000).

Otros métodos utilizados para la detrmnación de la vitamina C son los **métodos espectrofotométricos**, siendo los más comunes los que utilizan cobre para oxidar el AAS y el ADA hasta ácido dicetogulónico. Estos productos reaccionan con la 2,4-dinitrofenilhidrazina, para formar la bishidrazona roja, la cual en ácido sulfúrico fuerte, se redistribuye en un producto con una banda de absorción a 520 nm. Para distinguir el AAS reducido del oxidado, se omite el cobre de la mezcla reactiva, lo que permite determinar específicamente el ADA, mientras que el AAS se calcula por diferencia (Bowman y Russell, 2003).

Otro método muy utilizado es la **volumetría directa** utilizando un indicador redox como el colorante *2,6-diclorofenolindofenol*. Esta reacción se basa en la reducción del colorante 2,6-diclorofenolindofenol a su forma incolora por parte del AAS en presencia de un medio ácido. La AOAC International recomienda dos métodos volumétricos (967.21 y 985.33) basados en la reducción del 2,6-diclorofenolindofenol por el AAS, utilizado en zumos y preparados para lactantes. Sin embargo, a pesar de que es un método oficial, presenta dos limitaciones principales, una es la interferencia de otros agentes reductores presentes en los alimentos como el hierro y el cobre, y la otra limitación es la falta de respuesta del ADA, limitando su utilización en alimentos que contengan ADA. Además, extractos que tengan una elevada coloración pueden enmascarar el punto final de la volumetría. De este modo, la volumetría directa con 2,6-diclorofenolindofenol sólo se utiliza para valorar soluciones que no contengan o contengan en muy poca cantidad sustancias que puedan interferir y/o ADA.

En los casos que no pueda utilizarse el 2,6-diclorofenolindofenol como valorante para el AAS, se recomienda la *tetraclorobenzoquinona*. La valoración se realiza en presencia de EDTA que actúa tanto como indicador que como agente enmascarante ya que se asocia con iones metálicos. El punto final se detecta por la aparición de un color amarillo. A pesar de que este método no presenta interferencias del ácido cítrico, ácido oxálico, ácido tartárico, glucosa y maltosa, mezclas de AAS con tioles como cisteína, ácido o-mercaptobenzoico, ácido mercaptosuccínico y ácido 3-mercaptopropiónico no pueden ser valoradas. Otros compuestos menos utilizados para la volumetría han sido el dihidroxiindol y soluciones de yodo/bromo (Arya y col. 2000; Russell, 2004).

El isoAAS puede adicionarse a los alimentos como antioxidante, hecho que puede sobrevalorar la cantidad de vitamina C total en los alimentos. Además, en los alimentos podemos encontrar trazas de los productos derivados de la oxidación del isoAAS, ácido dehidroisoascórbico (isoADA). En todos los casos, es importante volver a mencionar que el contenido de vitamina C total es la suma únicamente de AAS y ADA (Russell, 2004). Para conocer el contenido de vitamina C de alimentos que contienen isoAAS no puede utilizarse ni el método volumétrico, ni el de condensación con reactivos carbonilo (derivatización), ya que estos métodos también responden a este compuesto nutritivamente casi inactivo (isoAAS), es decir, no discriminan entre el AAS y el isoAAS (Fennema, 2000).

Es importante conocer también la existencia de **métodos enzimáticos** basados en la utilización de enzimas específicos para determinar los niveles de AAS mediante la formación final de un compuesto detectable espectrofotométricamente (Besinger y col. 1978; Liu y col. 1982; Lee y col. 1997; Badrakhan y col. 2004). Sin embargo, estos métodos enzimáticos, no permiten determinar la vitamina C total, sino sólo el AAS, al no permitir la reducción del ADA a AAS, además son técnicas más largas y presentan una menor recuperación del ácido ascórbico (Badrakhan y col. 2004).

La mayoría de métodos validados para la determinación de la vitamina C se han realizado en muestras de zumo de diferentes frutas. Para la determinación de la vitamina C en la leche humana, se suele recurrir a modificaciones de los métodos validados que existen para preparados para lactantes. En la **tabla 8** se muestran algunos métodos de HPLC utilizados para la determinación de vitamina C en leche y alimentos lácteos.

Tabla 8. Métodos de HPLC para la determinación de vitamina C en leche y productos lácteos.

Analito	Muestra	Preparación y extracción de la muestra	Parámetros de HPLC			Referencia
			Columna	Fase Móvil	Sistema de detección	
AAS	Preparado para lactantes	Añadir MPA al 1%. Centrifugar. Diluir con MPA al 1%.	Superspher 100RP-18 5µm	Isocrático Solución tampón de potasio 0.1M pH 3.5 1ml/min	UV/VIS 245nm	Esteve y col, 1995
AAS, isoAAS	Preparado para lactantes en polvo	Total AAS+isoAAS: disolver muestra en H ₂ O. Dejar con DTT a temperatura ambiente, 30 minutos para reducir el ADA y el isoADA a AAS e isoAAS AAS+isoAAS: Mezclar una segunda alícuota de la muestra en H ₂ O. En los dos casos añadir MPA seguido de ACN. Centrifugar.	Capcell Pak NH ₂ 5µm (250 × 4.6 mm)	Isocrático ACN +25mM de hidrógenortofosfato de potasio+ácido fosfórico (800:200:7,5) 1mL/min	Electroquímico +700mV	Margolis y Schapira, 1997
AAS, ADA	Preparado para lactantes	Añadir MPA al 1% que contenga ácido oxálico al 0.5%; pH 2	Jupiter C18 5µm (250×4.6 mm) Phenomenex	Isocrático Fosfato 66mM-solución tampón de fosfato pH 4.5 con cloruro de dodeciltrimetilamonio 2.3mM y EDTA 2.5mM 1mL/min	AAS: UV/VIS 247nm ADA: derivatización y detección por fluorescencia, 350/439 (ex/em)	Kall y Andresen, 1999
Vitamina C total	Leche humana	Reducción del ADA a AAS con DTT. Dejar en reposo 15min a temperatura ambiente. Añadir ácido perclórico 0.54M	Brownlee-Spheri-5-ODS (220 ×4.6 mm)	Solución reguladora de acetato sódico 80mM y solución de EDTA 0.54mM pH 4.8 0.9mL/min	UV/VIS 245nm	Buss y col, 2001
AAS, isoAAS	Preparado para lactantes en polvo	Añadir TCE-P.HCl a la muestra.	LiChrospher RP-18 5 µm (250 × 4.6 mm)	Decilamina: ACN:solución acetato sódico (0.25mM):H ₂ O (1.6:80:100:800) pH 5.4	UV/VIS 265nm	Fontannaz y col, 2006

Abreviaturas de la tabla: AAS: ácido L-ascórbico; ACN: acetonitrilo; ADA: ácido dehidro-L-ascórbico; DTT: ditiotreitól; isoAAS: ácido L-isoascórbico; isoADA: ácido deshidroisoascórbico; MPA: ácido metafosfórico; TCA: ácido tricloroacético; TCE-P.HCl: hidrocloreuro de tris (2-carboxietil)-fosfina

4.6. Bancos de leche humana

4.6.1. Introducción

La primera descripción del funcionamiento de un “banco” de leche humana fue publicada a principios del siglo XX (Chapin, 1923; Jones, 1928; Jones, 1928; American Academy of Pediatrics Comité on Mother’s Milk, 1943). Desde entonces, los bancos de leche humana se han desarrollado con la finalidad de cubrir las necesidades de los neonatos. Actualmente, todos los bancos de Norte América funcionan de acuerdo con las directivas de la Asociación de bancos de leche de Norte América ("Human Milk Banking Association of North America", HMBANA) que surgió en 1985 (Geraghty y col. 2005). Esta asociación define a los bancos de leche humana como "un servicio establecido con el propósito de recoger, analizar, procesar, guardar y distribuir leche humana de donantes para satisfacer las necesidades específicas de aquellos niños a los cuales se les prescriba" (Updegrove, 2005).

Los objetivos de la HMBANA son:

- Desarrollar guías para los bancos de leche en Norte América
- Realizar un forum para compartir información sobre las donantes
- Proporcionar información a los médicos a cerca de la utilización de la leche de las donantes
- Animar la investigación en las características terapéuticas y nutritivas únicas de la leche humana
- Actuar como enlace entre los bancos y las agencias gubernamentales
- Facilitar la comunicación entre los diferentes bancos de leche
- Facilitar la creación de nuevos bancos de leche

En 1909, se estableció en Viena, Austria el primer banco de leche. El primero de los bancos de leche en Norte América fue establecido en Boston, Massachussets (EEUU) en 1910 (Golden y col. 2001). Aproximadamente a principios de la década de los 80 existían 30 bancos de leche en Estados Unidos, quedando actualmente 7 en Estados Unidos y 1 en Canadá. El problema surgió durante los años 80 con la aparición del virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV) que fue responsable del cierre de la mayoría de los bancos al ser posible su transmisión a través de la leche. Actualmente, existen protocolos de actuación que hacen imposible el contagio del SIDA y otras enfermedades transmisibles, facilitando de este modo la reapertura de algunos bancos y la creación de otros (Tully, 2000). No existe un único funcionamiento de los bancos de leche, sino que cada país tiene establecido un funcionamiento interno para los métodos de recolección, conservación, almacenaje y uso de la leche.

Desde julio de 2001, *la Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears* dispone del primer y único Banco de Leche Humana de España que se encarga de recoger, procesar, almacenar y dispensar este producto biológico a niños con necesidades alimenticias especiales.

En condiciones ideales, la leche de cada madre es óptima para su recién nacido, acoplándose a sus necesidades en cada momento. De este modo, la composición de la leche secretada por madres que dan lugar a prematuros presenta ciertas diferencias con la de madres de recién nacidos a término, precisamente para cubrir las deficiencias que

presenta el lactante prematuro (Schanler, 2001; da Costa y col. 2003). En el caso de que la madre no pudiese amamantar al recién nacido, existe la opción de alimentarlo con la leche humana de otras madres, o con los preparados para lactantes. De acuerdo con la reunión conjunta OMS/UNICEF, “el mejor alimento para el recién nacido que no puede ser alimentado directamente con el pecho de su madre, es la leche extraída de su propia madre (**leche materna**) o la extraída de otra madre sana (**leche humana**). Por ello es necesaria la existencia de bancos de leche humana (Wight, 2001)”.

Con los resultados de diferentes estudios se refuerza la idea de OMS/UNICEF al demostrarse que la alimentación de prematuros con calostro procedente de bancos de leche supone, para el neonato, importantes ventajas frente al uso de los preparados adaptados:

- Menor incidencia de enterocolitis necrotizante debido a que la misma composición de la leche favorece el crecimiento de una flora fecal rica en lactobacillus y pobre en patógenos (Springer 2000, McGuire y Anthony, 2003).
- Mejor desarrollo psicomotor y mejor función visual debido seguramente a la alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga presentes en el calostro humano (Springer 2000).
- Menor tasa de infecciones en prematuros debido a la presencia de factores bioactivos tales como IgA, lactoferrina, lisozima, oligosacáridos, nucleótidos, citokinas, factor de crecimiento, enzimas, antioxidantes y componentes celulares (Springer 2000).

Por otro lado, en los departamentos de neonatología de los hospitales existen unidades denominadas “**bancos de leche materna**”, donde las madres pueden extraerse la leche y conservarla para su posterior utilización, sin ser necesaria su pasteurización ya que es para sus propios niños (Erwin, 1999).

4.6.2. Posibles beneficiarios de los bancos de leche humana

Existen varias razones por las que un recién nacido puede requerir la leche de donantes:

- En el caso de parto prematuro, puede que las reservas de leche de una madre no estén lo suficientemente consolidadas como para alimentar a su bebé (Chatterton RT y col. 2000; Holditch-Davis y col. 2003; Wilson-Clay, 2006). A veces el estrés de cuidar un bebé muy enfermo evita que se instaure bien la lactancia (Springer, 2000).
- Cuando una madre da a luz a mellizos o trillizos puede ser que no tenga cantidad suficiente de leche para alimentar a todos los recién nacidos.
- Cuando la madre tome algunos medicamentos por un problema de salud como la quimioterapia para el cáncer.
- Cuando la madre tenga una infección que podría contagiar a su bebé por medio de la lactancia, como el HIV o la hepatitis.

- Niños con fallos renales (Anderson y Arnold, 1993; Geraghty y col. 2005) debido a la mayor carga renal de los preparados para lactantes.
- Niños con dificultad para desarrollarse debido a un déficit de AGPI-CL (Arnold, 1995; Geraghty y col. 2005).
- Niños con alergias severas, desordenes metabólicos o inmunodeficiencias (Geraghty y col. 2005).
- Niños post-quirúrgicos o post-enterocolitis necrotizante (Springer, 2000).
- Niños con intolerancia a los preparados (Springer, 2000).
- Niños con anomalías anatómicas de la boca y vías respiratorias superiores, por ejemplo dientes congénitos, alteraciones de la boca y vías respiratorias superiores, como rinitis obstructiva, estomatitis, etc
- Niños con aversión al pecho, principalmente como consecuencia del mal sabor de la leche materna debido a ciertos componentes de los alimentos ingeridos por parte de la madre
- Muerte de la madre.

Por todo ello, los principales beneficiarios de la leche humana son los niños prematuros debido a su inmadurez tanto gastrointestinal, metabólica como inmunológica (Geraghty y col. 2005). Las ventajas que proporciona la leche humana en los niños prematuros son mejoras a nivel digestivo y de absorción de nutrientes, incremento de las defensas y mejor desarrollo neuronal. Las ventajas serán aún mayores si el recién nacido es capaz de tomar leche de la propia madre, ya sea directamente o mediante el uso de biberones previa extracción de la leche en el caso que el prematuro no pueda succionar por sí mismo.

Se ha observado que en la leche de madres con niños prematuros, la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga después del primer mes de lactancia no disminuye, hecho que sí sucede en la leche de madres con recién nacidos a término, y cuya explicación más probable sea una necesidad durante más tiempo de estos ácidos grasos debido a sus propiedades estructurales (Koletzko y Rodríguez Palmero, 1999). Igualmente, la leche producida por madres con lactantes prematuros contienen cantidades significativamente superiores de IgA, lisozima, interferón y lactoferrina que la leche de madres con recién nacidos a término, constituyendo un apoyo defensivo para el recién nacido contra las infecciones (Arnold y Larson 1993; da Costa y col. 2003; Koenig y col. 2005).

En determinadas ocasiones, la leche de donantes se prescribe para niños mayores o para adultos con desórdenes crónicos y agudos. De este modo, ha sido utilizada con éxito para el tratamiento de transplantados de hígado con bajos niveles de IgA. Estudios realizados en estos pacientes han mostrado una mayor supervivencia y una menor morbilidad cuando los niveles de IgA son normales, y una mayor mortalidad cuando los niveles son bajos. El tratamiento a seguir para aumentar y mantener los niveles de IgA

en sangre en los pacientes con transplante de hígado, a los que además se les protege de infecciones entéricas, son pequeñas cantidades diarias de leche humana vía oral antes y después de la intervención (Merhav y col. 1995; Arnold, 1998).

La leche humana también se ha utilizado con éxito en el tratamiento de otras patologías en adultos como la conjuntivitis hemorrágica (HMBNA 2000) y problemas gastrointestinales (Wiggins y col. 1998). Igualmente, como efecto paliativo en pacientes con cáncer (Radetsky, 1999).

4.6.3. Selección de las donantes

El hecho de que una mujer sea donante puede ser porque tenga más leche de la que requiere su propio hijo o que estimule la extracción de su leche con una bomba de extracción láctea. La madre lactante de un niño fallecido también podría contribuir con su leche (Updegrave, 2005).

En Norte América y Brasil las donaciones no son remuneradas, la leche ni se compra ni se vende, por el contrario en Dinamarca y Suecia las donantes reciben una paga variable por litro de leche apta para su tratamiento y conservación. En la mayoría de hospitales la leche es administrada como si de un medicamento más se tratase, sin suponer un coste adicional. Sin embargo, en Suecia, es gratuito el uso para alimentar a recién nacidos prematuros y niños enfermos hospitalizados, pero deja de serlo si su uso es para pacientes externos no hospitalizados que bajo prescripción deban continuar la terapia con leche humana. El precio de venta se incrementa si no se trata de un particular sino de otro hospital el que requiere la leche (Arnold, 1999).

En los bancos de leche de Norte América se contabilizaron un total de 938 donantes en el 2003 (M. Tagge, personal communication, January 2, 2005). Éstas siguieron las recomendaciones de la guía de la HMBANA que es muy similar a la pauta seguida por las donantes del banco de sangre humano (American Association of Blood Banks, 1997). Estas guías, basadas en investigaciones científicas, incorporan información sobre la transmisión de virus y bacterias a través de los fluidos corporales, la transferencia de medicamentos y productos herbáceos a través de la leche, y el riesgo de diferentes enfermedades.

Las donantes han de cumplir una serie de requisitos, que serán diferentes en función del banco de leche que se trate. Si seguimos con el ejemplo de los bancos de Norte América según las normas de la HMBANA para ser donante hay que cumplir una serie de requisitos:

- La madre y el recién nacido han de estar sanos.
- La donante debe mantenerse en un buen estado de salud e ingerir una dieta bien equilibrada durante el período de donación.
- La donante no debe tomar medicamentos.
- Se debe realizar una evaluación de posibles enfermedades y un control de consumo de drogas a la donante.
- La donante debe conocer las técnicas adecuadas de recolección y almacenaje, así como las actividades de riesgo que pueden conllevar contraer enfermedades que las excluirían del programa.

Los criterios de exclusión de una donante son definidos por la HMBANA:

- Un uso regular de medicación (diferente da los medicamentos aceptados, citados previamente) o de productos herbáceos.
- Mujeres tratadas con fármacos por vía sistémica.
- Mujeres sometidas a una transfusión en los últimos 12 meses.
- Mujeres sometidas a un transplante en los últimos 12 meses.
- Mujeres que hayan tenido contacto con agujas infectadas en los últimos 12 meses (pinchazos accidentales, tatuajes, piercings,...) o que hayan mantenido en los 12 últimos meses relaciones sexuales con personas infectadas.
- Consumidoras regulares de más de 60 g de licor o equivalentes en 24h.
- Vegetarianas estrictas que no suplementen su dieta con vitaminas.
- Consumidoras de drogas ilegales.
- Consumidoras de productos con nicotina.
- Mujeres que hayan mantenido en los 12 últimos meses relaciones sexuales con posibles portadores de HIV, HTLV o hepatitis, o que hayan utilizado agujas para la administración de drogas.
- Mujeres que estuvieron más de 3 meses en Inglaterra entre 1980 y 1996.

Todas las donantes serán sometidas a pruebas serológicas para HIV, HTLV, hepatitis C, hepatitis B y sífilis en el periodo máximo de 6 meses antes de la donación (Balmer y Williams, 1995; Bernareck y Ericsson, 1989, HMBANA, 2000).

4.7. Métodos de conservación de la leche humana

4.7.1. Pasteurización

La leche humana protege a los recién nacidos de ciertas infecciones al presentar anticuerpos específicos como son la IgA, IgG y IgM, un efecto bactericida de la lactoferrina y lisozima, un efecto específico de la κ -caseína contra *Helicobacter pylori*, y un efecto antivírico y antiprototzo de los ácidos grasos libres y monoglicéridos producidos por la lipólisis de los triglicéridos de la leche (Hamosh, 1998; Newman, 1995; Tully y col. 2001).

A pesar de esto, es necesaria la pasteurización de la leche humana en los bancos de leche como seguridad contra la transmisión de ciertos virus patógenos. El procedimiento de pasteurización aceptado por la HMBANA con la aprobación de la FDA (Federal Drug Administration) consiste en introducir la leche humana en un recipiente de vidrio bien cerrado y sumergirlo en un baño de agua, precalentado en agitación, durante 30 minutos a una temperatura como mínima de 56°C (HMBANA, 1996).

Actualmente, las pasteurizaciones más utilizadas en los bancos de leche humana se efectúan con un método lento a 62.5°C durante 30 minutos (conocida como Holder Pasteurization) o con un método rápido a 100°C durante 5 minutos según la Asociación de bancos de leche de Norte América (Resto y col. 2001; HMBANA, 2005), la Asociación de bancos de leche del Reino Unido (Royal College of Pediatrics and Child Health and United Kingdom Association for Milk Banking, 1999) y según los protocolos de otros bancos como los de Brasil. Dichas pasteurizaciones eliminan el HIV (Orloff, 1993), el HTLV-1 (Yamato y col. 1986) y el CMV (Welsh y col. 1979; Friis y Andersen, 1982), así como bacterias contaminantes comunes (Wills y col. 1982).

En cambio el método de pasteurización más usado para la leche de vaca consiste en someter la muestra a una elevada temperatura durante poco tiempo: 70°C durante 15 segundos. Si este tratamiento se aplica a la leche humana, se producen mínimas pérdidas de factores inmunológicos (Jensen, 1995a) y vitaminas (Goldblum y col. 1984). Sin embargo, es un método que no puede utilizarse en los bancos de leche debido a la ausencia de equipos que puedan pasteurizar volúmenes de muestra pequeños, utilizados para la pasteurización de la leche humana (Jensen, 1995a).

Como ejemplo de funcionamiento de pasteurización nos basaremos en el Banco de leche materna de Austin (Texas), que aplica los protocolos de la HMBANA (Wilson-Clay, 2006). Realizando un análisis microbiológico antes de la pasteurización. Si con este análisis se observa crecimiento de ciertas bacterias como *Staphylococcus aureus* y algunas especies de bacillus, la muestra se descarta y no se sigue con su pasteurización, ya que dichos microorganismos podrían producir una endotoxina o enterotoxina, resistente al calor, que podría causar problemas gastrointestinales al neonato (Novak y col. 2000; Updegrove, 2005). Una segunda muestra procedente de la leche descongelada antes de pasteurizar es sometida a un análisis nutricional. Este análisis no es un requerimiento de la guía de HMBANA, pero se realiza por el amplio nivel de nutrientes de la leche, especialmente los relacionados con la grasa (Agostoni y col. 2001). Posteriormente a la pasteurización se realiza un segundo cultivo debido a que existen bacterias resistentes a la temperatura, como las esporas de ciertas especies bacillus.

Efecto de la pasteurización sobre diferentes fracciones de la leche humana

A continuación estudiaremos el efecto de la pasteurización a 62.5°C durante 30 minutos sobre diferentes factores de la leche humana:

◆ *Función inmunoprotectiva de la leche*

Una de las desventajas de la pasteurización es la destrucción de las células B y T de la leche (Liebhaber, 1977; Lawrence, 1999). Los linfocitos B incrementan los anticuerpos dirigidos contra patógenos específicos a los que la madre ha sido expuesta, y los linfocitos T atacan a las células infectadas y activan sistemas de defensa inmune. A pesar de esta pérdida de linfocitos B y T, existen otros compuestos protectores que son afectados mínimamente o incluso no afectados por la pasteurización (**tabla 9**) (Tully y col. 2001).

Las IgA y IgAs, que constituyen la mayor parte de los anticuerpos en la leche humana, mantienen su actividad respecto la leche fresca entre un 67% y un 100% después de su pasteurización (Liebhaber y col. 1977; Ford y col. 1977; Evans y col. 1978), reduciéndose tal actividad hasta un 38-65% en muestras de calostro pasteurizado (Koenig y col. 2005). El estudio realizado por Koenig y col (2005) demostró que la actividad de estas inmunoglobulinas en muestras de calostro pasteurizado respecto al calostro fresco era de un 65% en aquellas mujeres con periodos de gestación inferiores a 32 semanas, de un 44% en mujeres con un periodo de gestación entre 32 y 36 semanas, y de un 38% en mujeres con periodo de gestación de más o igual a 37 semanas.

Igualmente, la actividad de la lisozima después de la pasteurización de la leche madura fue de un 75% aproximadamente respecto la actividad de la leche fresca (Ford y col. 1977; Evans y col. 1978). Esta actividad fue todavía inferior en muestras de calostro pasteurizado (25% de la actividad de la leche fresca) (Koenig y col. 2005).

En referencia a la capacidad de transportar hierro por parte de la lactoferrina, se sabe que su actividad también disminuye después de la pasteurización, llegando a ser entre el 27% y el 43% de la actividad que presenta en la leche fresca, esta actividad estaría en función del pH de la muestra de leche (Ford y col. 1977; Bjorksten y col. 1980; May, 1994; Koenig y col. 2005).

Como resultado de la reducción de los factores de defensa de la leche humana debido a la pasteurización, los posibles microorganismos que puedan contaminar la leche crecerán más rápido en una leche pasteurizada que en una leche fresca (Ford y col. 1977; Bjorksten y col. 1980). De este modo, la leche pasteurizada tiene que utilizarse cuidadosamente para evitar cualquier riesgo de contaminación.

Tabla 9. Influencia de la pasteurización a 62.5°C durante 30 minutos sobre la función inmunoprotectiva de la leche (adaptado de Tully y col. 2001).

	Función	Porcentaje de actividad	Referencias
Ig A	Unión a antígenos en el tracto digestivo del neonato, impidiendo su paso hacia los tejidos	38-65	1
		67-100	2-7
IgM	Anticuerpos específicos contra patógenos a los que la madre ha sido expuesta	0	3-4, 6-8
IgG	Anticuerpos específicos contra patógenos a los que la madre ha sido expuesta	66-70	3-4, 6-7, 9
Lactoferrina (capacidad transportadora de hierro)	Bacteriostático. Transporta hierro requerido por el crecimiento de ciertas bacterias	27-43	2, 4, 7-10
Lisozima	Ataca la pared celular de algunas bacterias y las destruye	25	1
		75	8-9
Lipoprotein lipasa	Responsable en parte de la lipólisis de los triglicéridos de la leche para dar ácidos grasos libres y monoglicéridos	0	11-12
Lipasa estimulada por sales biliares	Responsable en parte de la lipólisis de los triglicéridos de la leche para dar ácidos grasos libres y monoglicéridos	0	11-12
Monoglicéridos producidos por la lipólisis de los triglicéridos de la leche	Altera la cubierta de algunos virus y protozoos y los destruye	100	13-15
Ácidos grasos libres producidos por la lipólisis de los triglicéridos de la leche	Altera la cubierta de algunos virus y protozoos y los destruye	100	13-15

Referencias de la tabla: (1): Koenig y col. 2005; (2): Wills y col. 1982; (3): Reynolds y col. 1982; (4): Sann y col. 1983; (5): Newman, 1995; (6): Liebhaber y col. 1977; (7): Ogundele, 2000; (8): Ford y col. 1977; (9): Evans y col. 1978; (10): May, 1984; (11): Stein y col. 1986; (12): Henderson y col. 1998; (13): Lepri y col. 1977; (14): Henderson y col. 1998; (15): Fidler y col. 1998.

◆ *Fracción grasa*

Además de la función inmunoprotectora, la leche humana es una fuente rica en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CLs), incluyendo los dos ácidos grasos esenciales, el ácido linoleico y el ácido α -linolénico, y los ácidos docosahexaenoico y araquidónico, de gran importancia para el recién nacido. Wardell y col. (1981) observaron que durante la pasteurización, el ácido α -linolénico disminuyó significativamente en un 22%, y el ácido linoleico en un 5%.

Sin embargo, otros estudios más recientes muestran que los niveles de los AGPI-CLs no se alteran con la pasteurización (Lepri y col. 1977; Henderson y col. 1998; Fidler y col. 1998), a pesar de que existe una ligera disminución (6%) en el total de triglicéridos y un incremento de los ácidos grasos libres debido a la lipólisis (Lepri y col. 1977; Henderson y col. 1998; Fidler y col. 1998). En referencia al contenido total de grasa, se observó que no se modificaba con la pasteurización (Lepri y col. 1997; Fidler y col. 1998).

Por otro lado, las lipasas de la leche humana, la lipoprotein lipasa y la lipasa estimulada por sales biliares, son totalmente inactivadas por la pasteurización, relacionándose con una disminución en la absorción de la grasa en el intestino de los prematuros (Stein y col. 1986; Yamato y col. 1986). Sin embargo, por otro lado se encontró una lipasa lingual secretada a la parte superior de la lengua en prematuros desde la semana 26 de gestación, que juega un importante papel en la lipólisis de los triglicéridos (Hamosh y col. 1981; Fredrikzon y col. 1982).

◆ *Vitaminas*

Existen pocos estudios del efecto de la pasteurización en relación a las vitaminas de la leche humana. Grobбен y col. (1987) observaron que la pasteurización reducía significativamente la concentración de ciertas vitaminas hidrosolubles como son la vitamina C, folacin, y B₆ y, en cambio no se producían cambios significativos en los niveles de las vitaminas A, D, E, B₂ y B₁₂.

Sin embargo, existen otros estudios donde se ha observado que los niveles de vitamina A en la leche humana son reducidos en un 34% después de pasteurizar la leche a 62.5°C durante 30 minutos (Góes y col. 2002; Ribeiro y col. 2005).

◆ *Minerales*

De la misma manera que para las vitaminas, para los minerales también existen pocos estudios en referencia a la pasteurización. Se sabe que se reducen los niveles de selenio (Alaejos y Romero, 1995), y se altera la distribución de zinc en las fracciones de la leche humana, contribuyendo a disminuir la disponibilidad de este zinc (Góes y col. 2002). En un estudio reciente realizado con muestras de calostro, se observó que la pasteurización a 62.5°C durante 30 minutos disminuía en un 13-15%, 5-9% y 3% los niveles de hierro, cobre y zinc, respectivamente. A pesar de esta reducción, las concentraciones de estos tres elementos presentes en el calostro pasteurizado, eran todavía adecuadas para cubrir las necesidades nutricionales del recién nacido en el periodo de lactancia (Da Costa y col. 2003).

4.7.2. Otros métodos de conservación de la leche humana

4.7.2.1. Conservación de la leche materna en el ámbito doméstico y en los hospitales

En los países desarrollados hay mujeres que después de tener a sus hijos e incorporarse de nuevo al trabajo quieren seguir alimentando a sus hijos exclusivamente con la leche materna (Olowe y col. 1987; O'Gara y col. 1994). Estas madres tienen la opción de conservar su leche a temperatura ambiente (25°C), en el refrigerador (4°C) o en el congelador (-20°C), ya sea en casa o en el trabajo. Lo mismo se produce con la conservación de la leche en las unidades de neonatos de los hospitales, donde las madres que no pueden alimentar directamente a sus recién nacidos, se extraen la leche y la conservan para alimentarlos posteriormente.

En ambas situaciones el mejor método de conservación sería la refrigeración, siempre que se trate de periodos de tiempo cortos. La refrigeración presenta ciertas ventajas respecto a la conservación a temperatura ambiente como sería que el crecimiento bacteriano es inferior (Lawrence, 1999). Igualmente, presenta ventajas respecto a la congelación, como evitar el recalentamiento que podría acompañar a la descongelación (Ogundele, 2000).

En referencia a la capacidad bacteriostática de la leche frente a bacterias de distintas especies inoculadas artificialmente se sabe que esta capacidad es superior en la leche fresca refrigerada y en la leche congelada a -70°C, mientras que se muestra inferior en muestras congeladas a -20°C después de sólo 1 mes de conservación a dicha temperatura (Ogundele, 2000). Además se conoce que la presencia de enterotoxinas, enzimas bacterianas y aminas reactivas es poco probable a la temperatura de refrigeración ya que la mayoría de bacterias son metabolitamente inactivadas a esta temperatura, y los otros sistemas bactericidas de la leche actúan contra cualquier posible crecimiento bacteriano (Bjöksten, 1980; Liebhaber, 1977).

En relación a los efectos que tiene la refrigeración de la leche materna sobre los principales microorganismos patógenos de la misma, se conoce que las concentraciones de *S. aureus*, *E. coli* y *Streptococo β hemolítico* disminuyen de forma significativa en las muestras refrigeradas durante 8 días (Arnold y Larson, 1993; Pardou y col. 1994; Koletzko y Rodriguez-Palmero, 1999)

Igualmente, se conoce que la capacidad para prevenir infecciones de la mucosa epitelial en neonatos (Schroten y col. 1992) es mayor en muestras de calostro durante los 3 primeros días de su refrigeración comparado con muestras congeladas a -20°C (Ogundele, 2000).

En otro estudio se analizó la capacidad antioxidante de la leche humana refrigerada y de la congelada a -20°C, y se observó que esta capacidad disminuía en las dos temperaturas de conservación, siendo esta disminución mayor en las muestras congeladas. Concretamente la capacidad antioxidante de una muestra congelada a -20°C durante 48 horas era equivalente a la muestra refrigerada durante 7 días (Hanna y col. 2004). Por el contrario, Miranda y col. (2004) encontraron que la oxidación lipídica de la leche materna era mayor en las muestras refrigeradas durante 24 horas que en aquellas muestras congeladas a -20°C durante 10 días

La gran parte de recomendaciones existentes sobre la conservación de la leche están en función de los aspectos microbiológicos y inmunológicos, poco se conoce del efecto sobre otros componentes de la leche. Hasta el momento las recomendaciones para conservar la leche materna en las unidades neonatales y en el ámbito familiar puede variar entre: la nevera desde 24-48 horas (Biancuzzo, 1999) hasta 3-5 días (Lawrence y Lawrence, 1999) y hasta un máximo de 8 días (La Leche League International, 1998; HMBANA, 2006); y en el congelador a -18°C , desde los 3 hasta los 12 meses (Biancuzzo, 1999; Lawrence y Lawrence, 1999; La Leche League International, 1998; HMBANA, 2006).

Asimismo, existen otras recomendaciones para la conservación de la leche basadas en citas bibliográficas que revisan principalmente el estado microbiológico de la leche: a temperatura ambiente desde 4 horas (Hamosh y col. 1997) hasta 8 horas (Lawrence, 1999; Ogundele, 1999, 2000); en nevera ($4-6^{\circ}\text{C}$) desde 24 horas (Ogundele, 1999) hasta un máximo de 48-72 horas (Bjöksten y col. 1980; Knoop y col. 1985; Deodhar y Joshi, 1991; Ogundele, 2000, 2002, Igumbor y col. 2000; Lawrence, 2001); y en temperaturas de congelación entre los -20°C y -70°C durante 15-90 días (Bitman y col. 1983; Lawrence, 2001; Buss y col. 2001; Ogundele, 2002).

Sin embargo, existen pocos y son antiguos los estudios que se basen en la estabilidad de ciertos nutrientes, por ejemplo se ha encontrado que las vitaminas A, D y E son estables hasta una semana en diferentes condiciones de conservación, y estables durante más tiempo cuando las muestras se conservan a -20°C o -70°C (Moffatt y col. 1987; Zoeren-Grobben y col. 1987). A diferencia de las anteriores vitaminas, la concentración de vitamina C disminuye significativamente a lo largo del tiempo de conservación de la leche, tanto a 4°C como a -20°C (Garza y col. 1982; Olowe y col. 1987; Buss y col. 2001; Ogundele 2002).

En el caso de utilizar métodos de conservación que supongan la congelación de la leche humana es muy importante no dañar la misma durante el proceso de descongelación. Entre los posibles métodos de descongelación, el uso de microondas está totalmente desaconsejado por reducir significativamente las propiedades inmunológicas de la leche (las IgA disminuyen hasta en un 98%, y la lisozima en un 96%). Por el contrario, los niveles de patógenos como *E.coli* incrementan especialmente a temperaturas altas. También se producen pérdidas de vitamina C. Evidentemente y por lo anteriormente expuesto se debe evitar también su uso como método para calentar la leche humana almacenada a temperatura ambiente o refrigerada (Lawrence 1999).

4.7.2.2. Conservación de la leche humana en los bancos de leche

Según Ogundele (2000) en los bancos de leche que exista la posibilidad de conservar la leche humana por ultracongelación a -70°C , será el método de elección para periodos de un mes o superiores, ya que así se evitan las pérdidas de nutrientes y enzimas derivadas de la pasteurización o de la degradación de triglicéridos como consecuencia de la congelación a -20°C (Bitman y col. 1983). Cuando la leche deba conservarse entre 3 días y 1 mes, la congelación a -20°C es la indicada, y si la conservación es durante un periodo inferior a los 3 días, las muestras pueden mantenerse en refrigeración.

Los métodos de descongelación más utilizados por los bancos de leche pueden ser: de forma rápida, a través de utilizar el baño maría con una temperatura no superior a los 37°C evitando el contacto de los puntos de cierre de los contenedores de leche con el agua del baño, o de forma lenta, dejando las muestras a temperatura ambiente. En el caso de la descongelación lenta, las muestras deben refrigerarse antes de su descongelación total (HMBANA, 2006).

Dentro de los límites recomendados, podemos encontrar diferencias en el periodo y temperatura de conservación de la leche, ya que son particulares de cada banco y depende de las normativas de cada país en función de cómo la leche va a ser en última instancia administrada.

De este modo, existen diferentes métodos de conservación según el banco de que se trate. A continuación veremos algunos ejemplos de bancos de leche en referencia a la conservación de la leche:

A. Asociación de Bancos de leche humana en Norte América (Human Milk Banking Association of North America, HMBANA)

Siguiendo con las normas de la HMBNA (2006) la leche de un banco en Norte América puede conservarse a diferentes temperaturas, en función de si se trata de leche fresca o no (**tabla 10**). Las recomendaciones de la HMBANA (2006) pueden utilizarse tanto en el ámbito familiar, en las unidades de neonatología de los hospitales como en los bancos.

Tabla 10. Conservación de la leche humana en los Bancos de leche en Norte América.

Tipo de leche humana	Temperatura ambiente	Refrigeración	Congelación
Leche fresca	≤ 4 horas a 26°C/79°F ≤ 24 horas a 15°C (enfriar con hielo) ^{1, 2, 3}	≤ 8 días a $\leq 4^\circ\text{C}$ (nevera) ⁴	≤ 12 meses a -18°C a -20°C . Para los niños prematuros o enfermos, la leche conservada durante menos de 3 meses es la óptima ^{5,6} Nota: Se ha encontrado que la conservación a -70°C durante ≥ 12 meses tienen efectos mínimos sobre la leche ^{7,8}
Leche congelada, descongelada en nevera, pero no calentada	≤ 4 horas	≤ 24 horas	No recongelar
Leche congelada, descongelada a temperatura ambiente	Uso inmediato	4 horas	No recongelar

Referencias de la tabla: (1): Pittard y col. 1985; (2): Nwankwo y col. 1988; (3): Hamosh y col. 1996; (4): Pardou y col. 1994; (5): Evans y col. 1978; (6): Friend y col. 1983; (7): Bitman y col. 1983; (8): Clark y col. 1984.

B. Bancos de leche humana del Reino Unido

Según la guía para establecimiento y operación de bancos de leche humana en el **Reino Unido**, el almacenamiento y la manipulación de la leche materna debería seguir las siguientes pautas (Baumer, 2004).

- La leche de donante debe ser refrigerada inmediatamente y puede ser almacenada en el refrigerador (4°C) hasta 24 horas
- La leche de donante no se debe almacenar en el congelador de un refrigerador doméstico más de 1 semana sino que se debe transferir a un congelador a -20°C tan pronto como sea posible
- La leche de donante se debe congelar tan pronto como sea posible para prevenir la peroxidación lipídica, remover CMV (citomegalovirus) viable y preservar el contenido de vitamina C
- La leche de donante cruda puede ser almacenada congelada a -20°C hasta 3 meses sin pérdida de enzimas esenciales (excepto lactoperoxidasa) ni de lípidos.
- La leche de donante cruda no se debe almacenar congelada más de 3 meses debido a actividad lipolítica y pérdida de vitaminas.
- La leche de donante cruda no se debe volver a congelar después de su descongelación.
- La leche descongelada no se debe dejar a temperatura ambiente más de 2 horas antes de la pasteurización
- La congelación y descongelación repetida no se recomienda debido al aumento de la hidrólisis de los lípidos
- La leche materna descongelada debe ser manipulada asépticamente
- La leche no debe ser descongelada y calentada en un horno de microondas
- Las muestras deben almacenarse a -70°C en caso de periodos largos.

B.1. Banco de leche de Southampton (Reino Unido): Hospital Princess Anne

Es necesario tener en cuenta si la leche procede de la donante (leche humana) o de la propia madre (leche materna). A modo de ejemplo se explica detalladamente el procedimiento de pasteurización del Banco de leche de Southampton.

- **Leche humana**

Las donantes se extraen la leche en sus propias casas y la almacenan con recipientes de plástico o con bolsas especiales, que deben estar fechadas y rotuladas con el nombre. En este banco, la leche de las donantes se trata de leche madura. Una vez las madres han realizado la extracción de su leche, la congelan inmediatamente en su refrigerador doméstico, mejor si es independiente de la nevera. Al mediodía, se pasa a recoger la leche humana en las casas de las diferentes donantes. La frecuencia de recogida de la leche es dos días por semana, y la transportan al hospital dentro de un recipiente isotérmico, pero sin hielo. Una vez en el banco, la leche se congela a -20°C en un refrigerador no compartido, sin hacer ningún “pool” con las otras leches. La leche sin pasteurizar puede estar como máximo 3 meses en el congelador a -20°C.

Antes de pasteurizar la leche se envía una muestra al laboratorio para su análisis microbiológico. Si esta muestra presenta alguno de los virus patógenos como HIV,

Hepatitis o CMV, ya no se procede con su pasteurización, sino que se elimina directamente.

En el Banco de Southampton, la pasteurización se realiza una vez por semana a 62.5°C durante 30 minutos. Posteriormente, se vuelve a realizar un ensayo microbiológico, y las muestras se vuelven a congelar a -20°C en el mismo refrigerador no compartido con una etiqueta identificativa conforme esta pasteurizada. La leche pasteurizada ya esta lista para ser dispensada a los neonatos, pudiendo estar en el congelador un máximo de 3 meses más.

Hace unos dos años en el Hospital Princess Anne de Southampton se realizaba un “pool” de leche de las diferentes donantes, pero posteriormente se decidió que era importante conocer para cada neonato de quien procedía la leche que tomaba, para posibles problemas que pudieran surgir.

- **Leche materna**

En el caso de las madres que no pueden amamantar directamente con el pecho a sus recién nacidos, pero sí extraerse su leche, pueden conservarla en el propio hospital o en casa en el refrigerador (4°C) durante 2 días o en congelador (-20°C) durante 6 meses.

C. Bancos de leche humana de Brasil

En Brasil se admite la leche de donantes refrigerada en nevera, si su transporte al banco se realiza en las 24 horas siguientes a la extracción, también se admiten muestras congeladas inmediatamente a -20°C por un periodo no mayor de 5 días antes de ser transportada a los bancos. Por otra parte y una vez en los bancos, la leche es siempre pasteurizada tras lo cual puede ser de nuevo refrigerada para ser utilizada en las 48 horas siguientes al tratamiento, o bien congelada a -20°C para su uso en los 6 meses siguientes al tratamiento térmico y finalmente si es pasteurizada y posteriormente liofilizada su viabilidad se alarga a un año (Gutiérrez y Guera, 1998).

D. Proyecto LACTA

En 1994 las doctoras Caroline Chantry, Desirée Pagán e Yvette Piovanetti formaron el Centro Pediátrico de Lactancia y Crianza, Inc., una organización sin fines de lucro, teniendo como una de sus metas el aumentar el número de bebés lactantes y así mejorar la salud del pueblo puertorriqueño.

Este proyecto LACTA se inició a través de un programa de lactancia dónde se pudieron poner en práctica los objetivos del Hospital Amigo del Niño que dicta UNICEF y la OMS. El programa se impulsa gracias a fondos donados por la Academia Americana de Pediatría y su programa CATCH (Community Access to Child Health).

Las recomendaciones del Proyecto LACTA (El-Mohandes y col. 1993b; Hamosh y col. 1997; Hamosh y col. 1996) para el almacenamiento son:

- Temperatura Ambiente 25°C entre 4 y 6 horas
- Nevera entre 1 y 4°C hasta 8 días
- Congelador entre 3 y 6 meses (dependiendo de la frecuencia de uso de éste). Si el congelador se mantiene a -19°C la leche puede estar almacenada hasta 12 meses.

En el proyecto LACTA también hay recomendaciones para el manejo de la leche:

- Toda leche almacenada debe tener el nombre del bebé y la fecha de extracción. La leche se puede almacenar en plástico, cristal, bolsitas especiales (no en la de las botellas desechables) y acero inoxidable.
- Se debe tratar de utilizar la leche lo más fresca posible, ya que ésta satisface mejor las necesidades del bebé. Con la leche descongelada, se debe utilizar la que lleva más tiempo congelada primero.
- La leche se debe descongelar bajo agua tibia del grifo o dentro de un envase que contenga agua tibia. Nunca en microondas. También puede descongelarse dentro de la nevera (tarda unas 12 horas aproximadamente).
- Una vez la leche está descongelada se puede refrigerar, pero no se debe volver a congelar.
- Se pueden unir las leches que hayan sido extraídas en diferentes ocasiones siempre y cuando se encuentren a la misma temperatura (ambas frías de nevera o a temperatura ambiente).
- La leche se puede tibar debajo del grifo o dentro de una taza con agua tibia. El agua no debe ser caliente, ya que esta destruye los componentes inmunológicos de la leche materna. Tampoco se debe usar el microondas, ya que este cambia los componentes de la leche, además que su uso puede provocar quemaduras en el bebé.
- Si sobra leche en la botella lo mejor es descartarla.
- Cuando se almacena o se utiliza leche materna, ésta se puede mantener en un refrigerador de uso común y no es necesario tomar ninguna precaución especial para manejarla.

5. LACTANCIA ARTIFICIAL

5.1. Introducción

La leche materna cubre todas las necesidades básicas y de crecimiento hasta el sexto mes de vida y es bacteriológicamente segura, ya que contiene proteínas e inmunoglobulinas que le confieren protección frente a infecciones entéricas (Fomon y Ziegler, 1994). Sin embargo, los recién nacidos no siempre pueden ser alimentados con la leche materna (leche de la madre) o con la leche humana (leche de donantes), en estos casos, los sustitutos de la leche materna pasan a ser esenciales para su supervivencia. Los preparados son productos que se basan en la leche de vaca o derivados de la soja, y se puede distinguir entre preparados para lactantes y preparados de continuación. Las definiciones aceptadas (Comisión of the European Communities, 1991; Comisión of the European Communities, 1996; BOE, 1998) para estos preparados son las siguientes:

◆ Los *preparados para lactantes* son “productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes desde el nacimiento hasta los primeros 4 a 6 meses de vida, que satisfagan por sí mismos las necesidades nutritivas de esta categoría de personas”.

◆ Los *preparados de continuación* son “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”.

De la misma forma, también existen unas definiciones para:

◆ *Lactantes*: los niños que tengan menos de doce meses.

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

Únicamente, deben aconsejarse los preparados para lactantes actuales en el caso de que la madre no quiera dar el pecho, o sea imposible llevar a término una lactancia materna sin riesgos para el bebé debido a enfermedades graves de la madre u otras situaciones. Otra opción prioritaria a la alimentación con preparados para lactantes es la de alimentar al recién nacido, sobretodo si es prematuro, con la leche humana de un banco de leche. De acuerdo con la reunión conjunta OMS/UNICEF, “el mejor alimento para el recién nacido que no puede ser alimentado directamente con el pecho de su madre, es la leche extraída de su propia madre o la extraída de otra madre sana (Wight, 2001).

Sin embargo, como ya hemos explicado en el apartado 4.6.2. “Posibles beneficiarios de los bancos de leche humana” de esta tesis, a pesar de los beneficios demostrados de la leche materna, hay algunas situaciones en las que no es la mejor situación para alimentar al recién nacido, ya que pueden poner a la madre o al hijo en riesgo de enfermedad.

5.2. Historia de los preparados para lactantes

En el siglo XVII, cuando las madres o las nodrizas no podían amamantar a los lactantes, se preparaban unos productos artificiales basados en mezclas de cereales con miel y agua, vino e incluso cerveza. También se preparaban productos elaborados con leche de diferentes mamíferos (vacas, cabras, ovejas, etc.).

No fue hasta el siglo XVIII que se realizó una comparación entre la leche de vaca y la leche humana, en la que se describía un mayor contenido de caseína en la leche de vaca, lo que llevó a diluir la leche de vaca administrada a los recién nacidos, aunque esto suponía una dilución del resto de nutrientes y por tanto un perjuicio para el buen desarrollo del lactante.

En el siglo XIX el alemán Von Liebig elaboró, lo que pasó a ser, la primera leche para lactantes, a él se le atribuye el término *fórmula*, debido a que el alimento tenía una composición bien definida. La fórmula estaba constituida por harina de trigo, harina de malta, leche de vaca y bicarbonato sódico. A finales del siglo, se elaboró un preparado basado en diluir a la mitad la leche de vaca y para contrarrestar la dilución de los otros componentes se añadió nata y lactosa. Estos preparados y los que aparecieron posteriormente se empezaron a comercializar durante la segunda mitad del siglo XIX (Aggett, 2001).

A comienzos del siglo XX, debido al progreso de los análisis, se empezó a conocer mejor la composición de la leche, lo que permitió elaborar preparados para lactantes que se le asemejasen más. Además, se empezaron a establecer requerimientos energéticos del lactante, recomendándose ingestas de 100-110 Kcal/Kg para los recién nacidos y de 70-80 Kcal/Kg para los niños de un año como base para elaborar los preparados para lactantes.

En los años 50 se hicieron muy populares los preparados en polvo, obtenidos a partir de la leche de vaca entera en polvo a los que se les añadía sacarosa y otros nutrientes, y sólo necesitaban la adición de agua (Cuthberston, 1999). Un estudio en 1959 de Levin y col. demostró que estos preparados eran seguros y constituían sustitutos adecuados a la leche. Aunque en realidad, debido a su composición, podían provocar diferentes problemas como obstrucción intestinal, hipercalcemia y deshidratación hipertónica (Cuthberston, 1999).

Debido a estos problemas, en los años 70, se modificaron los preparados para lactantes con la finalidad de que sus contenidos en minerales y proteínas fuesen similares a los que presentaba la leche materna. Se dejaron de fabricar los preparados basados en proteínas y grasa de leche de vaca entera, siendo sustituidos por otros que utilizaban proteínas de leche de vaca desmineralizada y desnatada mezcladas con otros componentes para obtener proporciones similares a los de la leche humana. En el último cuarto del siglo XX la composición y el uso de sustitutos de la leche comenzó a regularse y armonizarse en el ámbito nacional e internacional (American Academy of Pediatrics, 1976, FAO/WHO, 1976, Comisión de las Comunidades Europeas, 1991, 1996).

En los años 90 surgió el concepto de preparados de continuación como alternativa a los preparados para lactantes y a la leche de vaca entera, considerándolos como parte

integrante de la dieta del lactante entre los 4-6 meses y el año de edad (ESPGAN, 1991).

5.3. Modelo de composición de los preparados para lactantes

A partir de los años 70, con el conocimiento de la composición básica de la leche materna, y simultáneamente a la aparición de síndromes carenciales en niños alimentados con las leches que existían hasta el momento, se inició la escala de preparados para lactantes dirigidos a cubrir las necesidades no sólo de los principios inmediatos, sino también de otros componentes que se iban conociendo de la leche humana.

Los laboratorios que se dedican a fabricar leches para recién nacidos y lactantes intentan imitar al máximo la leche humana, siendo difícil de imitar por toda una serie de características especiales:

- Es cambiante a lo largo del día.
- Es cambiante a lo largo de la toma; la leche del final tiene mayor contenido en grasa.
 - Es cambiante a lo largo de la lactancia: mayor contenido en proteínas, agua y sales minerales los primeros días de la lactancia, de manera que se va "adaptando" a las necesidades del niño a medida que va creciendo (Ballabriga y Carrascosa, 2001).

Por ello, el primer problema vendría dado por la cronología de la secreción láctea: qué leche de madre se debería tomar como modelo, o bien si se debería producir leches para diferentes horas, o días de vida o momentos del día; este problema de momento quedó zanjado por la decisión unánime, entre los diferentes comités versados en alimentación, de establecer tres modelos de leche para la alimentación del primer año de vida: leches para prematuros, leches de inicio y leches de continuación. Además se produjeron muchos más preparados, para otras situaciones fisiológicas como las conocidas de crecimiento, o para situaciones patológicas como las antirreflujo, hidrolizadas, de soja, etc.

En la actualidad se han producido nuevos avances en los preparados para lactantes con la adición de sustancias que mejoran su estado nutritivo y/o inmunitario haciéndolos similares a la alimentación de los lactantes que siguen una alimentación con el pecho. Así, hemos visto que se añaden a los preparados factores de crecimiento, aminoácidos semiesenciales, nucleótidos, oligosacáridos, prebióticos, ácidos grasos de cadena larga e incluso cambios en la proporción de las proteínas séricas, a modo de una gran adaptación proteica, para conseguir así unos valores nutricionales similares a los de la leche humana, eterno "patrón de oro" para la alimentación del recién nacido y lactante (Martín Martínez, 2005).

El aporte correcto en grasas según ESPGAN sería de 4.4 g a 6 g por 100 kcal del total energético diario, es decir, de 2.7 a 4.1 g/100 ml; para ello en las leches infantiles se usan mayoritariamente aceites de cártamo, soja, girasol u oliva (Aggett, 2001).

El aporte medio de AGPI-CLs en niños alimentados plenamente con leche humana es sobre 100 mg/kg/día (Koletzko y col. 1992; Koletzko, 1992). En contraste, los recién nacidos alimentados con preparados no suplementados con AGPI-CLs, basados en aceite vegetal, no reciben cantidades apreciables de AA y DHA. Existen diferentes estudios que ponen en evidencia que los niveles de AA y

DHA en los fosfolípidos de los eritrocitos son más elevados en los niños alimentados con leche materna en comparación con los niños alimentados con preparados no suplementados (Carlson y col, 1986; DeLucchi y col. 1988; Pita y col. 1989; Koletzko y col, 1989; Kohn y col, 1990; Van Biervliet y col, 1990; Auestad y col, 1997; Gil y col. 1998, Makrides y col, 1995b; Innis, 1996; Jensen y Heird, 2002; Sala y col. 2006).

La aportación de AGPI-CLs en los niños alimentados con fórmulas no suplementadas depende de la síntesis endógena de estos a partir de sus precursores. El problema es que dicha síntesis es limitada en los recién nacidos, especialmente en los prematuros (Chambaz y col, 1985; Gibson y Makrides, 1998; Carlson, 2001; Minda y col, 2002). De este modo, se ha considerado necesaria la suplementación de los preparados para lactantes con AGPI-CLs a unos niveles similares a los de la leche materna (n-6AGPI-CLs, 1%; n-3AGPI-CLs, 0.5% del total de ácidos grasos) para mejorar así la alimentación de estos niños (Aggett y col. 1991; Koletzko y col. 1989; Koletzko y col. 1995; Decsi y Koletzko, 1995; Koletzko y col. 2001).

Carlson y col. (1993a) indicaron que el aporte de AGPI-CLs por la leche humana proporcionaba una diferencia del 50% en el nivel de DHA y del 15% en el nivel de AA en los fosfolípidos de los eritrocitos con respecto a niños alimentados con preparados estándar. Además, algunos trabajos han demostrado que los niños que toman leche humana presentan concentraciones significativamente superiores de DHA en los fosfolípidos de la corteza cerebral que aquellos alimentados con diferentes preparados convencionales sin AGPI-CLs añadidos (Farquharson y col. 1992; Makrides y col. 1994). Por otra parte, hay que destacar que los recién nacidos a término que ingieren un preparado para lactantes sin AGPI-CLs durante los primeros meses de vida son incapaces de alcanzar los niveles de AA y DHA plasmáticos de los alimentados al pecho durante el segundo semestre de vida (Decsi y col. 2000).

5.4. Legislación referente a los lípidos en preparados para lactantes y de continuación.

Ya en el año 1977, el Comité de Nutrición Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (ESPGAN) definió “fórmula infantil” como el alimento adecuado para sustituir total o parcialmente a la leche materna, cubriendo las necesidades nutritivas del lactante, y se eliminó el término de leches humanizadas o maternizadas (ESPGAN, 1977). En el año 1982, se establecieron las premisas que debían cumplir las leches de continuación, recomendadas para los lactantes desde los 4-6 meses, una vez iniciada la alimentación complementaria (ESPGAN, 1982).

Posteriormente, el Comité de Nutrición de la Academia Americana de Pediatría (AAP) (AAP, 1989) propuso una categoría de leches infantiles que cubría todo el primer año de vida del bebé y era semejante a la fórmula de inicio fijada por la ESPGAN.

En España, para establecer la composición de las leches infantiles, las directrices que se toman como referencia son las directivas europeas y sus respectivas trasposiciones a Reales Decretos, teniendo en cuenta las recomendaciones de la ESPGAN (ESPGAN, 1977; 1982). Las directivas europeas y los Reales Decretos son de obligatorio cumplimiento ya que forman parte de la normativa legal europea y española, respectivamente. Las recomendaciones de la ESPGAN no lo son, pero si son ampliamente reconocidas por los especialistas en nutrición infantil y son seguidas por la práctica totalidad de los productos que se encuentran en estos momentos en el mercado español.

En referencia a la legislación española, la primera referencia a las leches infantiles se realiza en el año 1976. El Real Decreto 2685/1976 referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria sobre preparados alimenticios para regímenes dietéticos o especiales recoge una larga serie de productos especiales: desde las leches infantiles hasta los alimentos para deportistas o personas de edad avanzada, la alimentación enteral, productos para algunas enfermedades como la celiaquía o diferentes intolerancias alimentarias, así como diferentes productos considerados tradicionalmente como dietéticos (RD 2685/1976). En este Reglamento, las leches infantiles se englobaron dentro del apartado de los alimentos que satisfacen las exigencias fisiológicas especiales de nutrición de las personas sanas, en el grupo de alimentos para niños lactantes, postlactantes y de corta edad.

Posteriormente, en el año 1992, se publicó el Real Decreto 1408/92 en el que se aprobó la Reglamentación Técnico-Sanitaria Específica para los preparados para lactantes y de continuación (RD 1408/92) en el que se transponía a la legislación española la Directiva 91/321/CEE del 14 de Mayo de 1991, relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación que establecía a nivel de la Unión Europea unas pautas comunes de composición y comercialización de este tipo de productos (Directiva 91/321/CEE).

Dicha normativa estableció las diferencias entre los distintos tipos de leches infantiles destinadas a la alimentación del lactante sano, con lo cual las leches especiales, destinadas a lactantes con limitaciones en la absorción y metabolismo de algunos de los nutrientes, quedaban excluidas de la misma.

La Directiva 96/4/CE de la Comisión de la Comunidad Europea del 16 de febrero de 1996 por la que se modificó la directiva 91/321/CEE relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación (Directiva 96/4/CE), se traspuso a la legislación española mediante el real decreto 72/1998, de 23 de enero, por el que se aprobó la Reglamentación Técnico-Sanitaria Específica para los preparados para lactantes y preparados de continuación. En esta normativa se establecieron nuevos niveles de algunos de los nutrientes, se regularon los preparados elaborados a partir de hidrolizados parciales de proteínas y se aceptan los nucleótidos como sustancias para enriquecer las leches infantiles. Los datos de composición se refieren a los preparados una vez listos para el consumo, o sea reconstituidos. Las regulaciones especifican que la reconstitución para obtener el producto listo para el consumo sólo deberá requerir la adición de agua.

El Real Decreto 72/1998 fue modificado por el Real Decreto 1446/2000, de 31 de julio (RD 1446/2000), que incorporó al ordenamiento jurídico español la Directiva 91/321/CEE de la Comisión, de 14 de mayo de 1991, relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación, así como las modificaciones posteriores (Directiva 99/50/CEE). El Real Decreto 1446/2000 estableció unos límites máximos admisibles de residuos de plaguicidas o metabolitos de plaguicidas que podían llevar estos preparados.

Posteriormente, el Real Decreto fue modificado por la Directiva 2003/14/CEE, de 10 de febrero de 2003, siendo actualmente el Real Decreto 500/2004, de 1 de abril (RD 500/2004) el que está en vigor. Este Real Decreto es una modificación del Real Decreto 72/1998, del 23 de enero, en la que se añaden límites máximos específicos para residuos de plaguicidas o de metabolitos de plaguicidas, así como plaguicidas que no se podrán utilizar en los productos agrícolas destinados a la elaboración de preparados para lactantes y preparados de continuación.

En la **tabla 11** se muestran las especificaciones en energía y lípidos para los preparados para lactantes y preparados de continuación.

Tabla 11. Especificaciones de la Unión Europea (1996) en energía y lípidos para los preparados para lactantes y de continuación.

	Preparados para lactantes	Preparados de continuación
ENERGÍA	60-75 kcal/100mL	60-80 kcal/100mL
LÍPIDOS		
TOTAL	4.4-6.5 g/100kcal	3.3-6.5 g/100kcal
ÁCIDO LÁURICO	Máximo 15%	Máximo 15%
ÁCIDO MIRÍSTICO	Máximo 15%	Máximo 15%
ISÓMERO TRANS	Máximo 4%	Máximo 4%
ÁCIDO ERÚCICO	Máximo 1%	Máximo 1%
ÁCIDO LINOLEICO	300-1200 mg/100kcal	Mínimo 300 mg/100kcal
ÁCIDO α -LINOLÉNICO	Mínimo 50mg/100kcal	-
LINOLEICO/ α -LINOLÉNICO	5 a 15	-
AGPI-CLs n-6	Máximo 2%	-
ÁCIDO ARAQUIDÓNICO	Máximo 1%	-
AGPI-CLs n-3	Máximo 1%	-
ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO	No superará al DHA	-

Abreviaturas de la tabla: AGPI-CLs: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

El contenido mínimo de 4.4 g y 3.3 g de grasa por 100 kcal de los preparados para lactantes y preparados de continuación aportan el 40% y el 30% de la energía, respectivamente. Se han tomado estos valores como mínimos para evitar tener que aumentar el aporte calórico de proteínas y/o hidratos de carbono, lo que provocaría un aumento de la osmolaridad y por tanto de la carga renal de solutos.

Los ácidos láurico ($C_{12:0}$) y mirístico ($C_{14:0}$) no deben superar el 15% debido a que estudios en primates muestran que estos ácidos grasos incrementan el colesterol LDL, y por tanto son aterogénicos (Hayes y col, 1991).

Los efectos de los ácidos grasos *trans* que provienen de la dieta en la infancia no están muy estudiados, pero parece ser que perjudican la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y el crecimiento del prematuro (Forysth, 1998), y además son aterogénicos, por lo cual se establece un máximo para ellos.

Del mismo modo, se establece una relación entre el ácido linoleico y el ácido α -linolénico en los preparados para lactantes debido a que ambos ácidos grasos compiten por las mismas enzimas para la elongación y desaturación de la cadena de átomos de carbono, especialmente la Δ -6-desaturasa. En la leche materna la relación linoleico/ α -linolénico oscila, generalmente, entre 5 y 10. La fijación del límite superior de esta relación tiene la función de evitar los problemas que podrían derivarse del uso de algunos aceites que presentan elevadas relaciones como, por ejemplo, el de girasol (150) o el de maíz (50) (Aggett, 2001).

La Unión europea no obliga a suplementar los preparados con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (básicamente AA y DHA), pero lo recomienda siguiendo las directrices de la ESPGAN (1991). En el caso de que se adicionen, se establecen unos máximos para el total de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3, n-6, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico.

5.5. Fuentes de AGPI-CLs utilizados para la elaboración de preparados para lactantes

Cuando la alimentación con leche materna o humana no es posible, el suministro de AGPI-CLs puede hacerse a través de los preparados para lactantes. En Europa, desde hace varios años, y a causa de las recomendaciones de varios organismos internacionales como la ESPGAN (1991), el ISSFAL (1994) y la FAO/WHO (1994), varios preparados para lactantes, especialmente los dirigidas a los recién nacidos prematuros contienen AGPI-CLs en cantidades similares a las de la leche humana procedentes de varias fuentes tales como fosfolípidos de huevo, triglicéridos purificados de pescado, algunos hongos y de algas cianofíceas.

Por el contrario, en Estados Unidos y en numerosos países bajo su influencia comercial, los preparados para lactantes no se empezaron a suplementar hasta el 2002 (Koo, 2003) debido al informe negativo de la LSRO, 1998 (Life Sciences Research Office) de la American Society of Nutritional Sciences, a pesar de que numerosos trabajos en recién nacidos a pre-término habían concluido que la suplementación con AGPI-CLs tenía efectos positivos sobre la maduración sensorial y el desarrollo neuronal.

Inicialmente se utilizaron los **aceites de pescado** altamente refinados y desodorizados. Sin embargo, existían problemas de aceptabilidad y problemas relacionados con la composición de éstos, ya que contenían además del ácido docosahexaenoico, el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3) que compite metabólicamente con el AA, con lo que disminuyó su utilización. En estudios realizados con animales alimentados con aceites de pescado, se observó que el contenido en EPA estaba incrementado en los fosfolípidos plasmáticos, en los eritrocitos, y en los triglicéridos del tejido adiposo (Swanson y Kinsell, 1986; Zúñiga y col. 1989). En el caso de estudios realizados con neonatos se encontró que preparados para lactantes enriquecidos con aceite de pescado con una concentración final de DHA entre 0.2 y 0.35% y de EPA entre 0.30 y 0.65% proporcionaban un mejor nivel de DHA en los tejidos, así como una mejora en la agudeza visual (Uauy y col, 1990; Carlson y col, 1993b; Birch y col, 1998). No obstante, en otro estudio se observó que el grupo alimentado con aceite de pescado exhibía un menor crecimiento durante el primer año de vida, lo que se correlacionó con un menor contenido en AA en la fosfatidilcolina en plasma (Carlson y col, 1992). Por eso se suelen utilizar aceites de pescado con un bajo contenido en EPA incrementando así los niveles de DHA en fosfolípidos de eritrocitos sin afectar a los niveles de AA (Lapillone y col, 2000).

No obstante, usando estos aceites de pescado bajos en EPA durante 4 meses, los niveles de DHA son similares a los de los niños alimentados con leche materna, pero en cambio, también se produce un descenso importante en los niveles de AA en eritrocitos (Lapillone y col. 2000).

En la actualidad existen dos formas principales de suplementación con DHA: como triglicéridos ricos en DHA (sobre 40%) obtenidos de microalgas de cultivo, o como fosfolípidos (6% de DHA) obtenidos de la yema de huevos de gallina (Valenzuela y Nieto, 2003a).

Los **fosfolípidos de huevo** también conocidos como lecitina, siendo el nombre genérico para la fosfatidilcolina, se extraen de la yema del huevo, y tienen la ventaja de aportar simultáneamente ácidos grasos de las series n-6 y n-3. La suplementación directa con AGPI-CLs en forma de fosfolípidos permite la mejora del contenido en AGPI-CLs en los tejidos corporales (Agotoni y col. 1994; Chirouze y col. 1994; Kohn y col. 1994; Bondía y col. 1998), de la absorción de grasa (Morgan y col. 1998) y la mejora de las funciones mentales y de la agudeza visual en animales (Carlson y col. 1996; Carrié y col. 2000c; Lim y Suzuki, 1999).

Dentro de las **microalgas de cultivo** encontramos el aceite DHASCO[®], formado por triglicéridos que contienen cantidades elevadas de DHA (aproximadamente el 40% del total de ácidos grasos). Este aceite es sintetizado por la microalga *Crypthecodinium cohnii*.

A parte, encontramos el aceite ARASCO[®] sintetizado por un proceso de fermentación llevado a cabo por el **microhongo** del suelo *Mortierella alpina* (Koskelo y col. 1997). Éste es también un aceite compuesto por triglicéridos, pero con el AA como ácido graso mayoritario. Ambos aceites han superado de forma satisfactoria las pruebas de toxicidad aguda (Boswell y col. 1996), subcrónica y de neurotoxicidad (Koskelo y col. 1997). La adición combinada de ambos aceites en los preparados para lactantes se ha mostrado eficaz para incrementar la concentración tisular de AGPI-CLs en ratas (Yeh y col. 1998) y en humanos (Innis y Hansen, 1996).

Otra modalidad más reciente como posible producto para suplementar con DHA es en forma de **monoglicérido** que sólo contiene DHA como ácido graso y se encuentra en una gran proporción en la posición sn-2 (central) del glicerol, ya que esta posición es de más alta biodisponibilidad (Valenzuela y col. 2002). Estos monoglicéridos, formados mediante procedimientos biotecnológicos que aprovechan la especificidad de lipasas de origen animal y/o vegetal, pueden contener DHA o AA, y pueden ser fácilmente adicionados a diferentes productos con excelentes resultados de digestibilidad y valor biológico (Valenzuela y Nieto, 1994).

Ensayos comparativos de biodisponibilidad

En un estudio realizado por Amate y col. (2001a,b) los AGPI-CLs procedentes de aceites de pescado y los sintetizados a partir de microorganismos presentan ciertas ventajas respecto el aporte en forma de fosfolípidos, como la ausencia de determinados componentes como el grupo fosfato o la colina, los cuales pueden interactuar en el proceso de absorción. Pero, por otro lado hay evidencias que la colina en la forma de un fosfolípido es mucho más biodisponible para los tejidos, incluido el cerebro, que la colina como tal (Thiès y col. 1992; Croset y col. 2000), por lo cual un fosfolípido que además de poseer DHA aporte colina podría ser una excelente fuente de ambos nutrientes en las etapas más críticas del desarrollo cerebral. La colina es necesaria para la síntesis en el cerebro de acetilcolina (Zeisel, 2000), un neurotransmisor importante para la funcionalidad de segmentos cerebrales involucrados en la memoria y aprendizaje como es el caso del hipocampo y el cerebelo (Craciunescu y col. 2003).

La principal ventaja relacionada con los aceites de pescado y microorganismos es que la aportación de los AGPI-CLs es en forma de triglicéridos, siendo la principal forma en la que se encuentran en la leche humana.

No obstante, Valenzuela y col. (2003c) encontraron que los mejores resultados se obtienen con los fosfolípidos y el monoglicérido, ya que los triglicéridos de microorganismos tenían menor biodisponibilidad que los anteriores. Como ya hemos dicho anteriormente, otro factor a favor de los fosfolípidos era que contenían colina.

Otro antecedente importante es que la 2-acil-lisofosfatidil colina, una glicerofosfolina que posee un ácido graso esterificado en la posición sn-2 del glicerol, es eficientemente transportada por la albúmina plasmática y puede traspasar la barrera hematoencefálica con gran facilidad (Thiès y col. 1994). Esto significa que una fosfaditilcolina que contenga DHA como sustituyente en la posición sn-2 del glicerol, al ser hidrolizada por las fosfolipasas A1 intestinales, se convertirá en una sn-2 DHA-lisofosfatidilcolina, molécula que sería de alta biodisponibilidad para el cerebro (Lagarde y col. 2001).

En un estudio reciente, realizado por Sala-Vila y col (2004) se estudiaron los niveles de AGPI-CLs en los fosfolípidos del plasma de niños alimentados con tres dietas diferentes: leche materna, preparados para lactantes suplementados con fosfolípidos de huevo (AA, 1.9%; DHA, 1.25%), y preparados para lactantes suplementados con triglicéridos procedentes de los aceites DHASCO[®] (40-45% del peso como DHA) y ARASCO[®] (38-44% del peso como AA). Los resultados mostraron que no había diferencias en la biodisponibilidad de los AGPI-CL entre los niños alimentados con el preparado suplementado con fosfolípidos y el suplementado con triglicéridos. No obstante, se encontraron diferencias entre los niños con lactancia materna y aquellos alimentados con los preparados. De este modo, concluyeron que la incorporación de AGPI-CLs en los fosfolípidos del plasma depende más de la composición de ácidos grasos de la dieta que no de la fuente (fosfolípidos o triglicéridos) de dichos AGPI-CLs.

Las fuentes de AGPI-CLs a través de triglicéridos presentan ciertas diferencias respecto a la distribución intramolecular de los ácidos grasos en los triglicéridos de la leche materna. La localización preferente de los AGPI-CLs en la leche materna es en las posiciones sn-2 y sn-3 de los triglicéridos. En un estudio se manifestó que el aceite de atún presentaba cerca de un 50% del total de DHA y más del 20% del total de AA localizado en la posición sn-2 del triglicérido. Y en los aceites de microorganismos, el AA tenía la misma distribución para las tres posiciones del triglicérido (Amate y col. 1999).

La distribución de los ácidos grasos es muy importante en los recién nacidos, sobretodo en los prematuros, ya que estos presentan dificultades para la hidrólisis de los AGPI-CLs localizados en las posiciones exteriores de los triglicéridos. Esto es debido a una baja secreción de la lipasa pancreática y a un hígado inmaduro que no puede aportar suficientes sales biliares para solubilizar los lípidos ingeridos.

En la leche humana, la distribución mayoritaria de los AGPI-CLs en las posiciones sn-2 y sn-3 de los triglicéridos, junto a la acción de la lipasa estimulada por sales biliares (BSSL) presente en esta leche, no se producen problemas en la digestión

de la grasa (Martín y col. 1993). La BSSL es capaz de actuar en cualquiera de las tres posiciones del triglicérido. Los preparados para lactantes carecen de cualquier actividad BSSL, por ello cabe esperar una reducción de la hidrólisis de los AGPI-CLs localizados en las posiciones externas de los triglicéridos. Por eso es importante seleccionar una fuente de AGPI-CLs con una distribución lo más similar posible a la encontrada en la leche materna (Martín y col. 1993).

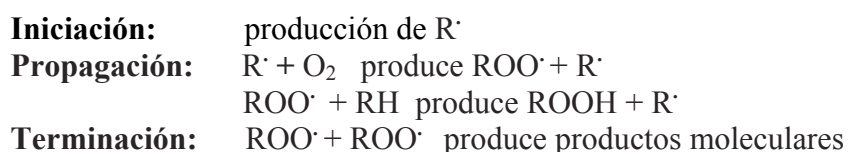
Se realizó un estudio en niños nacidos a término, a los que se les proporcionaron diferentes dietas: leche materna, una dieta control sin AGPI-CLs, una dieta con AGPI-CLs procedentes de fosfolípidos de huevo (AA, 0.43% y DHA, 0.12%) o una dieta con AGPI-CLs procedentes de aceites de pescado (AA, 0.0% y DHA, 0.20%). A los 4 meses los niños alimentados con la dieta de fosfolípidos de huevo presentaban una concentración de AA y DHA en fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina de eritrocitos similar a los niños alimentados con leche materna y superior a los niños con la dieta control. Los niños con la dieta en aceite de pescado era el grupo que presentaba mayor contenido de DHA, pero en cambio los niveles de AA se habían reducido. Estas diferencias entre los grupos persistían al año de vida (Auestad y col. 1997).

Actualmente se postula que tanto o más crítica que la suplementación durante la lactancia, es el aporte de DHA durante la gestación (Helland y col. 2003; Montgomery y col. 2003; Smutsa y col. 2003), e incluso antes que esta ocurra (Valenzuela y Nieto, 2003a), ya que una elevada incorporación de DHA al tejido cerebral ocurre en la etapa prenatal (Clandinin y col. 1980). En diferentes estudios en animales se ha demostrado que la suplementación materna prenatal (antes y durante la gestación) permite una mayor incorporación de DHA en diferentes segmentos cerebrales de los fetos y de las crías. Más aún, los animales provenientes de madres suplementadas durante el período prenatal muestran una mayor capacidad de aprendizaje discriminatorio frente a un test de evaluación como el de Skinner. Además, la suplementación prenatal puede resultar más eficiente, segura y de mucho menor costo que la suplementación postnatal a través de preparados, ya que no sería necesario aportar directamente DHA, siendo suficiente un adecuado aporte de su precursor el ácido α -linolénico, el cual está disponible en aceites comerciales de bajo costo (Valenzuela y col. 2003b; Valenzuela, 2003c; Valenzuela, 2003d). Aún queda mucho por definir en el campo de la suplementación pre y postnatal, pero la activa investigación que se realiza sobre el tema con seguridad permitirá establecer los mejores protocolos y seleccionar los mejores productos para realizar una efectiva y segura suplementación perinatal con DHA.

5.6. Estabilidad oxidativa de los preparados para lactantes

La oxidación lipídica es una de las principales causas de deterioro durante el procesado y almacenamiento de los alimentos que tienen un elevado contenido en grasa. Esta oxidación refleja la calidad del alimento e influye en su vida útil. Siendo la vida útil de un alimento, el periodo entre el procesado/empaquetado de un producto y el tiempo cuando este se transforma en un producto no aceptable (Vallejo-Cordoba y Nakai, 1994).

Es conocido que el mecanismo de oxidación lipídica es un proceso que podría ser analizado en tres etapas: iniciación, propagación y terminación, el cual se representa a través de la siguiente secuencia de reacciones:



A grandes rasgos, la autooxidación de los lípidos (RH) involucra la formación inicial de radicales libres (R \cdot) a partir del ácido graso insaturado, lo que facilita la reacción con el oxígeno para formar radicales peróxido (ROO \cdot) e hidroperóxidos (ROOH), que rápidamente se descomponen en productos secundarios de oxidación, siendo moléculas más pequeñas producidas por rotura de los productos primarios. Estos compuestos secundarios pertenecen principalmente a dos grupos, los hidrocarburos y los aldehídos de cadena corta. A parte también existen otras moléculas menos características como son epóxidos, alcoholes, grupos cetona, ya sean solos o combinados con otros grupos aldehído. Los ácidos dicarboxílicos también se podrían formar en una segunda fase de la oxidación lipídica.

En el caso de los preparados para lactantes, el flavour es gobernado, en periodos largos, por la oxidación de su grasa (Ulberth y Roubicek, 1995). Estos preparados tendrán una mayor oxidación lipídica como mayor sea el número de insaturaciones de los ácidos grasos que los componen y como mayor sea la concentración de AGPI-CLs. Así, los preparados para lactantes suplementados con AGPI-CLs tendrán una oxidación lipídica mayor que aquellos no suplementados.

Los preparados suplementados con AGPI-CLs están suplementados con el ácido araquidónico (AA, C20:4, n-6) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6, n-3), que son mucho más susceptibles a la oxidación que el ácido linoleico (C18:2, n-6), pero la oxidación de este último es también importante, ya que es el ácido graso poliinsaturado mayoritario en estos preparados (Ulberth y Roubicek, 1995; Giammarioli y col. 1997).

En cuanto a los productos secundarios de oxidación, los compuestos volátiles producidos en los preparados para lactantes, cabe destacar el pentanal y el hexanal como compuestos volátiles de oxidación específicos para los ácidos grasos de la serie n-6, y el propanal para los ácidos grasos de la serie n-3.

II. PARTE EXPERIMENTAL

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con la finalidad de cumplir los objetivos propuestos se diseñaron los siguientes apartados experimentales:

I. Estudio de los niveles de vitaminas C y E y de ácidos grasos de la leche humana conservada en la nevera (4°C), en el congelador (-20°C) y en el ultracongelador (-80°C).

II. Estudio de los niveles de vitaminas C y E y de los ácidos grasos de la leche humana pasteurizada con un método lento (62.5°C, 30 min) o con un método rápido (100°C, 5 min).

III. Estudio de los niveles de ácidos grasos, de hidroperóxidos y de compuestos volátiles y realización de ensayos organolépticos de fórmulas lácteas con diferentes niveles de AGPI-CLs, almacenadas a temperatura ambiente (25°C) y en la estufa a 37°C a lo largo de un periodo de tiempo controlado.

IV. Estudio de los niveles de ácidos grasos, especialmente del ácido α -linolénico y de sus AGPI-CLs n-3 derivados en ratas Wistar, concretamente en machos, hembras no embarazadas y hembras embarazadas.

Para cumplir con el apartado I y II se puso a punto un método de extracción de la grasa de la leche (publicación 1) y se desarrollaron y validaron dos nuevos métodos directos por cromatografía líquida de alta eficacia en la leche humana, uno para la determinación del ácido ascórbico y de la vitamina C total (publicación 2) y otro, para la determinación del α - y γ -tocoferol (vitamina E) (publicación 3). Posteriormente se analizaron los niveles de las vitaminas C y E y de los ácidos grasos en la leche humana pasteurizada a 62.5°C durante 30 minutos o a 100°C durante 5 minutos (publicación 4). Igualmente, se analizó la estabilidad de estos compuestos en la leche conservada a tres temperaturas: nevera (4°C), congelador (-20°C) y ultracongelador (-80°C) (Publicación 5).

Para realizar el apartado III se desarrolló y validó un nuevo método directo para la determinación de compuestos volátiles en preparados para lactantes (publicación 6). Posteriormente se analizaron los compuestos volátiles, los compuestos primarios de oxidación y los ácidos grasos de diferentes fórmulas lácteas almacenadas a 25°C y a 37°C. Además de realizarse un ensayo organoléptico de estas fórmulas (publicación 7).

En referencia al apartado IV, se analizaron los niveles de ácidos grasos con mayor interés, como el ácido α -linolénico y de sus derivados, ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico en las diferentes fracciones lipídicas del plasma, hígado y tejido adiposo de ratas macho, hembras vírgenes y hembras embarazadas (publicación 8).

El estudio sobre la estabilidad de la leche humana conservada a diferentes temperaturas, así como el estudio de la pasteurización, han sido posibles gracias a la

colaboración de “*la Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears*” y a las madres de la agrupación “Alba” y de la “*Federació Catalana de Grups de Suport a la Lactància Materna*”, las que nos facilitaron las muestras de leche materna.

En el estudio realizado sobre las fórmulas lácteas, las determinaciones se han podido realizar gracias a la participación de los Laboratorios Ordesa SL, empresa que elaboró las fórmulas lácteas con AGPI-CLs procedentes de diferentes fuentes.

Finalmente, el estudio realizado con las ratas Wistar para determinar la conversión del ácido α -linolénico a sus derivados se realizó en el “Institute of Human Nutrition” de la Escuela de Medicina de la Universidad de Southampton en Southampton, UK.

7. PUBLICACIONES

Publicación 1

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE LA GRASA DE LA LECHE HUMANA

M. Romeu-Nadal, S. Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C. Lopez-Sabater

La leche humana es el alimento ideal para la alimentación del lactante durante los seis primeros meses de vida. La grasa de la leche es el principal aporte de energía para el recién nacido, contribuyendo en un 40-55% de su ingesta total de energía. La extracción de dicha grasa es necesaria para su análisis cualitativo y cuantitativo, siendo los triglicéridos sus componentes mayoritarios, y los ácidos grasos los componentes mayoritarios de estos triglicéridos. La mayoría de técnicas utilizadas para la extracción de la grasa en la leche requieren mucha manipulación de la muestra y son largas y tediosas.

El objetivo de este estudio fue desarrollar un nuevo método para la extracción de la grasa de la leche humana que fuese más rápido y más fácil que los métodos convencionales existentes.

Para el desarrollo del estudio, se utilizó la leche madura obtenida de los dos senos al final de cada toma durante un día. La leche de las diferentes madres fue mezclada para obtener un “pool” del que se hicieron diferentes alícuotas que se conservaron a -80°C hasta su análisis. En el estudio se comparó un método convencional descrito por Morera y col. (2003) (Método I) con un nuevo método (Método II). El Método I consistió en diferentes fases de extracción y de lavado, diferentes fases de centrifugación, y una fase final larga de evaporación con rotavapor. En el Método II las principales diferencias respecto el Método I fueron que las fases de extracción y centrifugación eran menos y más cortas, la presencia de una nueva fase de centrifugación con una centrífuga de hematocrito, y una rápida evaporación final con nitrógeno.

Ambos métodos fueron comparados determinando por gravimetría el contenido de grasa extraída por cada método. Además, se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo de esta grasa mediante la determinación de los triglicéridos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con un detector de difusión de la luz (ELSD).

En conclusión, los dos métodos dieron resultados óptimos: el contenido de grasa determinado gravimetricamente y los análisis cualitativos y cuantitativos de los triglicéridos no presentaron diferencias significativas entre ambos. Sin embargo, el Método II presentaba ciertas ventajas respecto el Método I, ya que utilizaba menos materiales y disolventes, y era más simple y más rápido (aproximadamente 30 minutos en lugar de 90 minutos) que el Método I. De este modo, con el Método II es posible realizar la extracción de la grasa de un número más elevado de muestras.

Comparison of two methods for the extraction of fat from human milk

M. Romeu-Nadal, S. Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater*

Dept. Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain

Received 17 November 2003; received in revised form 16 February 2004; accepted 18 February 2004

Abstract

We compared two methods for the extraction of fat from human milk. Pure fat extraction techniques are necessary for qualitative and quantitative analysis of milk fat, of which triglycerides account for more than 98%. Method I was a conventional liquid–liquid system for the fat extraction while method II was a faster approach using a haematocrit technique. No significant differences were observed between both methods neither in the fat content determined gravimetrically, nor in qualitative and quantitative analysis of triglycerides by high-performance liquid chromatography (HPLC) with evaporative light-scattering detection (ELSD). We conclude that method II offers substantial advantages over the conventional method (method I). The former requires less reagents and material and is simpler and less time-consuming (approximately 30 min instead of 90 min). Therefore, a new method will make it possible to extract fat of more human milk in the same time.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Human milk; Fat extraction; Creamatocrit; Triglycerides; HPLC–ELSD

1. Introduction

Recognition of the superiority of human milk has led to an increase in breast-feeding in recent years [1]. Breast milk from healthy, well-nourished women is the preferred form of feeding for all healthy infants in the first 6 months of their lives [2]. Adequate growth and development of the newborn depend on the amount and quality of available fetal stores and milk ingested, the efficiency of gastrointestinal absorption, and energy expenditure [3]. Human milk fat is the main source of energy for the breastfed infant, contributing around 40–55% of total energy intake. In 1978, Lucas et al. [4] devised a simple micromethod (creamatocrit) for estimating the fat and energy content of human milk by means of the centrifugation of the milk in a haematocrit centrifuge [5,6]. Nevertheless, pure fat extraction methods are necessary for the qualitative and quantitative analysis of milk fat [7], in which triglycerides account for more than 98%. The most widely used techniques for fat extraction are the methods developed by Folch et al. in 1956 [8], which use chloroform–methanol, and a modification of

this method, developed by Chen et al. (1981), which applies dichloromethane–methanol [9–17]. Dichloromethane is similar to chloroform in its physical and chemical properties but is much less hazardous [9]. These extraction methods, however, are lengthy, and require a lot of time for analyzing a few samples.

There is a need for a rapid and simple milk fat extraction method that can be used in the nursery, in the laboratory, or in the field. This study compares a conventional method for the fat extraction (method I) developed by Morera et al. [14] with a new rapid method (method II). For both the techniques, we measured gravimetrically the fat content and evaluated the quality of the fat extracted by studying the composition of human milk triglycerides by high-performance liquid chromatography (HPLC) with evaporative light-scattering detection (ELSD).

2. Experimental

2.1. Samples

Human milk samples were collected by means of a Chicco mechanical breast pump (Chicco, Italy), following the manufacturer's instructions. The mature milk from each

* Corresponding author. Tel.: +34-93-402-45-12; fax: +34-93-403-59-31.

E-mail address: mclopez@ub.edu (M.C. López-Sabater).

breast was obtained at the end of each feed during 1 day. The samples were stored in the fridge (+4 °C) at home and during transport to the laboratory were maintained at the same temperature. In the laboratory, the total milk obtained was well mixed with a vortex, after which point aliquots were taken for assays. Until fat extraction, aliquots were stored at –80 °C, under N₂ to inactivate lipases and avoid triglycerides hydrolysis [18], and were thawed at 25 °C in a water bath before analysis.

2.2. Reagents

The solvents used, such as HPLC-grade dichloromethane, and HPLC-grade methanol were purchased from SDS (Peypin, France), sodium chloride was from Merck (Darmstadt, Germany), and anhydrous sodium sulfate, was supplied by Panreac (Barcelona, Spain). All glassware used in the two procedures was cleaned with dichloromethane to avoid interferences.

2.3. Chromatographic equipment

Chromatographic measurements were performed on a Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) Model 1050 pump system, a Waters 717 plus Autosampler (Milford, MA, USA), an evaporative light-scattering detector ACS, Model 750/14 (Macclesfield, UK), and an HP-3365 Series II Chemstation, which was used for data acquisition from the ELSD system. The analytical column used was Extrasil ODS (250 mm × 4 mm i.d., 5 µm particle size) and had a precolumn (2 mm × 4 mm), both were from Tracer Analytica (Tecknokroma, Barcelona, Spain).

2.4. Chromatographic conditions

Chromatographic separation was carried out, as described [18], using a linear ternary gradient of acetonitrile–dichloromethane–acetone from (80:15:5, v/v/v) to (10:80:10, v/v/v) from 0 to 60 min. After that we carried out a post-run program in order to clean the column with dichloromethane–acetonitrile (95:5, v/v) during 2 min. The eluent flow-rate was 1 ml/min and the column temperature was 30 °C. The volume of the sample injected was 5 µl. The temperature of the detector was set at 55 °C and the gas flow (from an air compressor) was 10 l/min. Triglycerides were identified using logarithms of selectivity values (log α), and the equivalent carbon number (ECN), as described previously [19–21] and also by a water HPLC system that was connected to a Platform II mass spectrometer (Micromas, Manchester, UK) fitted with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) system. This was typically operated according to the following conditions: tip of the source at 3000 V and 450 °C; source block at 80 °C; counter-electrode at 100 V and 280 °C; sampling cone at 50 V [14].

Triglycerides were quantified on the basis of the percentage peak area. According to Ruiz-Sala et al. [22] the triglyc-

erides response is not dependent on the structure of the component detected, but it is closely related to the large differences in the retention times of the triglycerides [19].

2.5. Fat extraction

Fat was extracted from seven aliquots, each with 3 ml of pooled mature milk using methods I and II.

2.5.1. Method I

Lipid extraction was performed following the gravimetric method described by Morera et al. [14]. From a well-mixed aliquot of mature milk, 3 ml was placed in 50 ml centrifuge tubes. We then added 27 ml of a dichloromethane–methanol solution (2:1, v/v) to each tube. The mixture was shaken mechanically for 15 min and centrifuged at 2500 × g for 8 min at 4 °C. Approximately 8 ml of distilled water was pipetted into each tube and, after shaking for a further 15 min, the sample was, again centrifuged at 2500 × g for 8 min at 4 °C. As much of the upper aqueous fraction as possible was carefully removed with a pipette. The organic layer was washed with 8 ml of a saturated solution of the sodium chloride, and finally mixed mechanically for 15 min and centrifuged for 8 min at 2500 × g at 4 °C. Again, the upper aqueous fraction was carefully removed with a pipette. The organic fraction was carefully transferred to a separating funnel and filtered through 1PS paper (Whatman, Maidstone, UK) containing anhydrous sodium sulfate, and 3–5 ml of dichloromethane was passed through the filter. The fat solution was taken in pre-weighed conical flask. Finally the extract was concentrated by removing dichloromethane in a rotatory evaporator and dried under a gentle stream of nitrogen. The weight of the conical flask before/after was assumed to be fat. The fat was stored at –20 °C and redissolved in HPLC-grade dichloromethane (3%, w/v) immediately before HPLC analysis.

2.5.2. Method II

From a well-mixed aliquot of mature milk, 3 ml was placed in 12 ml test tubes. We then added 5 ml of a dichloromethane–methanol solution (2:1, v/v). The mixture was shaken manually with a vortex for 1 min and centrifuged for 8 min at 2500 × g at 4 °C. The upper aqueous phase was carefully removed with a pipette and 3 ml of the solution of dichloromethane–methanol (2:1, v/v) was added to the tube. The tube was then shaken for 1 min with a vortex and centrifuged for 6 min at 2500 × g at 4 °C, after which we obtained a small precipitate and an upper organic phase. The latter was transferred to an eppendorf tube, and most of the dichloromethane was removed using a Vacuum Manifold (Tecknokroma). The remaining part, approximately 0.5 ml, was drawn by capillarity into standard glass capillary tubes. These were sealed at one end by plasticine and centrifuged in a haematocrit centrifuge for 6 min at 12,000 × g. The part of the tube (Fig. 1) containing the fat was cutting and the fat was removed with dichloromethane. The fat solution was

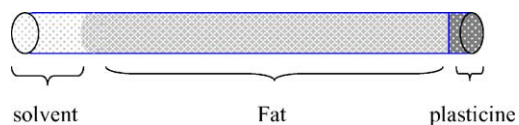


Fig. 1. Separation of milk fat extracted by method II in the capillary tube.

taken in a pre-weighed eppendorf and dried using a stream of nitrogen gas. The difference in weight of the eppendorf before/after was assumed to be fat. The fat was then stored at -20°C and redissolved in HPLC-grade dichloromethane (3%, w/v) immediately before HPLC analysis.

3. Statistical methods

Each sample was analyzed seven times by methods I and II and the results are reported as means, 95% confidence intervals (CI) and standard deviations (S.D.). We compared the milk fat content (g/ml) and triglycerides percentages obtained with the two techniques. Differences between the two were tested by a paired two-tailed Student's *t*-test. The level of statistical significance was set at 5%. The results were processed using the statistical package SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

4. Results and discussion

In this study, we compared the conventional method for fat extraction (method I) with a new method (method II). Fat was extracted from 14 mature milk aliquots, seven by method I and seven by method II.

4.1. Fat content

Gravimetric methods are used routinely for the determination of total milk fat [16,17,23–25]. In our study, we used this technique to compare the milk fat output obtained by methods I and II. Data on fat content expressed as means and 95% confidence intervals referring to both techniques are shown in Table 1.

Methods I and II gave comparable results and we did not find any significant difference ($P > 0.05$) between the concentrations of fat extracted.

4.2. Qualitative and quantitative analysis of fat

Human milk fat is composed mainly of triglycerides. HPLC triglycerides analysis with ELSD did not reveal significant differences between the quality of fat extracted by the two techniques. Figs. 2 and 3 show the chromatographic profile of the triglycerides obtained by methods I and II, respectively. Analytical results showed a good reliability for the triglycerides with concentrations in human milk higher than 1%. These were found to be 96% of total triglycerides,

Table 1

Fat content (g/ml) in pooled mature human milk obtained by methods I and II

Human milk samples	Fat (g/ml)	
	Method I	Method II
1	0.0235	0.0263
2	0.0200	0.0234
3	0.0278	0.0281
4	0.0236	0.0211
5	0.0240	0.0197
6	0.0293	0.0253
7	0.0285	0.0251
Mean \pm CI ^a	0.0252 ^b \pm 0.0025	0.0241 ^b \pm 0.0022

^a CI = 95%.

^b No significant differences; $P > 0.05$ (Student's *t*-test).

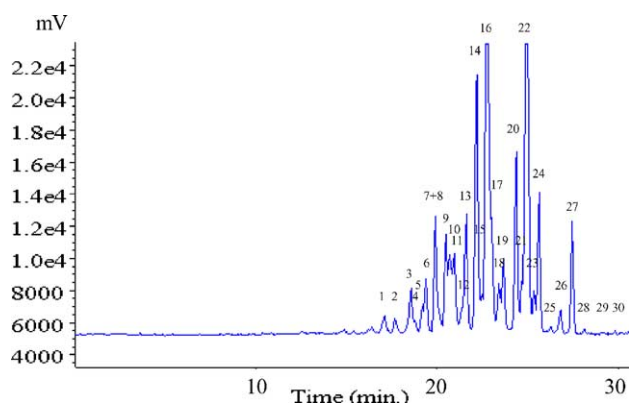


Fig. 2. Chromatographic profile of human milk triglycerides obtained by method I.

and the palmitic acid–oleic acid–linoleic acid (POL) and palmitic acid–oleic acid–oleic acid (POO) accounted for more than half of this fraction (approximately 22 and 28%, respectively). Both POL and POO presented CVs $< 4\%$. For the triglycerides with concentrations between 1 and 8% we observed CVs $< 10\%$.

Only the minor triglycerides (peak numbers 1, 2, 4, 5, 12, 15, 25, 26, 28, 29, and 30 in Figs. 2 and 3), whose concentrations were $< 1\%$, presented CVs $> 10\%$. These

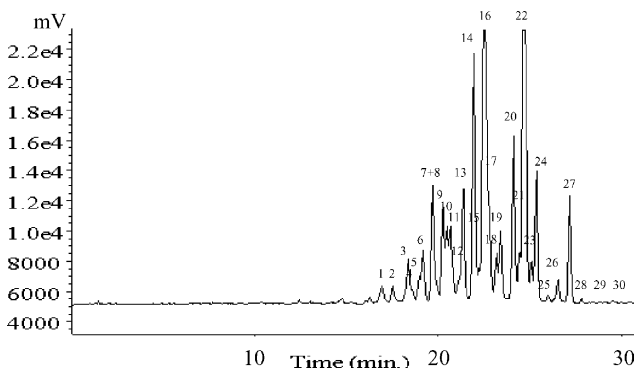


Fig. 3. Chromatographic profile of human milk triglycerides obtained by method II.

Table 2
Triglyceride percentages in mature human milk obtained by the two methods

Number of peaks ^a	TGs	Method I (<i>n</i> = 7), mean ± S.D. ^b	Method II (<i>n</i> = 7), mean ± S.D. ^b	<i>P</i> ^c
3	LaOL/MPLn	1.684 ± 0.035	1.669 ± 0.135	0.863
6	LLO	1.849 ± 0.051	1.804 ± 0.123	0.594
7 + 8	LaPL + LaOO/MPL	4.164 ± 0.121	4.120 ± 0.149	0.708
9	LLP/PLnO/LpaO	2.997 ± 0.159	2.945 ± 0.026	0.605
10	LaOP/MMO	2.347 ± 0.067	2.308 ± 0.110	0.633
11	LaPP/LaMS	2.552 ± 0.177	2.573 ± 0.071	0.860
13	MOO/PPL/PaOP	3.783 ± 0.356	3.817 ± 0.204	0.895
14	LOO	8.174 ± 0.226	8.135 ± 0.080	0.791
16	POL	22.830 ± 0.451	22.694 ± 0.117	0.641
17	PaLS	2.903 ± 0.268	3.088 ± 0.116	0.335
18	PaOO	1.651 ± 0.114	1.577 ± 0.098	0.445
19	MPO	2.330 ± 0.146	2.358 ± 0.170	0.839
20	OOO	5.344 ± 0.165	5.365 ± 0.010	0.840
21	SLO	1.287 ± 0.093	1.277 ± 0.014	0.862
22	POO	27.663 ± 1.031	27.751 ± 0.647	0.906
23	SPL	1.281 ± 0.029	1.313 ± 0.061	0.450
24	PPO/MOS	4.025 ± 0.041	4.068 ± 0.073	0.426
27	SOP	3.136 ± 0.036	3.138 ± 0.063	0.969

Abbreviations: TGs, triglycerides; La, lauric acid; M, myristic acid; P, palmitic acid; Pa, palmitoleic acid; S, stearic acid; L, linoleic acid; Ln, linolenic acid; O, oleic acid.

^a Number of peaks in a chromatographic elution.

^b Standard deviation.

^c *P* > 0.05, no significant differences (Student's *t*-test).

triglycerides were found to be approximately 4% of total triglycerides and were not representative of human milk.

Table 2 shows the most representative triglycerides in human milk. We observed both methods gave comparable results and no significant differences were observed between them (*P* > 0.05).

In conclusion, we believe that the two techniques provide satisfactory results: the fat content determined gravimetrically and the qualitative and quantitative analyses of representative triglycerides not present differences by both methods. However, method II has certain advantages over the conventional system. First, it requires less reagents and material, and second it is simpler and less time-consuming (approximately 30 min instead of 90 min). Therefore the new method will make it possible to extract fat of more human milk in the same time.

Acknowledgements

This study was financed by the Fundació Bosch Gimpera project 4614 and by the CeRTA (Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments, Generalitat de Catalunya). Meritxell Romeu-Nadal acknowledges financial support from a grant from Generalitat de Catalunya. We also thank Robin Rycroft for revising the English manuscript.

References

- [1] M.J. Heining, *Pediatr. Clin. North Am.* 48 (2001) 105.
- [2] ESPGAN, *Acta Paediatr. Scand.* 80 (1991) 887.
- [3] E.R. Boersma, J.P. Offringa, A.J. Muskiet, M.W. Chase, J.I. Simmons, *Am. J. Clin. Nutr.* 53 (1991) 1197.
- [4] A. Lucas, J.A.H. Gibbs, R.L.J. Lyster, J.D. Baum, *Br. Med. J.* 1 (1978) 1018.
- [5] J.A. Lemons, R.L. Schreiner, E.L. Gresham, *Pediatrics* 66 (4) (1980) 626.
- [6] C.D. Wang, P.S. Chu, B.G. Mellen, J.P. Shenai, *J. Perinatol.* 19 (5) (1999) 343.
- [7] G.R. Jensen, J. Bitman, S.E. Carlos, C.S. Couch, M. Hamosh, D.S. Newburg, in: *Handbook of Milk Composition*, Academic Press, London, 1995, p. 495.
- [8] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane-Stanley, *J. Biol. Chem.* 226 (1956) 497.
- [9] I.S. Chen, C.S.J. Shen, A.J. Sheppard, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58 (1981) 599.
- [10] V. Ruiz-Gutiérrez, L.J.R. Barron, *J. Chromatogr. B* 671 (1995) 133.
- [11] P. Luukkainen, M.K. Salo, T. Nikkari, *Eur. J. Pediatr.* 154 (1995) 316.
- [12] M. Hamosh, L.A. Ellis, D.R. Pollock, T.R. Henderson, P. Hamosh, *Pediatrics* 97 (1996) 492.
- [13] G. Serra, A. Marletta, W. Bonacci, F. Campone, I. Bertini, P.B. Lantieri, D. Risso, S. Ciangherotti, *Biol. Neonate* 72 (1997) 1.
- [14] S. Morera, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater, *Eur. J. Clin. Nutr.* 57 (2003) 1621.
- [15] M. Xiang, S. Lei, T. Li, R. Zetterström, *Acta Paediatr.* 88 (1999) 126.
- [16] F. Marangoni, C. Agostoni, A.M. Lammardo, M. Giovannini, C. Galli, E. Riva, *Br. J. Nutr.* 84 (2000) 103.
- [17] C. Agostoni, F. Marangoni, A.M. Lammardo, M. Giovannini, E. Riva, C. Galli, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 64 (2001) 105.
- [18] S. Morera, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 467.
- [19] S. Morera, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 475.

- [20] J.P. Goiffon, C. Reminiac, D. Furon, *Rev. Franç. Corps Gras* 28 (1981) 199.
- [21] J. Parcerisa, M. Rafecas, A.I. Castellote, R. Codony, A. Farran, J. Garcia, A. Lopez, A. Romero, J. Boatella, *Food Chem.* 50 (1994) 245.
- [22] P. Ruiz-Sala, M.T.G. Hierro, I. Martinez-Castro, G. Santa Maria, J. *Am. Oil Chem. Soc.* 73 (1996) 283.
- [23] J. Bitman, L. Wood, M. Hamosh, P. Hamosh, N. Mehta, *Am. J. Clin. Nutr.* 38 (1983) 300.
- [24] B. Koletzko, M. Mroczek, J.B. Bremer, *Am. J. Clin. Nutr.* 47 (1988) 954.
- [25] N. Grova, C. Feidt, C. Crépineau, C. Laurent, P.E. Lafargue, A. Hachimi, G. Rychen, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4640.

Publicación 2**DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA C EN LECHE HUMANA VERSUS UN METODO ENZIMÁTICO**

M. Romeu-Nadal, S. Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater*

La vitamina C es la suma del ácido ascórbico (AAS) y del ácido dehidroascórbico (ADA), ya que este último puede convertirse fácilmente en AAS en el organismo. La vitamina C juega un papel muy importante en el sistema inmune y también como antioxidante. Los niños requieren de un aporte óptimo para su crecimiento y desarrollo.

El AAS y el ADA son compuestos antioxidantes y se han considerado en algunas muestras biológicas como marcadores del estrés oxidativo. Así, podrían ser considerados marcadores de la estabilidad de la leche humana, pudiendo limitar su tiempo de conservación en función de su concentración en la leche.

El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar dos métodos directos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), uno para la determinación rutinaria de la vitamina C total (AAS y ADA) y otro para la determinación rutinaria sólo del AAS en la leche humana y, finalmente comparar el nuevo método directo de HPLC para el análisis del AAS con un método enzimático clásico.

Para el desarrollo del estudio, se utilizó la leche madura obtenida de ambos pechos de diferentes madres al comienzo de la primera toma del día. Las diferentes muestras de leche se mezclaron para obtener un “pool” del que se hicieron diferentes alícuotas que se conservaron a -80°C hasta su análisis. En el estudio se desarrollaron y validaron los dos métodos directos de HPLC en términos de linealidad, límites de detección y de cuantificación, precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y recuperación. Igualmente, para el método enzimático se determinó la linealidad y la precisión.

En relación a la cuantificación, se realizaron concretamente dos rectas de regresión (una sobre agua y otra sobre leche) tanto para los dos métodos de HPLC como para el método enzimático. Además, para este último también se cuantificó el AAS utilizando la fórmula que proporcionaba el mismo método.

Los límites de detección y cuantificación encontrados, así como la linealidad, la precisión y la recuperación demostraron la idoneidad de los dos métodos de HPLC para la determinación de la vitamina C total y del ácido ascórbico. Igualmente, el método enzimático fue lineal y preciso, aunque no podía determinar la vitamina C total.

Al comparar el método de HPLC con el enzimático para la determinación del ácido ascórbico, la técnica de HPLC proporcionó mejores resultados que el enzimático, ya que este último sólo podía detectar el 63% de ácido ascórbico detectado con el método de HPLC. La recuperación obtenida con el método enzimático era menor al utilizar la recta de regresión sobre agua que la recta realizada sobre leche, sugiriendo que la propia matriz de leche podría influir en este método.

Además, el método directo fue más rápido y sencillo que el enzimático, lo que le convierte en una técnica apta para el análisis rutinario en la industria de la nutrición infantil.

En conclusión, las desventajas del método enzimático justificarían su substitución por el método de HPLC.

Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method

M. Romeu-Nadal, S. Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater*

Dept. Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain

Received 21 July 2005; accepted 14 October 2005

Available online 2 November 2005

Abstract

Vitamin C is an antioxidant that can be considered a possible biomarker of oxidative stability in human milk. A high-performance liquid chromatographic method was developed and validated for determining the total Vitamin C (ascorbic acid and dehydroascorbic acid) and ascorbic acid levels in human milk. This method was then compared with an enzymatic method (a Colorimetric technique) for quantifying ascorbic acid levels. Repeatability and reproducibility were acceptable for all methods. However, the high-performance liquid chromatography (HPLC) technique provided more satisfactory results than the enzymatic method due to this last method detected 37% less ascorbic acid and does not determine the total Vitamin C because of the enzymatic method cannot reduce the dehydroascorbic acid (DHA) to ascorbic acid. Furthermore, the HPLC method has the added advantages that it requires less reagents and material, and is simpler and less time consuming than the enzymatic method. In conclusion, the drawbacks of this enzymatic method would justify its substitution for a HPLC method.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Human milk; Ascorbic acid; Vitamin C; HPLC; Enzymatic method

1. Introduction

In 1997, the American Academy of Pediatrics issued a statement on breast feeding, summarizing its benefits to the infant and the mother, and set forth guidelines for pediatricians [1]. Breast milk is considered an ideal nutrient for both term and preterm infants up to 6 months of age [2], improving host defenses, digestion and absorption of nutrients, gastrointestinal function, and neurodevelopment [3].

Preterm infants have a reduced antioxidising capacity [4–6] and are often exposed to oxidant stress caused by infection, mechanical oxygen ventilation, intravenous nutrition and blood transfusions. Many of the disorders common to preterm infants, including chronic lung disease, necrotizing enterocolitis, prematurity retinopathy and intraventricular–periventricular hemorrhage are thought to be due to this imbalance between antioxidising capacity and oxidative stress [7,8].

Vitamins A, E and C play an important role in antioxidant activity and immunomodulation [9,10]. Ascorbic acid (AA) is the principal biologically active form but dehydroascorbic acid (DHA) also exhibits biological activity since it can be easily converted into AA in the human body [11–13]. Therefore, it is important to measure both AA and DHA when reporting total Vitamin C levels. Vitamin C presents in human milk plays several biochemical roles linked to the functioning of the immune system. It helps in the maintenance of a natural barrier against infection, stimulates leukocytes for their phagocytic and antimicrobial activity, augments antibody production and complement levels [14] and also enhances synthesis of interferon [15]. For growth, development and survival, infants need an optimum supply of ascorbic acid.

A survey of infant feeding practices indicated that 40% of the mothers who breastfed their infants expressed and stored their milk frequently in their home refrigerator/freezer prior to feeding [16]. Such handling and storage of human milk can result in the loss of components sensitive to oxidation, such as the Vitamin C [17]. The concentrations of the hydrophilic antioxidants ascorbic acid and dehydroascorbic acid in some biological samples for some time have been considered possible biomarkers

* Corresponding author. Tel.: +34 93 4024512; fax: +34 93 4035931.
E-mail address: mclopez@ub.edu (M.C. López-Sabater).

of oxidative stress [8]. Therefore, AA and DHA could be also considered biomarker of oxidation or storage time of the human milk, being it the application of the method.

Several methods have been developed for the estimation of Vitamin C levels [18]. High-performance liquid chromatography (HPLC), using a UV detector is currently the most commonly used technique for the analysis of ascorbic acid in food [12,19–26]. Some HPLC methods require electrochemical [17,27,28] or fluorimetric detection [29–31], because of the low absorptivity of DHA in the ultraviolet range of the spectrum, but the necessary equipment is not always available in hospital laboratories. To solve this problem, some authors propose the previous reduction of DHA to AA using DL-dithiothreitol [8,17,27,32]. The quantification of the latter acid allows an indirect estimation of DHA levels. Enzymatic methods using commercial test kits are also used for determining ascorbic acid levels [33–36].

However, several problems are associated with the determination of Vitamin C levels using enzymatic methods, for example, the reduction of dehydroascorbic acid to ascorbic acid cannot be measured, the minor specification of the sample and the low recovery of the ascorbic acid [36].

The aim of this study was to develop and validate two HPLC methods for the routine determination of Vitamin C content in human milk: one for determining the total Vitamin C level (AA and DHA indirectly), and a second for determining only the ascorbic acid level. The HPLC method for ascorbic acid determination was then compared with an enzymatic method (commercial test kit).

2. Experimental

2.1. Collection of breast milk

Samples of human milk were collected from both breasts by means of a Chicco manual breast pump (Chicco®, Italy), following the manufacturer's instructions, from four healthy mothers aged 20–35 years, at the Extraction Unit of the department. Informed consent was obtained from the participating mothers. All the mothers had full term pregnancy. Mature human milk was collected into sterile opaque bottles during the first expression in the morning. The milk from different mothers was immediately pooled, and aliquots of 5 ml were transferred to plastic tubes. This volume was big enough to allow the analysis for triplicate of both methods in the same day, thus, providing a direct comparison. Until the ascorbic acid analysis, aliquots were stored at -80°C for no longer than 1 month.

2.2. Chemicals and reagents

Stock standard solutions were prepared by dissolving ascorbic acid in 0.56% (w/v) *meta*-phosphoric acid solution with Milli-Q water and stored at 4°C . The Milli-Q water was purified by passing it through a Millipore Compact Milli-Q water system (Bedford, MA, USA). The ascorbic acid standard with a purity of 99.7% was obtained from Merck (Darmstadt, Ger-

many). The *meta*-phosphoric acid with a purity of 33.5–36.5% was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland).

The solvents used, such as HPLC-grade acetic acid, and HPLC-grade methanol were purchased from Panreac (Barcelona, Spain) and SDS (Peypin, France), respectively.

The commercially available test kit used was purchased from Boehringer Mannheim, R-Biopharm, Roche. It was a colorimetric method for the determination of ascorbic acid in foodstuffs and other materials. The DL-dithiothreitol with a purity of 99% and the anhydrous citric acid were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.3. Determination of total Vitamin C and ascorbic acid through the HPLC method

Chromatographic measurements were made using a Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) Model 1050 pump system, a Waters 717 plus Autosampler (Milford, MA, USA), a UV-vis detector, SPD-10 AV VP (Shimadzu, Kyoto, Japan) and an HP-3365 Series II Chemstation. The analytical column used was a Tracer Spherisorb ODS2 C₁₈ (250 × 4.6 mm I.D., 5 μm particle size) protected with a guard cartridge (Tracer, C₁₈, 5 μm), both from Tracer Analytica (Tecknokroma, Barcelona, Spain).

The aliquots of human milk were thawed to around 22°C in a water bath, protected from light, and then mixed. To analyze total Vitamin C content, dehydroascorbic acid was reduced to ascorbic acid with DL-dithiothreitol. Exactly 300 μl of this mixed human milk and 800 μl of DL-dithiothreitol 100 mM were added into a special centrifuge and filtration tube (Microsep II MF, 0.45 μm from VWR, Barcelona, Spain). The mixture was shaken mechanically for 30 s and then the tube was kept in a dark room for 15 min. Three hundred microlitres of 0.56% (w/v) *meta*-phosphoric acid solution was then added and the mixture further shaken for 30 s and centrifuged at 10°C (10 min, $3000 \times g$).

To analyze ascorbic acid, 300 μl of mixed human milk and 300 μl of 0.56% (w/v) *meta*-phosphoric acid solution were added to the same special centrifuge and filtration tube, shaken for 30 s and centrifuged at 10°C (10 min, $3000 \times g$).

With both HPLC techniques, 50 μl of the filtrate was directly injected into the HPLC system. Isocratic chromatographic separation was carried out using a mobile phase of Milli-Q water with acetic acid (0.1%, v/v) and methanol in a relative proportion of 95:5 (v/v). The eluent flow-rate was 0.7 ml/min and the column temperature was 25°C .

Ascorbic acid was identified by comparing the retention time of the sample peak with that of the ascorbic standard at 254 nm. Quantification was carried out using external standardization.

2.4. Determination of ascorbic acid using enzymatic method

Colorimetric measurements were performed on a Spectrophotometer UV-vis Model DU520 (Beckman, Fullerton CA, USA).

Ascorbic acid was determined following the commercially available test kit instructions for milk samples. It uses the capa-

bility of ascorbate to reduce 3-(4,5-dimethylthiazoyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) in the presence of the electron carrier 5-methylphenazinium methosulfate (PMS) at pH 3.5 to the corresponding formazan molecule, which can be spectrophotometrically quantified by means of its light absorbance in the visible range at 578 nm. For the specific determination of ascorbic acid in a blank sample assay, ascorbic acid is the only fraction of the reducing substances present in the sample to be oxidatively removed by ascorbate oxidase in the presence of oxygen from the air. Dehydroascorbic acid does not react with MTT/PMS.

In this method, the absorbance differences for both the sample and blank sample were determined. Then, the absorbance differences for the blank sample were subtracted from the absorbance differences for the sample ($(A_2 - A_1)$ sample - $(A_2 - A_1)$ blank sample). Finally, ascorbic acid concentrations were calculated with the aid of the extinction coefficient of MTT-formazan, according to the general equation:

$$C = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} (\times \Delta A)$$

where C is the concentration g ascorbic acid/l human milk; V , the final volume (2700 ml); MW , the molecular weight of the substance to be assayed (176.13 g/mol); ε , the extinction coefficient for MTT-formazan at 578 nm ($16.91 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); d , the light path (1.00 cm); v , the sample volume (0.100 ml); and ΔA , the absorbance differences $(A_2 - A_1)$ sample - $(A_2 - A_1)$ blank sample.

The pH of human milk was adjusted to 3.5–4.0 by the addition of citric acid. All pH measurements were made with a MicropH 2001 pH meter (Crison, Alella, Barcelona, Spain). The aliquots of human milk were thawed to around 22 °C in a water bath protected from light, and then they were mixed. Specifically, 1 ml of mixed human milk and approximately 0.01 g citric acid were added into a special centrifuge and filtration tube (Microsep II). The tube was then shaken mechanically for 10 s and centrifuged for 10 min at $3000 \times g$ at 10 °C. Finally, 100 μl of the filtrate was used in the test kit.

2.5. Statistical analysis

The values for ascorbic acid levels reported by the different techniques for each aliquot were compared using paired Student's t -tests. The level of statistical significance was set at 5%. The results were processed using the statistical package SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results and discussion

3.1. Validation of the HPLC method for total Vitamin C and ascorbic acid determination

The determination of the total Vitamin C using the HPLC method was developed following the method described by Furu-sawa, 2001. We optimized the reaction time and the reductor concentration to apply to the human milk.

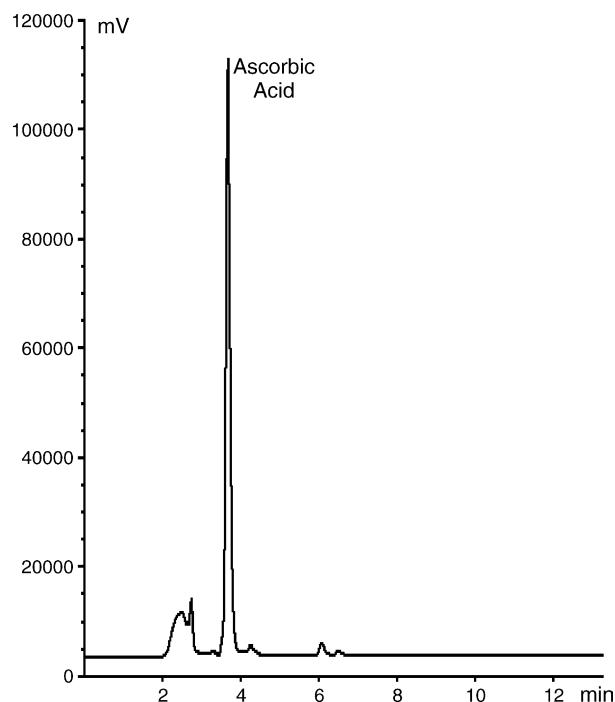


Fig. 1. Chromatogram of ascorbic acid in human milk. Refer to text for the HPLC conditions.

Fig. 1 shows the chromatogram of ascorbic acid standard. The resolution of the peak is good, the relative retention time is 3.7 min, and the baseline is stable.

The following parameters were determined: linearity, limits of detection and quantification, precision and recovery. In order to check the linearity of response to ascorbic acid, two linear regressions were calculated, one for the total Vitamin C determination, and the other for ascorbic acid determination (Table 1). Standard amounts ranged from 0.5 to 100 $\mu\text{g/ml}$ for both determinations.

Table 1

Linearity, precision and recovery of the HPLC method for the total Vitamin C (expressed as ascorbic acid) and ascorbic acid determination

	Total Vitamin C	Ascorbic acid
Linearity ^a ($y = ax + b$)		
a : intercept	8663	12149
b : slope	-3422	-4789
r^2 : determination coefficient	0.999	0.999
Precision		
Repeatability		
Mean (mg/100 ml) \pm S.D. ^b	4.989 \pm 0.13	4.499 \pm 0.14
R.S.D. (%)	2.54	3.09
Reproducibility		
Mean (mg/100 ml) \pm S.D. ^b	4.956 \pm 0.18	4.528 \pm 0.18
R.S.D. (%)	3.63	4.03
Recovery ^c (%)	95.06 \pm 1.12	95.55 \pm 1.18

Pooled human milk from $n = 4$.

^a (y) area of ascorbic acid; (x) concentration of ascorbic acid ($\mu\text{g/ml}$).

^b Standard deviation.

^c Recovery of standard added in human milk expressed as mean (%) \pm deviation standard.

Table 2
Linearity of the HPLC method and enzymatic method

		Linearity ($y = ax + b$)		
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> ²
HPLC method	Standard linearity in human milk ^a	13.071	−13523	0.999
Enzymatic method	Standard linearity in water ^b	0.0972	−0.0142	0.998
	Standard linearity in human milk ^c	0.0671	−0.0004	0.998

a, intercept; *b*, slope; *r*², determination coefficient.

^a Linear regression from adding ascorbic acid to human milk. (*y*) area of ascorbic acid; (*x*) concentration of ascorbic acid (μg/ml).

^b Linear regression from adding ascorbic acid to water. (*y*) the absorbance differences of ascorbic acid, Δ*A*: (*A*₂ − *A*₁) sample − (*A*₂ − *A*₁) blank sample; (*x*) concentration of ascorbic acid (μg/ml).

^c Linear regression from adding ascorbic acid to human milk. (*y*), the absorbance differences of ascorbic acid, Δ*A*: (*A*₂ − *A*₁) sample − (*A*₂ − *A*₁) blank sample; (*x*) concentration of ascorbic acid (μg/ml).

Detection and quantification limits were calculated according to the USP criteria [37] by analyzing a number of blank samples and calculating the standard deviation of the background response. Multiplying the standard deviation by 3 and 10 provides estimations of the limits of detection and quantification, respectively. For ascorbic acid determination, these were 3 and 9 ng, respectively.

Precision was expressed as the relative standard deviation (R.S.D.) of replicate measurements. The repeatability was established by injecting the human milk six times. The reproducibility was determined by analyzing each sample of human milk on six different days. Table 1 shows precision results calculated for both HPLC analyses. These results met the acceptable precision standards proposed by Horwitz [38] for analyte concentrations with a range of 10–50 ppm.

Analyzing a sample five times and comparing the analytical result to the known added value showed the recovery of the method. For estimating the ascorbic acid levels, human milk samples were spiked with ascorbic acid at two fortification levels, 50 and 100% of the estimated initial ascorbic acid amount.

The recovery percentages were satisfactory for ascorbic acid measurement, using the HPLC techniques. The results obtained were acceptable because of these were of 95 and 96% (Table 1).

Table 3
Precision of the HPLC and enzymatic methods for ascorbic acid determination

	HPLC method		Enzymatic method	
	Standard linearity in human milk	Standard linearity in water	Standard linearity in human milk	Test Kit equation
Repeatability				
Mean (mg/100 ml) ± S.D. ^a	4.321 ± 0.13	3.700 ± 0.10	4.148 ± 0.15	2.877 ± 0.10
R.S.D. (%)	3.12	2.76	3.52	3.55
Reproducibility				
Mean (mg/100 ml) ± S.D. ^a	4.346 ± 0.18	3.630 ± 0.15	4.106 ± 0.19	2.848 ± 0.13
R.S.D. (%)	4.07	4.03	4.53	4.56

Pooled human milk from *n* = 4.

^a Standard deviation.

Table 4
Comparison of ascorbic acid percentages between different methods

Method	Ascorbic acid (%)
HPLC method using the linear regression from adding ascorbic acid to water ^a	100
HPLC method using the linear regression from adding ascorbic acid to human milk ^a	97
Enzymatic method using the linear regression from adding ascorbic acid to water ^b	83
Enzymatic method using the linear regression from adding ascorbic acid to human milk ^c	91
Enzymatic method using the Kit equation ^d	63

Percentage with different letters differ significantly (*P* < 0.05).

The conversion of dehydroascorbic to ascorbic acid was efficient because we realized different proofs: we reduced, with DL-dithiothreitol, a standard solution of DHA:AA (50:50) and we proved the conversion was 98%.

3.2. Comparison between the HPLC method and enzymatic method for ascorbic acid determination

The HPLC and enzymatic methods for ascorbic acid determination were compared. Ascorbic acid levels determined using the enzymatic method used the general equation and linear regression. Specifically, two linear regressions were prepared using the enzymatic technique. One plotted the addition of increasing amounts of ascorbic acid to Milli-Q water, while the other plotted the addition of the same amounts of ascorbic acid to human milk. The two linear regressions were linear over the range 0.5–5 μg/ml. For the ascorbic acid determination using the HPLC method, a linear regression was also plotted with human milk. This was linear over the range 0.5–100 μg/ml (Table 2).

The precision of the enzymatic method and HPLC method (using the linear regression from adding ascorbic acid to human milk) was expressed as the relative standard deviation of replicate measurements. The repeatability and reproducibility were determined the same way as for the HPLC method for total Vitamin C determination. Table 3 shows precision results. These results also met the acceptable precision standards proposed by Horwitz [38].

The HPLC method gave comparable results for linearity in water and human milk (Table 4), and we did not find any signifi-

cant difference ($P > 0.05$) between the concentrations of ascorbic acid.

On the contrary, the enzymatic method using the general equation and the two linear regressions reported significantly differing concentrations ($P < 0.05$) of ascorbic acid (Table 4). Concretely, the concentration of ascorbic acid in human milk samples, according to the enzymatic method, ranged from 2.88 to 4.15 mg/100 ml, the lower value resulting from the use of the enzymatic equation (Table 3).

For each sample, the comparison between the two methods was performed on the same day and only was determined the L-ascorbic content, not the total Vitamin C. We observed that the amounts of ascorbic acid reported by the two methods were not identical. The HPLC and enzymatic methods reported significantly differing concentrations ($P < 0.05$) of ascorbic acid, with the latter method giving lower values (Table 4). Thus, whereas the HPLC method nearly completely recovered a given ascorbate concentration, the commercial test kit underestimated it by about 63% when applying the enzymatic kit equation.

In order to analyze the total Vitamin C concentration using the enzymatic method, we added dithiothreitol. However, this reductor interfered with the lecture in the visible range at 578 nm being the determination of the total Vitamin C impossible because of the enzymatic method is a colorimetric technique.

4. Conclusions

The presented results suggest that the proposed HPLC methods are reliable, reproducible, and sensitive techniques for detecting total Vitamin C and ascorbic acid in human milk. In addition, the enzymatic method for ascorbic acid determination in human milk is also a precise method.

However, we believe that the HPLC technique for ascorbic acid determination in human milk provides more satisfactory results than the enzymatic method due to this last method detected only 63% of the amount which was verified using the HPLC method. Furthermore, the enzymatic method does not determine the total Vitamin C because of the reduction of the dehydroascorbic acid to ascorbic acid cannot be measured. It is demonstrated that the HPLC method is an improvement compared with a commercially available test kit for the determination of both the total Vitamin C and ascorbic acid in human milk.

The low recovery of the ascorbic acid in human milk using the enzymatic method suggests that the matrix of human milk could interfere because of the amount of ascorbic acid reported using the linear regression with water was less than that using the linear regression with human milk.

The HPLC method requires fewer reagents and material, and it is simpler and less time-consuming (approximately 20 min instead of 45 min). Further, not being a colorimetric method, it is possible to analyze more human milk samples concurrently than the enzymatic method. The near-absence of sample preparation and the easy of use of these HPLC techniques make them an ideal quality control tool for the food industry.

In conclusion, the drawbacks of this enzymatic method would justify its substitution for a HPLC method.

Acknowledgements

This study was financed by the CeRTA (Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments, Generalitat de Catalunya). Meritxell Romeu Nadal acknowledges financial support from a grant from Generalitat de Catalunya. We also thank mothers of "Alba" for their human milk and Robin Rycroft for revising the English manuscript.

References

- [1] American Academy of Pediatrics: Work Group on Breastfeeding, Pediatrics 100 (1997) 1035.
- [2] The Committee on Nutrition of the American Academy of Pediatrics, Breast-feeding, Pediatrics 62 (1978) 591.
- [3] R.J. Schanler, N.M. Hurst, C. Lau, Clin. Perinatol. 26 (1999) 379.
- [4] G.D. Georgeson, B.J. Szony, K. Streitman, Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 103 (2002) 136.
- [5] G. Baydas, F. Karatas, M.F. Gursu, Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status, Arch Med Res 33 (2002) 276–280.
- [6] N. Hanna, K. Ahmed, M. Anwar, A. Petrova, M. Hiatt, T. Heigyi, Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal. 89 (2004) F518.
- [7] D.W. Thibeault, Am. J. Perinatol. 17 (2000) 167.
- [8] J. Lykkesfeldt, S. Loft, H.E. Poulsen, Anal. Biochem. 229 (1995) 329.
- [9] L. Ahmed, S.K. Nazrul Islam, M.N.I. Khan, S.N. Nahid, Mal. J. Nutr. 10 (1) (2004) 1.
- [10] L. Ahmed, S.K. Nazrul Islam, M.N.I. Khan, S. Huque, M. Ahsan, J. Trop. Pediatr. 50 (6) (2004) 357.
- [11] S.K. Lee, A.A. Kader, Postharvest Biol. Technol. 20 (2000) 207.
- [12] J.A. Tudela, J.C. Espín, M.I. Gil, Postharvest Biol. Technol. 26 (2002) 75.
- [13] W.D. Graham, D. Annette, J. Chromatogr. 594 (1992) 187.
- [14] W.R. Thomas, P.Z. Holth, Clin. Exp. Immunol. 32 (1978) 370.
- [15] B.V. Siegel, Nutrition and immunology, Plenum Press, New York, 1993, p. 167.
- [16] M.R. Bank, A. Kirksey, K. West, G. Giacoia, Am. J. Clin. Nutr. 41 (1985) 235.
- [17] I.H. Buss, F. McGill, B.A. Darlow, C.C. Winterbourn, Acta Paediatr. 90 (2001) 813.
- [18] S.P. Arya, M. Mahajan, P. Jain, Rev. Anal. Chim. Acta 417 (2000) 1.
- [19] P. Wimalasiri, R.B.H. Wills, J. Chromatogr. 256 (1983) 368.
- [20] S.H. Ashoor, W.C. Monte, J. Welty, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67 (1984) 78.
- [21] M.J. Esteve, R. Farré, A. Frígola, J.C. López, J.M. Romera, M. Ramírez, A. Gil, Food Chem. 52 (1995) 99.
- [22] M.A. Kall, C. Andersen, J. Chromatogr. B 730 (1999) 101.
- [23] N. Furusawa, Food Control 12 (2001) 27.
- [24] A. Pérez-Vicente, A. Gil-Izquierdo, C. García-Viguera, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 2308.
- [25] C.L. Steffensen, H.J. Andersen, J.H. Nielsen, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 7392.
- [26] C. Sánchez-Moreno, L. Plaza, B. Ancos, M.P. Cano, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 647.
- [27] K.R. Dhariwal, P.W. Washko, M. Levine, Anal. Biochem. 189 (1990) 18.
- [28] P.W. Washko, W.O. Hartzell, M. Levine, Anal. Biochem. 181 (1989) 276.
- [29] B. Ancos, E.V. González, M.P. Cano, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 4565.
- [30] H. Ostdal, H.J. Andersen, J.H. Nielsen, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 5588.
- [31] J.H. Nielsen, G. Hald, L. Kjeldsen, H.J. Andersen, H. Ostdal, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 2998.
- [32] M.J. Esteve, R. Farré, A. Frígola, J.M. Garcia-Cantabella, J. Chromatogr. B 688 (1997) 345.

- [33] T.A. Bensinger, T.F. Zuck, B. Tolbert, S. McLaughlin, C.C. Peck, M. Knight, *Biochem. Med.* 19 (1) (1978) 118.
- [34] T.Z. Liu, N. Chim, M.D. Kiser, W.N. Bigler, *Clin. Chem.* 28 (1982) 2225.
- [35] W. Lee, S.M. Roberts, R.F. Labre, *Clin. Chem.* 43 (1) (1997) 154.
- [36] C.D. Badrakhan, F. Petrat, M. Holzhauser, A. Fuchs, E.E. Lomonosova, H. de Groot, M. Kirsch, *J. Biochem. Biophys. Methods* 58 (2004) 207.
- [37] The United States Pharmacopeia (USP XXIII), Mack Printing, Easton, 1989, p. 1711.
- [38] W. Horwitz, *Anal. Chem.* 54 (1982) 67A.

Publicación 3

DETERMINACIÓN DE γ - Y α -TOCOFEROLES EN LA LECHE HUMANA POR UN MÉTODO DIRECTO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA CON DETECCIÓN POR UV/VIS Y COMPARACIÓN CON UN DETECTOR DE DIFUSIÓN DE LA LUZ

M. Romeu-Nadal, S. Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater

El término de vitamina E se refiere a un grupo de tocoferoles (α , β , γ , y δ), que difieren en estructura y en biopotencia. El α -tocoferol es la forma más activa, siendo la actividad de los otros tocoferoles un 70-95% menor. La vitamina E es el principal antioxidante lipídico, el cual inhibe la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares.

Dicha vitamina es esencial para los recién nacidos, particularmente para los prematuros, ya que se ha observado que sus niveles en plasma son bajos, sugiriendo una mayor necesidad de ella, por lo que es importante conocer el contenido de vitamina E presente en la leche humana.

El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar un método rápido, directo y simple de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa con un detector UV/VIS para determinar los niveles de γ - y α -tocoferol en la leche humana (Método I). El Método I se basó en la utilización de una columna corta, útil para la determinación rutinaria de un gran número de muestras, evitando la etapa de saponificación, y acortando así el tiempo de análisis. Este método directo fue comparado con dos métodos que requieren saponificación; uno con detección UV/VIS, que cuantificó el γ - y α -tocoferol (Método II), y otro, con detección de difusión de la luz (ELSD) que determinó sólo el α -tocoferol (Método III).

Para el desarrollo del estudio, fue utilizada la leche madura obtenida al comienzo de la primera toma del día, y de ambos pechos de diferentes madres, siendo esta mezclada para obtener un "pool". Las muestras se conservaron a -80°C hasta su análisis. En el estudio se desarrolló y validó el Método I en términos de linealidad, límites de detección y de cuantificación, precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y recuperación. Igualmente, para el Método II se determinó la repetibilidad, y para el Método III la repetibilidad y los límites de detección y cuantificación

Para la optimización de la solución de hidróxido de potasio en la saponificación se estudiaron diferentes concentraciones, y la solución con la que obtuvimos mejores resultados fue la de 8.5% p/v en metanol.

En la optimización de los parámetros cromatográficos se pensó en utilizar el metanol para redissolver las muestras ya que era una de las fases móviles más usadas para tocoferoles en fase reversa. El metanol disolvía completamente las muestras del Método II y III, las cuales contenían solo la fracción lipídica insaponificable, pero no disolvía la grasa total del método directo (Método I). Así para el Método I se probaron diferentes fases de redisolución, siendo la más óptima la de diclorometano:acetonitrilo (3:1). Esta fase también se utilizó para el Método II ya que uno de los objetivos era

comparar el Método I y II. A diferencia de los métodos anteriores, para el Método III se utilizó el metanol para redissolver la muestra.

Del mismo modo, se buscaron diferentes fases móviles para los Métodos I y II, siendo la óptima la de acetonitrilo:metanol:diclorometano en la proporción de 60:38:2 v/v. En cambio, para el Método III, se utilizó como fase móvil el metanol, misma fase usada para redissolver.

Finalmente, se optimizó la temperatura de evaporación del detector ELSD, y se encontró que la temperatura que proporcionaba mejores resultados era la de 60°C.

Los límites de detección y cuantificación encontrados, así como su linealidad, precisión y recuperación demostraron la idoneidad del Método I para determinar el γ - y α -tocoferol en la leche. Los Métodos II y III también fueron precisos. Pero, el Método I proporcionó mejores resultados que los Métodos II y III. Así, el Método II detectó sólo el 76% y el 78% de los niveles de γ - y α -tocoferol, respectivamente, detectados con el Método I. Para el Método III se encontraron los mismos niveles de α -tocoferol que para el Método II. Esta diferencia entre el Método I y los Métodos II y III fue atribuida a la fase de saponificación, la cual podía haber incrementado las pérdidas de analito.

Otro inconveniente del Método III era que sólo podía detectar el α -tocoferol, no el γ -tocoferol, ya que el ELSD es menos sensible que el detector UV/VIS y además en la leche humana el γ -tocoferol se encuentra en cantidades muy bajas.

Además el Método I fue más rápido, más fácil y utiliza menos cantidad de muestra que los Métodos II y III.

En conclusión, el Método I se podría aplicar para determinar el γ - y α -tocoferol en la leche materna, siendo útil tanto para conocer sus contenidos como para estudiar la estabilidad de ésta y poder predecir de este modo su mejor conservación, tanto en los hospitales como en los bancos de leche.

Determination of γ - and α -tocopherols in human milk by a direct high-performance liquid chromatographic method with UV–vis detection and comparison with evaporative light scattering detection[☆]

M. Romeu-Nadal, S. Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater*

Department Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Avda. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain

Received 19 December 2005; received in revised form 17 February 2006; accepted 17 February 2006

Available online 30 March 2006

Abstract

A rapid direct method (Method I) for measuring γ - and α -tocopherols in human milk was developed and validated using reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet/visible (UV–vis) detection. Human milk, with an internal standard (α -tocopherol acetate) added, was diluted in hexane. The chromatographic system consisted of a short column (50 mm \times 2.1 mm I.D., 3 μ m particle size) that allowed the separation of the γ - and α -tocopherols in less than 6 min. The new direct method (Method I) was compared with other methods. Method II (saponification with ultraviolet/visible detection) determined 24% and 22% less γ - and α -tocopherols, respectively. Method III (saponification with evaporative light scattering detection) gave the same values for α -tocopherol content as Method II. However, the amount of sample used in the application of Method III was higher than that used in Method II. Furthermore, Method I uses smaller amounts of solvents, and it is simpler and faster than Methods II or III. Only a small volume of sample is needed, which is an additional advantage for biological assays.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Human milk; Tocopherol; Vitamin E; HPLC; ELSD; Saponification

1. Introduction

The term Vitamin E refers to a group of tocopherols (α , β , γ , and δ), which differ in structure and biopotency. α -Tocopherol is the most active, whereas the activity of the other tocopherols is some 70–95% less. Vitamin E is the main lipophilic antioxidant, which inhibits peroxidation of polyunsaturated fatty acids in cell membranes [1,2].

Vitamin E is essential for infants, particularly preterm neonates. Because their transport capacity for Vitamin E is low and their lipoprotein metabolism is immature, neonates have very low levels of plasma Vitamin E [3,4]. Preterm infants may be especially prone to develop clinical symptoms such as hemolytic anemia, retrolental fibroplasias, intraventricular hemorrhage and bronchopulmonary dysplasia as a result of Vitamin

E deficiency. Because of the lower α -tocopherol concentrations in plasma, the preterm infant has a higher requirement for Vitamin E than the full-term infant. The content of Vitamin E in human milk would influence the Vitamin E status in breast-fed infants.

The tocopherol content of human milk depends on many factors, such as the stage of lactation and maternal diet. The methods used to take samples and to measure the content will affect the results [5–10].

Several methods have been developed to measure tocopherol levels [11–14]. High-performance liquid chromatography (HPLC), using fluorescence [6,15–26] or ultraviolet/visible (UV–vis) [27–33] detection, are currently used to measure α -tocopherol in food. Some HPLC methods use an evaporative light scattering detection (ELSD) [19,21,34] or an electrochemical detector [35–38].

In milk, dairy products and infant formulas, reversed-phase HPLC (RP-HPLC) after saponification is in general use [18,27–29,33,37,39]. Normal-phase HPLC (NP-HPLC) with fluorescence detection is also used in infant formulas [6,15,16,20,40].

[☆] Presented at the 11th Meeting on Instrumental Analysis, Barcelona, 15–17 November 2005.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 4024512; fax: +34 93 4035931.
E-mail address: mclopez@ub.edu (M.C. López-Sabater).

Saponification entails multiple solvent extraction, drying and concentration steps but tocopherols are sensitive to light and air. Thus, such complex procedures may lead to measurement errors [41]. In addition, long exposure to alkaline conditions in saponification significantly decreases tocopherol levels [42,43]. Moreover, most procedures for the saponification of dairy products use high concentrations of potassium hydroxide (50–80%, w/v). Therefore, sample preparation is the key step of the analyses.

Direct lipid extraction without saponification using NP-HPLC with fluorescence detection [20,22–25,44] and RP-HPLC with UV–vis detection [45] have been used to measure tocopherols in infant formulas. The NP-HPLC system with ultraviolet detection has been studied for use in human milk [46].

Here we attempted to develop and validate a rapid, direct and simple RP-HPLC method with UV–vis detection (Method I) to measure γ - and α -tocopherols in human milk. The method is based on the use of a short reversed-phase column suitable for routine analyses of large amounts of samples, which obviates saponification, and may shorten the analysis time. It was compared with two methods that use saponification: one with UV–vis detection (Method II), which measured both γ - and α -tocopherol, and the other with ELSD (Method III) which measured α -tocopherol.

2. Experimental

2.1. Collection of breast milk

Samples of human milk were collected from both breasts by a Chicco manual breast pump (Chicco, Italy), following the manufacturer's instructions, from healthy mothers aged 20–35 years, at the Extraction Unit of the Department. Informed consent was obtained from the participants. All the mothers had had a full term pregnancy. Mature human milk was collected in sterile opaque bottles during the first expression in the morning. The milk from different mothers was immediately pooled, and aliquots of 5 ml were transferred to plastic tubes. This volume was enough to allow the analysis of three methods in triplicate on the same day. The methods could thus be compared. Aliquots were stored at -80°C for no longer than one month before the analysis.

2.2. Chemicals and reagents

Stock standard solutions were prepared by dissolving γ - and α -tocopherol in dichloromethane/acetonitrile (3:1) and stored at -20°C in dark bottles for up to a month. The γ -tocopherol and the α -tocopherol acetate standard were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The α -tocopherol standard, with a purity of 98.6%, and ascorbic acid standard were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

HPLC-grade acetonitrile, HPLC-grade dichloromethane and HPLC-grade methanol were purchased from SDS (Peypin, France), and the *n*-hexane and the light petroleum (20 – 75°C) were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). The Milli-Q water

was purified by passing it through a Millipore Compact Milli-Q water system (Bedford, MA, USA).

2.3. Assay procedure

2.3.1. Method I

The direct method (Method I) to determine γ - and α -tocopherols was developed and validated following a modification of the method described by Brennan et al. [47].

The aliquots of human milk were thawed to around 22°C in a water bath, protected from light, and then mixed. Five hundred microliters of human milk and $100\ \mu\text{l}$ of the internal standard solution (0.25 mg/ml of α -tocopherol acetate in dichloromethane/acetonitrile (3:1)) were poured into a glass tube. The mixture was shaken mechanically for 1 min. One thousand and five hundred microliters of *n*-hexane was then added and the mixture was shaken for further 1 min and centrifuged at 10°C (10 min, $3000 \times g$). The organic phase was evaporated off under nitrogen and the residue was reconstituted in $100\ \mu\text{l}$ of a dichloromethane/acetonitrile (3:1) solution. The resulting solution was passed through a nylon filter ($0.22\ \mu\text{m}$ pore) (Teknokroma, Barcelona, Spain) and transferred to vial inserts and placed in amber vials for analysis by HPLC.

2.3.2. Method II

The γ - and α -tocopherols were measured using saponification, following a modification of the method described by Cayuela et al. [26]. The aliquots of human milk were thawed to around 22°C in a water bath, protected from light, and then mixed. One milliliter of human milk and 30 mg of ascorbic acid were poured into glass tubes. Later, 1.6 ml of saponification solution, constituted by 8.5% potassium hydroxide in methanol, and 0.8 ml of methanol were added. The air was removed from the tubes by displacement with nitrogen. The solution was stirred and placed in a water bath at 70°C for 30 min. The tubes were shaken rigorously every 10 min during the saponification. After 30 min, the tubes were cooled under tap water and 1.6 ml of light petroleum was added to each tube. The procedure was repeated twice. The three ether extracts were combined in a new tube. The new, combined ether extract was repeatedly washed in distilled water until the water was neutral to 1% phenolphthalein solution (no visible pink). The organic phase containing γ - and α -tocopherols was finally evaporated completely under nitrogen. The tocopherols were reconstituted in $100\ \mu\text{l}$ of dichloromethane/acetonitrile (3:1) solution and filtered as described for Method I. Samples were then transferred to vial inserts and placed in amber vials for analysis by HPLC.

2.3.3. Method III

The α -tocopherol was measured using saponification, following a modification of the method described by Cayuela et al. [26]. The aliquots of human milk were thawed to around 22°C in a water bath, protected from light, and then mixed. Five milliliters of human milk and 120 mg of ascorbic acid were poured into glass tubes. Later, 8 ml of saponification solution, constituted by 8.5% potassium hydroxide in methanol, and 4 ml of methanol were added. The air was removed from the tubes by

displacement with nitrogen. The solution was stirred and placed in a water bath at 70 °C for 30 min. The tubes were shaken rigorously every 10 min during the saponification. After 30 min, the tubes were cooled under tap water and 8 ml of light petroleum was added to each tube. The procedure was repeated twice. The three ether extracts were combined in a new tube. The new, combined ether extract was repeatedly washed in distilled water until the water was neutral to 1% phenolphthalein solution. The organic phase containing α -tocopherol was finally evaporated completely under nitrogen. The α -tocopherol was reconstituted in 50 μ l of methanol and filtered as described for Method I. Samples were then transferred to vial inserts and placed in amber vials for analysis by HPLC.

2.4. High-performance liquid chromatographic analytical conditions

The tocopherols were separated in less than 6 min using a Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) Model 1050 pump system, a Waters 717 plus Autosampler Milford (MA, USA). The analytical column was a Pinnacle II C18 (50 mm \times 2.1 mm I.D., 3 μ m particle size) protected by a guard cartridge system (C18, 1 cm) from Restek (Bellefonte, PA, USA).

An ultraviolet/visible detector, SPD-10 AV VP Shimadzu (Kyoto, Japan) and an HP-3365 Series II Chemstation were used in both Method I and Method II. Detection was performed at 292 nm. In Method III, an ELSD system, Model 750/14, ACS, Macclesfield, UK and an HP-3365 Series II Chemstation were used. The ELSD temperature was 60 °C and the gas flow was 10 l/min.

Isocratic chromatographic separation was carried out using a mobile phase of acetonitrile:methanol:dichloromethane (60:38:2, v/v) in Methods I and II. In Method III, a mobile phase of methanol was used.

In all three methods, 5 μ l of the reconstituted sample was injected into the HPLC system, the eluent flow-rate was 0.2 ml/min and the column temperature was 30 °C. The working standard solutions were always analyzed together with the samples, and in Method I peak-area ratios were used for calculations using internal standardization. Quantification in Methods II and III was carried out using external standardization.

2.5. Statistical analysis

The values for γ - and α -tocopherol levels reported for each aliquot by the three methods were compared using paired Student's *t*-tests. The level of statistical significance was set at 5%. The results were processed using the statistical package SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

3. Results and discussion

3.1. Validation of the Method I

Fig. 1 shows the chromatogram of γ - and α -tocopherols and α -tocopherol acetate corresponding to standards (A) and to human milk (B) given by UV-vis detection (Method I). The

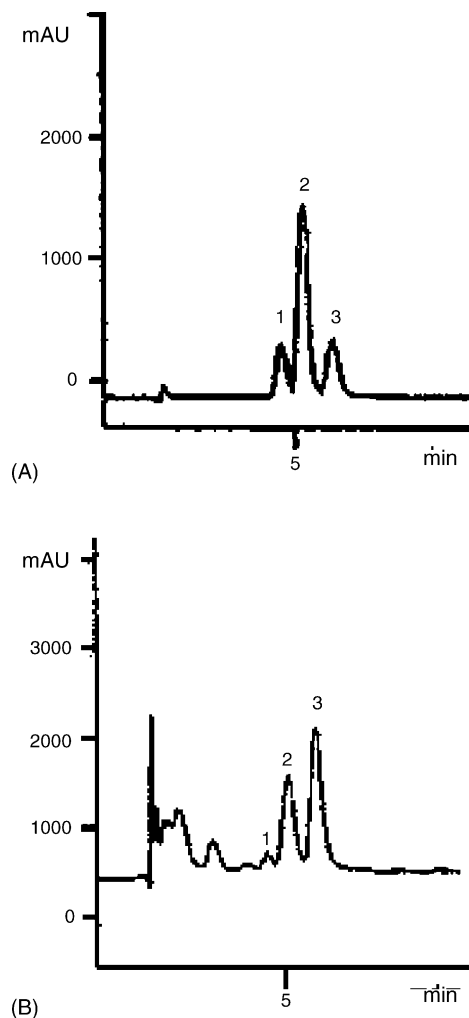


Fig. 1. Chromatograms corresponding to standards (A) and to human milk (B) analyzed with UV-vis detection (Method I). Peak identification: (1) γ -tocopherol; (2) α -tocopherol; (3) α -tocopherol acetate (SI). Chromatographic conditions see text.

retention times were 4.7, 5.3 and 6.0 min for γ -tocopherol, α -tocopherol and tocopherol acetate, respectively.

The following parameters were determined for Method I: linearity, limits of detection and quantification, precision and recovery. In order to check the linearity of response to γ - and α -tocopherol, two linear regressions were calculated. The peak area ratio between α -tocopherol and α -tocopherol acetate (*y*) versus the amount of α -tocopherol (*x*, μ g) was linear in the range tested. γ -Tocopherol also showed acceptable linearity, with a correlation coefficient over 0.999, in the range studied (Table 1).

Detection and quantification limits were calculated according to the USP criteria [50] by analyzing 10 blank samples and calculating the standard deviation of the background response. Multiplying the standard deviation by 3 and 10 provides estimations of the limits of detection and quantification, respectively (Table 2).

The precision of Method I is expressed as the relative standard deviation (RSD) of 10 replicate measurements (Table 2). These results also meet the acceptable precision standards proposed by Horwitz [51].

Table 1
Linearity of the three methods

		Linearity ($y = ax + b$)			
		<i>a</i>	<i>b</i>	r^2	Range (mg/L)
Method I	γ -Tocopherol	1.85	0.05	0.999	2–200
	α -Tocopherol	2.04	0.07	0.999	2–200
Method II	γ -Tocopherol	161325	–599.90	0.999	2–200
	α -Tocopherol	161042	–428.65	0.999	2–200
Method III	α -Tocopherol	11554	–5651.3	0.999	150–750

y: peak-area ratio between tocopherol and internal standard in Method I and peak-area of tocopherol in Methods II and III; *x*: amount of tocopherol (μg); r^2 , determination coefficient.

Analyzing a sample five times and comparing the analytical result to the known added value showed the recovery of the method. Human milk samples were spiked with γ - and α -tocopherol standards at two levels, 50% and 100% of the estimated initial γ - and α -tocopherol amount. To estimate the initial quantity for analytes, the same human milk sample without spiking was used as a reference value. The recovery percentages given by Method I were satisfactory for α -tocopherol measurement (Table 2).

3.2. Comparison between methods

Unlike a UV–vis detector, the ELSD system is universal. It does not require a chromophore in the analyte. Any molecule present in the injection volume, if the concentration is appropriate, will be detected by the ELSD. Initially, HPLC with both ELSD and UV–vis detection methodologies were applied to evaluate tocopherol levels in human milk injected directly into

the column. The tocopherols were detected by UV–vis with no interfering peaks. The tocopherols were not clearly separated or detected by ELSD owing to the presence of other compounds in the milk which created interference peaks in the chromatogram. Therefore, saponification was necessary for tocopherol determination using ELSD. Moreover, the methods with UV–vis detection (Methods I and II) used less sample (0.5–1 ml) than the method with ELSD (Method III) (5 ml). However, the γ -tocopherol cannot be detected by ELSD (Method III) because its amount in the human milk is lower than the α -tocopherol amount. Moreover, ELSD system is less sensitive than UV–vis detection. The limits of detection and quantification for Method III were 518 and 590 ng, respectively (Table 2). These limits were calculated according to the USP criteria [48].

Tocopherols are easily oxidized, especially by heat, light, high pH and free radicals. This is critical during extraction and in the delay before analysis. Nevertheless, the addition of antioxidants is not considered necessary, except in the case of simultaneous analysis of more labile compounds or special matrices, or when saponification is applied [52]. So, ascorbic acid was added as an antioxidant in Methods II and III.

Fig. 2 shows the chromatogram of α -tocopherol corresponding to standard (A) and to human milk (B) given by ELSD (Method III). The retention time was 3.8 min for α -tocopherol. The chromatographic profile for γ - and α -tocopherols given by Method II is the same than Method I (Fig. 1), because the same chromatographic conditions are used.

In order to check the linearity of response to γ - and α -tocopherols, two linear regressions were calculated for Method II, and a linear regression was calculated for α -tocopherol for Method III. Both of them were linear in the range tested (Table 1).

The RSDs for 10 replicates of the sample given by Method II were 3.8% and 4.3% for γ - and α -tocopherol, respectively. The RSD given by Method III was 4.9% for α -tocopherol (Table 2). Both are below the limit for intra-laboratory variability analysis [51]. The precision for Methods II and III was obtained from the same sample and number of replicates than Method I in terms that they can be comparable.

For each sample, the three extraction methods were performed on the same day for comparative purposes. However, the amounts of γ - and α -tocopherol reported by Method II were significantly lower ($P < 0.05$). While the recovery given by Method

Table 2
Sensitivity and precision of all the methods and recovery of the Method I

	γ -Tocopherol	α -Tocopherol
Method I		
Detection limit ^a (ng)	5.01	3.96
Quantification limit ^a (ng)	8.03	6.98
Repeatability		
Mean (mg/L) \pm SD ^b	0.43 \pm 0.01	4.72 \pm 0.17
RSD (%)	3.41	3.54
Reproducibility		
Mean (mg/L) \pm SD ^b	0.44 \pm 0.02	4.69 \pm 0.19
RSD (%)	3.88	4.14
Mean recovery (%) \pm SD ^b	95.05 \pm 1.80	95.57 \pm 1.73
Method II		
Repeatability		
Mean (mg/L) \pm SD ^b	0.33 \pm 0.01	3.71 \pm 0.16
RSD (%)	3.76	4.27
Method III		
Detection limit (ng)		518
Quantification limit (ng)		590
Repeatability		
Mean (mg/L) \pm SD ^b		3.72 \pm 0.18
RSD (%)		4.94

^a Same values obtained by Method I and Method II.

^b Standard deviation.

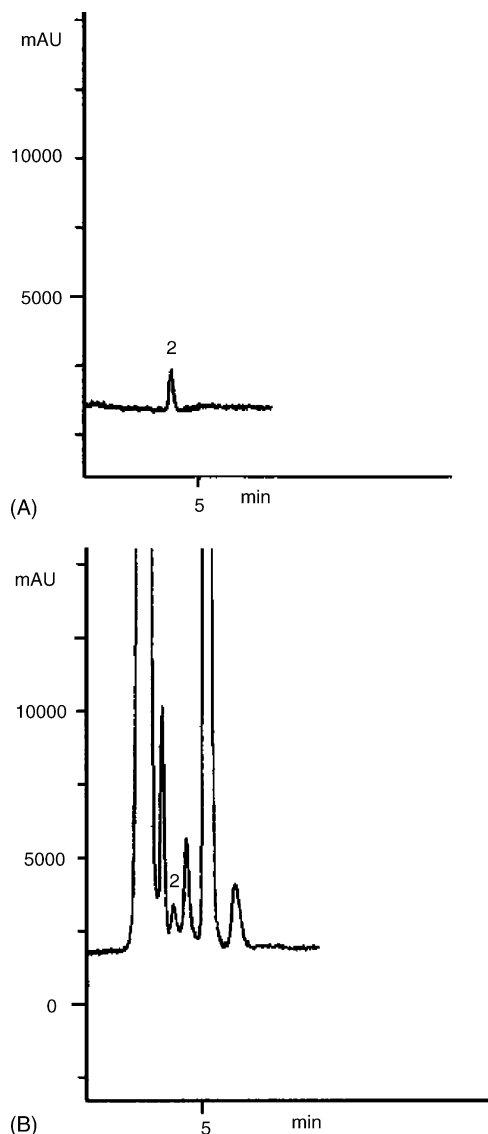


Fig. 2. Chromatograms corresponding to standard (A) and to human milk (B) analyzed with ELSD (Method III). Peak identification: (2) α -tocopherol. Chromatographic conditions see text.

I was almost complete, Method II quantified only 76% and 78% of the γ - and α -tocopherol levels given by Method I. No significant differences were found ($P > 0.05$) for α -tocopherol between Method II and III, but the α -tocopherol reported by Method III was significantly lower ($P < 0.05$) than that given by Method I. This discrepancy between the direct method (Method I) and saponification methods (Methods II and III) is attributed to the saponification step, which may have increased the loss of the analyte.

3.3. Optimization of the potassium hydroxide solution

Initially, a potassium hydroxide solution (50%, w/v) diluted in methanol:distilled water (50:50, v/v) was used following most of the references about dairy products, but gelatin was formed during saponification. So we assayed lower concentrations of

potassium hydroxide. Finally, a potassium hydroxide solution of 8.5% (w/v) in methanol was used.

3.4. Optimization of the sample redissolution phase and the mobile phase

The mobile phase most commonly used for tocopherol determination in RP-HPLC is methanol. Thus, we attempted to redissolve the sample in methanol alone, following the method described by Gonzalez–Corbella, 1994 [48]. Methanol dissolved the dried samples in the saponification methods (Methods II and III), but not in the direct method (Method I). The dried samples in the Method I contained the total fat of human milk, unlike the samples in the Methods II and III that only contained the unsaponifiable lipid fraction. Therefore, sample redissolution by the direct method was assayed with different percentages of dichloromethane and acetonitrile. A solution of dichloromethane:acetonitrile (3:1) was the optimum reconstitution phase by the Method I. The same phase was used in Method II because one of the aims of the study was to compare the saponification effect using the same detector (Methods I and II). Therefore, for the mobile phase to be used in Methods I and II, the following proportions of acetonitrile:methanol:dichloromethane were assayed in: 50:45:5; 45:45:10; 60:38:2 and 60:35:5 (v/v). The best peak separation was obtained with an acetonitrile:methanol:dichloromethane (60:38:2, v/v) mixture.

In contrast, in Method III (saponification step), which uses a different detector (ELSD) than Methods I and II (UV–vis detector), methanol was suitable as both a redissolution phase and mobile phase because the sample in this method could be dissolved with methanol.

3.5. Optimization of the ELSD temperature

In the optimization of the ELSD parameters, the evaporating temperature was a critical factor in the signal response. At low temperature, solvent evaporation was incomplete; at high temperature, the detector response decreased, owing to the decrease in particle size by insufficient vaporization of the nebulized analytes in the drift tube. Taking into account that the methanol was the mobile phase with ELSD, different evaporating temperatures were tested with α -tocopherol standard solution by the Method III, namely: 50, 55, 60, 65 and 70 °C. The optimum evaporating temperature was 60 °C [49].

4. Conclusions

Our results indicate that Method I is suitable for measuring γ - and α -tocopherols in human milk, since it showed acceptable precision, accuracy and sensitive detection and quantification limits. Methods II and III were also precise. Method III cannot detect γ -tocopherol because ELSD is less sensitive than the UV–vis detector. The short column used in the three methods allowed separation of the tocopherols in less than 6 min.

We believe that Method I is more satisfactory than Methods II or III. It is simpler and uses smaller amounts of solvents than

Methods II and III. It also obviates the saponification step and manipulation is minimized. In addition, only a small amount of sample is needed.

Method I can be applied in the study of human milk stability in order to predict the best conservation of human milk both in hospitals and in human milk banks.

Acknowledgements

This study was financed by the CeRTA (Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments, Generalitat de Catalunya). Meritxell Romeu Nadal acknowledges financial support from a grant from Generalitat de Catalunya. We also thank “*Federació Catalana de Grups de Suport a la Lactància Materna*” for the human milk and Robin Rycroft for revising the English manuscript.

References

- [1] H. Sies, *Exp. Physiol.* 82 (1997) 291.
- [2] R. Brigelius-Flohe, M.G. Traber, *FASEB J.* 13 (1999) 1145.
- [3] P. Haga, G. Lunde, *Acta Paediatr. Scand.* 67 (1978) 735.
- [4] P. Haga, S. Kran, *Am. J. Clin. Nutr.* 36 (1982) 1200.
- [5] L. Jansson, B. Akesson, L. Holmberg, *Am. J. Clin. Nutr.* 34 (1981) 8.
- [6] E.L. Syväoja, V. Piironen, P. Varo, P. Koivistoinen, K. Salminen, *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 55 (1985) 159.
- [7] P.A. Moffatt, C.J. Lammi-Keefe, A.M. Ferris, R.G. Jensen, *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 6 (1987) 225.
- [8] M. Haug, C. Laubach, M. Burke, G. Harzer, *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 6 (1987) 605.
- [9] E.R. Boersma, P. Offringa, F.A.J. Muskiet, M. Chase, I. Simmons, *Am. J. Clin. Nutr.* 53 (1991) 1197.
- [10] M.-C. Zheng, G.-F. Zhang, L.-S. Zhou, X.-G. Guo, Y.-F. Quan, *Biomed. Environ. Sci.* 6 (1993) 259.
- [11] R.H. Bunnell, *Lipids* 6 (1971) 245.
- [12] D.B. Parrish, *Crit. Rev. Food Sci.* (1980) 161.
- [13] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, *J. Chromatogr. A* 935 (2001) 3.
- [14] R. Eitenmiller, J. Lee (Eds.), *Vitamin E—Food Chemistry, Composition, and Analysis*, Marcel Dekker, New York, 2004, p. 323.
- [15] J.N. Thompson, G. Hatina, *J. Liq. Chromatogr.* 2 (1979) 327.
- [16] S. Tuan, T.F. Lee, C.C. Chou, Q.K. Wei, *J. Micronutr. Anal.* 6 (1989) 35.
- [17] C.J. Hogarty, C. Ang, R.R. Eitenmiller, *J. Food Comp. Anal.* 2 (1989) 200.
- [18] H.E. Indyk, *Analyst* 115 (1990) 1525.
- [19] G.W. Chase, C.C. Akoh, R.R. Eitenmiller, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (8) (1994) 877.
- [20] G.W. Chase, R.R. Eitenmiller, A.R. Long, *J. Liq. Chromatogr.* 20 (1997) 3317.
- [21] C. Leray, M. Andriamampandry, G. Gutbier, J. Cavadenti, C. Klein-Soyer, C. Gachet, J.P. Cazenave, *J. Chromatogr. B* 696 (1997) 33.
- [22] G.W. Chase, A.P. Reid, R.R. Eitenmiller, A.R. Long, *J. AOAC Int.* 81 (1998) 453.
- [23] G.W. Chase, A.R. Long, R.R. Eitenmiller, *J. AOAC Int.* 81 (1998) 577.
- [24] G.W. Chase, A.R. Long, R.R. Eitenmiller, *J. AOAC Int.* 81 (1998) 582.
- [25] N. Rodrigo, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 97.
- [26] J.M. Cayuela, M.D. Garrido, S.J. Bañón, J.M. Ros, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1120.
- [27] M. Careri, M.T. Lugari, A. Mangia, P. Manini, S. Spagnoli, *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 801.
- [28] S. Albalá-Hurtado, S. Novella-Rodríguez, M.T. Veciana-Nogués, A. Mariné-Font, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 243.
- [29] L. Gámiz-Gracia, A. Velasco-Arjona, M.D. Luque de Castro, *Analyst* 124 (1999) 801.
- [30] F.J. Rupérez, C. Barbas, M. Castro, E. Herrera, *J. Chromatogr. A* 839 (1999) 93.
- [31] D. Blanco, M.P. Fernández, M.D. Gutiérrez, *Analyst* 125 (2000) 427.
- [32] C. Turner, L. Mathiasson, *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 275.
- [33] A. Escrivá, M.J. Esteve, R. Farré, A. Frígola, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 313.
- [34] K. Warner, T.L. Mounts, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67 (1990) 827.
- [35] M. Zamarreño, A. Perez, M. Perez, J. Mendez, *J. Chromatogr.* 623 (1992) 69.
- [36] A. Sanchez-Perez, M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, J. Hernández-Méndez, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 229.
- [37] M.M. Delgado, A. Sánchez, M.C. Gomez, M.A. Moro, J. Hernández, *Analyst* 120 (1995) 2489.
- [38] M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, A. Sanchez-Perez, J. Hernández-Méndez, *J. Chromatogr. A* 935 (2001) 77.
- [39] M.J. González-Corbella, M. Tortras-Biosca, A.I. Castellote-Bargalló, M.C. López-Sabater, *Food Chem.* 66 (1999) 221.
- [40] O. Heudi, M.J. Trisconi, C.J. Blake, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 115.
- [41] F. Dionisi, J. Prodolliet, E. Tagliaferri, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72 (1995) 1505.
- [42] F.J. Rupérez, C. Barbas, M. Castro, S. Martínez, E. Herrera, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 483.
- [43] E. Gimeno, A.I. Castellote, R.M. Lamuela-Raventós, M.C. de la Torre, M.C. López-Sabater, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 251.
- [44] E. Miquel, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, G. Clemente, *Int. Dairy J.* 14 (2004) 1003.
- [45] B. Rodas, S. Morera, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater, *J. Chromatogr. A* 1018 (2003) 197.
- [46] J.E. Chappell, T. Francis, M.T. Clandinin, *Nutr. Res.* 6 (1986) 849.
- [47] L.A. Brennan, G.M. Morris, G.R. Wasson, B.M. Hannigan, Y.A. Barnett, *Br. J. Nutr.* 84 (2000) 195.
- [48] M.J. Gonzalez-Corbella, N. Lloberas-Blanch, A.I. Castellote-Bargallo, M.C. López-Sabater, M. Rivero-Urgell, *J. Chromatogr. B* 660 (1994) 395.
- [49] A.M. van Nederkassel, V. Vijverman, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 230.
- [50] *The United States Pharmacopeia (USP XXIII)*, Mack Printing, P.A. Easton, Mack Publ., 22th rev., 1989, p. 1711.
- [51] W. Horwitz, *Anal. Chem.* 54 (1982) 67A.
- [52] F.J. Rupérez, D. Martín, E. Herrera, C. Barbas, *J. Chromatogr. A* 935 (2001) 45.

Publicación 4**EFFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN SOBRE LAS VITAMINAS C Y E Y SOBRE LOS ÁCIDOS GRASOS DE UN “POOL” DE LECHE HUMANA**

M. Romeu-Nadal, A.I. Castellote, A. Gayà, M.C. Lopez-Sabater

La leche humana es el alimento más adecuado para la alimentación del lactante durante los seis primeros meses de vida. En ausencia de una adecuada lactancia por parte de la madre, la primera opción es la alimentación con la leche humana procedente de los bancos de leche, sobretodo para los prematuros y para los recién nacidos enfermos. La leche de las donantes debe ser pasteurizada antes de subministrarla a los recién nacidos para evitar la transmisión de enfermedades.

La pasteurización de la leche podría afectar a los niveles de las vitaminas C y E y de los ácidos araquidónico (AA) y docosahexaenoico (DHA) debido a su inestabilidad frente a la oxidación.

Las vitaminas C y E son importantes en el recién nacido, tanto desde un punto de vista de su actividad antioxidante, como de su acción en el sistema inmune. Igualmente, el DHA y el AA tienen mucha importancia durante este periodo de la vida en que el cerebro y la retina están en desarrollo.

El objetivo de este estudio fue determinar si las concentraciones de vitamina C y E y los porcentajes de AA y DHA se afectaban con la pasteurización.

Para el desarrollo del estudio fue utilizada la leche madura obtenida al comienzo de la primera toma del día, y en ambos pechos de diferentes madres de edades entre 20 y 35 años, siendo esta mezclada para obtener un “pool”. Éste se dividió en tres grupos de 20 alícuotas de 5 ml cada grupo: leche fresca, leche pasteurizada a 62.5°C durante 30 minutos (pasteurización lenta) y leche pasteurizada a 100°C durante 5 minutos (pasteurización rápida). Cada método de pasteurización se realizó por duplicado (10 alícuotas por tratamiento). Éstos dos métodos de pasteurización de la leche humana son los más utilizados a nivel mundial. Las alícuotas se conservaron a -80°C hasta su pasteurización, y una vez pasteurizadas se volvieron a conservar a -80°C hasta su análisis.

De cada muestra se analizaron las concentraciones de vitamina C total (ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico), de ácido ascórbico, y de α - y γ -tocoferol, así como los porcentajes de los ácidos araquidónico y docosahexaenoico.

La pasteurización con el método lento y con el método rápido disminuyeron significativamente la concentración de vitamina C total en un 12% y un 29%, respectivamente, comparado con las muestras no pasteurizadas. Estas pérdidas fueron mayores cuando se determinó únicamente el ácido ascórbico (26% y 41%, respectivamente).

Lo mismo se observó en las concentraciones de los α - y γ -tocoferoles, las pérdidas producidas fueron entre el 13 y el 17% para el método lento, y entre el 32 y 34% para el

rápido, respectivamente. Sin embargo, los dos métodos de pasteurización aplicados no produjeron cambios en los porcentajes de los ácidos grasos.

En conclusión, para limitar las pérdidas de vitamina C y E en la leche humana, se recomienda la pasteurización a 62.5°C durante 30 minutos en lugar de la pasteurización a 100°C durante 5 minutos. Además, proponemos el ácido ascórbico como marcador de la estabilidad de la leche humana.

La publicación “**Effect of Pasteurization on Vitamins C and E and Fatty Acids in Pooled Mature Human Milk**” con los autores M. Romeu-Nadal, A. I. Castellote, A. Gayà y M. C. López-Sabater fue enviada a la revista *Journal of Dairy Science* el 10 de julio del 2006. A continuación se adjunta el e-mail de recepción de la revista.

Data: Mon, 10 Jul 2006 11:03:57 -0400 (EDT)
De: adsa@assoqh.org
A: mromeu@ub.edu
Assumpte: Journal of Dairy Science - Manuscript JDS-06-0442

July 10th, 2006

Dear Meritxell Romeu-Nadal:

This e-mail is to inform you that the following manuscript submitted to the Journal of Dairy Science, for which you are a contributing author, has been successfully uploaded to JDS Manuscript Central:

Manuscript Title: Effect of Pasteurization on Vitamins C and E and Fatty Acids in Pooled Mature Human Milk
Manuscript Number: JDS-06-0442

The corresponding author for your manuscript will be able to track the progress of the review by logging into <http://jds.manuscriptcentral.com>.

Thank you for your interest in Journal of Dairy Science.

Gary Rogers, Editor-in-Chief
Journal of Dairy Science

Pasteurization of human milk

M. Romeu-Nadal

Banked human milk is an alternative for the care and treatment of infants, overcoat premature and sick newborns. To avoid the transmission of infective microorganisms, donor milk must be pasteurized, and this process could result in the loss of important compounds for infants like vitamins C and E, and polyunsaturated fatty acids of human milk.

Effect of pasteurization in human milk

Effect of Pasteurization on Vitamins C and E and Fatty Acids

in Pooled Mature Human Milk

M. Romeu-Nadal,* A. I. Castellote, *A. Gayà, † and M. C. López-Sabater¹**

* Dept. Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Avda. Joan XXIII, s/n, E-08028 Barcelona, Spain

† Banc de Llet Materna de les Illes Balears. Rosselló i Caçador, 20, E-07004 Palma de Mallorca, Spain

¹Corresponding author: M.C. López-Sabater; e-mail: mclopez@ub.edu

ABSTRACT

Vitamins C and E and unsaturated fatty acids are heat-sensitive components and their concentrations in human milk could be affected by pasteurization. To ascertain this possible variability, the concentrations of total vitamin C, ascorbic acid, and α - and γ -tocopherols, and the percentages of fatty acids in samples of human milk were determined. Concretely, two pasteurization methods were evaluated, slow- (62.5°C, 30 min) and fast-heat (100°C, 5 min). Both pasteurization methods significantly decreased the concentrations of total Vitamin C (12% and 29%), ascorbic acid (26% and 41%), α -tocopherol (17% and 34%) and γ -tocopherol (13% and 32%), respectively. Vitamins C and E play a crucial role in anti-oxidant activity and immunomodulation in human milk. However, milk fatty acids, including the polyunsaturated long chain fatty acids essential for retinal function and brain development, are not affected by either pasteurization method. On the basis of these observations, we propose that slow-heat method be used to pasteurize human milk. In addition, we propose ascorbic acid as a marker of the stability of human milk.

(Key words: ascorbic acid, fatty acid, pasteurization, tocopherol)

Abbreviation Key: AA = arachidonic acid; DHA = docosahexaenoic acid; HMBANA = Human Milk Banking Association of North America; LC-PUFAs = long-chain polyunsaturated fatty acids.

INTRODUCTION

Breast milk is an ideal nutrient for term and pre-term infants up to 6 months of age (The Committee on Nutrition of the American Academy of Pediatrics, 1978). It improves host defenses, digestion and absorption of nutrients, gastrointestinal function, and neurodevelopment (Schanler et al., 1999). Breast milk offers several nutritional and immunological advantages. It contains defense factors such as secretory IgA antibodies, free secretory component, lysozyme, and lactoferrin, which protect the infant's mucosal surfaces (Sollid, 2002).

In the absence of an adequate supply of breast milk, mothers are offered term breast from human milk banks, which collect, process, and store milk from healthy lactating women. These banks apply strict infection control procedures to milk donations, thereby ensuring that this milk provides a safe and immunologically beneficial feeding for infants (Balmer and Wharton, 1992; Arnold, 2000). Banked human milk is an alternative for the care and treatment of premature and low-birth-weight neonates, and sick newborns and infants with severe infectious disease, immunodeficiency, serious intestinal illness, intractable diarrhea, and heterolog protein intolerance (Góes et al., 2002).

Donor milk must be pasteurized before it is given to infants to avoid the transmission of infective microorganisms (Lawrence, 1989). Several pasteurization methods have been developed for this purpose (Lepri et al., 1997; Henderson et al., 1998; Resto et al., 2001; Israel-Ballard et al., 2005). Pasteurization, most often by the Holder Technique (62.5°C, 30 min) according to the Human Milk Banking Association of North America (**HMBANA**) (Human milk banking Association of North America, 2005), results in the loss of variable amounts of milk IgA, IgM, IgG, lactoferrin, several

vitamins, and other components (Garza et al., 1986). Other method of pasteurization breast milk currently used in United States is fast-heat pasteurization (100°C, 5 min) (Resto et al., 2001).

Vitamins E (specifically α - and γ -tocopherols) and C are crucial for anti-oxidant activity and immunomodulation (Jensen, 1995). Many of the disorders common to pre-term infants are thought to be due to an imbalance between anti-oxidizing capacity and oxidative stress (Thibeault, 2000). Pre-term infants show reduced anti-oxidizing capacity (Georgeson et al., 2002; Hanna et al., 2004) and are often exposed to oxidant stress caused by infection, mechanical oxygen ventilation, intravenous nutrition and blood transfusions.

Long-chain polyunsaturated fatty acids (**LC-PUFAs**), specifically arachidonic acid (C20:4 n-6, **AA**) and docosahexaenoic acid (C22:6 n-3, **DHA**), are of major importance during the perinatal period, in which the brain and retina are developing, and therefore affect visual acuity and learning capacity (Neuringer, 2000; Innis, 2004).

Because of vitamins E and C are sensitive to light, oxygen and temperature (Vidal-Valverde et al., 1993; Miquel, 2004), their concentrations could be affected by pasteurization (Brátová and Vávra, 1981; Trifonova et al., 1981; Jandal, 1996).

Studies about the effects of pasteurization on total fat content and fatty acids in human milk report that these components are unaltered by pasteurization at 62.5°C for 30 min (Lepri et al., 1997; Henderson et al., 1998; Fidler et al., 2001). However, few and old studies exist on the stability of vitamins C and E in the pasteurization of human milk (Randoin and Perroteau, 1950; Brátová and Vávra, 1981; Erb et al., 1981; Trifonova et al., 1981; Zoeren-Grobbe et al., 1987) and goat or bovine milk (Kylae-Siurola and Antila, 1972; Andersson and Öste, 1994; Jandal, 1996). Here we assessed the effect of pasteurization using a slow-heat (62.5°C, 30 min) and a fast-heat (100°C, 5

min) method on the composition of total vitamin C, ascorbic acid, α - and γ -tocopherols, and fatty acids in human milk.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection

The same volume of mature human milk were collected from both breasts by means of a Chicco manual breast pump (Chicco®, Italy), following the manufacturer's instructions, from healthy mothers aged 20-35 years, at the Extraction Unit of the department. Informed consent was obtained from the participating mothers. All the mothers involved had full term pregnancies. Human milk was collected into sterile opaque bottles during first expression in the morning. The milk was immediately pooled and divided into three groups of 20 aliquots each group to be processed as follows: unprocessed (unpasteurized), slow-heat method, and fast-heat method. Unpasteurized aliquots were frozen immediately at -80°C (maximum 1 month) and thawed to around 22°C in a water bath protected from light at the time of processing.

Pasteurization Method

We evaluated two pasteurization methods, slow- and fast-heat, currently used to treat human milk in the United States. Pasteurization treatments were done by duplicate (10 aliquots each treatment). For the slow-heat method, pasteurization was performed by the Holder technique, following the HMBANA protocol (2005), by submerging the glass tubes in a shaking water bath maintained at a temperature of 62.5°C for 30 minutes. For the fast-heat method (Resto et al., 2001), a glass tube was submerged with agitation for 5 minutes at 100°C in the same water bath. The pasteurized samples were submerged immediately at -20°C for 10 minutes in ice slurry and then frozen at -80°C

(maximum 1 month) until analyses. To examine the compounds, the aliquots were thawed to around 22°C in a water bath protected from light, and then mixed.

Total vitamin C and ascorbic acid determination

Total vitamin C and ascorbic acid alone were measured following the direct method described by Romeu et al. (2006a). To analyze total vitamin C content, dehydroascorbic acid was reduced to ascorbic acid with dithiothreitol. Ascorbic acid was resolved by reversed-phase high-performance liquid chromatography (C-18) using a mobile phase of Milli-Q water with acetic acid (0.1% v/v) and methanol in a relative proportion of 95:5 v/v and was detected at 254 nm.

Vitamin E determination

α - and γ -tocopherols were separated and quantified with reversed-phase high-performance liquid chromatography (C-18) using a mobile phase of acetonitrile: methanol: dichloromethane (60:38:2v/v) following the direct method described by Romeu et al. (2006b). Human milk, with the addition of an internal standard (α -tocopherol acetate), was diluted in hexane. The dried sample was reconstituted in a dichloromethane:acetonitrile (3:1) solution. Detection was performed at 292 nm.

Fatty acids determination

Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared with sodium methylate and methanolic boron trifluoride (BF₃) and dissolved in hexane, following the method

described by López-López et al. (2001). Fatty acids were separated and quantified with fast gas chromatography.

Fast gas chromatographic analyses were performed on a Shimadzu GC-2010 gas chromatograph (Kyoto, Japan) equipped with a flame ionization detector and a Shimadzu AOC-20i Autoinjector. Separation of FAME was carried out on a capillary column (10 m x 0.10 mm I.D) coated with a Varian VF-23 ms stationary phase (high cyanopropyl phase, 0.10 μm film thickness) from Varian (Palo Alto, USA). Operation conditions were as follows: the split-splitless injector was used in split mode with a split ratio of 1:100. The injection volume of the sample was 1 μl . The injector and detector temperatures were kept at 250°C and 270°C, respectively. The temperature program was as follows: initial temperature: 120°C, increased at 35°C/min until 175°C (kept 0.5 min), increased at 20°C/min until 250°C. Helium was used as the carrier gas, with a linear velocity of 59.4 cm/s (average at 120°C). Pressure: 482 kPa; detector gas flows: H₂: 50 ml/min; air: 400 ml/min; make-up gas (N₂): 50 ml/min. Sampling frequency: 50 Hz. Data acquisition and processing were performed with a Shimadzu-Chemstation software for gas chromatographic systems.

Statistical analysis

The values reported for each aliquot were compared using paired Student's *t*-tests. The level of statistical significance was set at 5%. The results were processed using the statistical package SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

To examine the effect of pasteurization on the vitamin and fatty acid composition of human milk, these compounds were analyzed before and after heat treatments. Table 1 shows the results for total vitamin C, ascorbic acid, α - and γ -tocopherol in pasteurized and unpasteurized human milk. When reporting total vitamin C levels it is important to measure both ascorbic acid and dehydroascorbic acid. Ascorbic acid is the main biologically active form but dehydroascorbic acid, an oxidation product, also exhibits biological activity since it can be easily converted into ascorbic acid in the human body (Packer and Fuchs, 1997).

It is seen from Table 1 that pasteurization by the slow- and fast-heat methods resulted in a significantly decrease ($p < 0.05$) in total vitamin C by about 12% and 29% respectively. These losses were higher when ascorbic acid alone was determined, reaching about 26% and 41%, respectively.

Both temperature treatments significantly decreased the concentrations of α -tocopherol and γ -tocopherol (Table 1). Loss of tocopherols caused by the slow-heat method ranged from 13 to 17%, and for the fast-heat method from 32 to 34%.

The losses of vitamins C and E in the fast-heat method were greater than in the slow-heat treatment. Significant differences in both vitamins were found between the two pasteurization methods (Table 1).

No substantial differences in the fatty acid composition of unpasteurized and pasteurized milk were detected (Table 2).

DISCUSSION

Few studies have addressed the effects of pasteurization on vitamins C and E in human milk (Randoin and Perroteau, 1950; Brátová and Vávra, 1981; Erb et al., 1981; Trifonova et al., 1981; Zoeren-Grobbe et al., 1987). We found that both vitamins decrease after slow- and fast-heat pasteurization procedures.

The loss of ascorbic acid in milk caused by heat treatment may result from an increase in the conversion rate of ascorbic to dehydroascorbic acid and then to diketogulonic acid (Aeschbacher and Brown, 1972; Naidu, 2003). Thus, when total vitamin C is measured, the losses are lower because ascorbic acid and dehydroascorbic acid are accounted.

The total mean vitamin C concentration detected in our fresh samples was consistent with that reported by Buss et al. (2001). Ascorbic acid losses induced by slow-heat method (26%) are consistent with the results of studies on human milk (Brátová and Vávra, 1981; Trifonova et al. 1981) and on goat milk (Jandal, 1996), which used a similar treatment. However, such losses were lower than the 36 % decrease reported by Zoeren-Grobbe et al. (1987) and the 39% decrease found by Randoin and Perroteau, who used a shorter pasteurization time (65°C, 20min). These discrepancies may be attributable to differences in the method used to analyze ascorbic acid. Previous studies measured ascorbic acid alone, in which the losses are higher than that of total vitamin C.

The α -tocopherol levels detected in this study were similar to those reported by Hoppu et al. (2005) in human milk (3.7-4.8 mg/L). α -Tocopherol losses observed in human milk pasteurized by slow-heat method (17%) were less than 34 % decrease found by Erb et al. (1981) in human milk pasteurized at 73°C for 10 min. This

difference may be explained by the fact that those authors used a colorimetric method and saponification of the samples.

Our observation that vitamins C and E are lost during pasteurization indicates that infants receiving donor milk have less anti-oxidant activity than those receiving milk directly from their mothers. The maximum decrease in vitamins C and E was detected in the fast-heat method. Our findings are consistent with those of Trifonova et al. (1981), who reported that ascorbic acid losses in human milk pasteurized at 62.5°C for 30 minutes were lower than those caused by 10 minutes boiling in a water bath.

Our results show that the instability of ascorbic acid is greater than that of vitamin E. Therefore, ascorbic acid measurements may be good indicator of stability in human milk. Ascorbic acid has already been proposed as a biomarker of oxidative stress in biological samples (Lykkesfeldt et al., 1995).

In contrast, while most triglyceride fatty acids serve as an energy source for the newborn, LC-PUFAs have specific functions. Human milk provides LC-PUFAs in amounts estimated to meet the requirements of neonates (Clandinin et al., 1989; ESPGAN, 1991). Pasteurized donor milk is often provided to pre-term hospitalized infants because of the singular advantages of human milk (Lawrence, 1989). Our observation that LC-PUFAs are unaffected by pasteurization is consistent with the findings of other studies (Lepri et al., 1997; Henderson et al., 1998; Fidler et al., 2001) and indicates that infants receiving donor milk are not deprived of these crucial milk components. The stability of these LC-PUFAs during pasteurization may be due to the high anti-oxidant activity of human milk (Henderson et al., 1998; Buescher and McIllehan, 1992). In particular, arachidonic acid and docosahexaenoic acid, detected in this study at 0.47 and 0.26% levels respectively, were similar to the levels reported by

Gibson and Kneebone (0.40 and 0.32%), Lepri (0.42 and 0.21%) and Henderson (0.52 and 0.21%) in pooled human milk.

In conclusion, to limit the loss of vitamins C and E in human milk during pasteurization, we recommend pasteurizing at 62.5°C for 30 min instead of pasteurizing at 100°C for 5 min. In addition, we propose ascorbic acid as a marker of the stability of human milk.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by the *CeRTA (Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments, Generalitat de Catalunya)*. Meritxell Romeu Nadal acknowledges financial support from a grant from the *Generalitat de Catalunya*. We also thank the “*Federació Catalana de Grups de Suport a la Lactància Materna*” for the human milk and Robin Rycroft for revising the English manuscript.

REFERENCES

- Aeschbacher, H. U., and R. G. Brown. 1972. Automated Vitamin C Analysis. *Clinical Chemistry*. 18:965-967.
- Andersson, I., and R. Öste. 1994. Nutritional quality of pasteurized milk. Vitamin B₁₂, folate and ascorbic acid content during storage. *Int. Dairy J.* 4(2):161-172.
- Arnold, L. D. W. 2000. Becoming a Donor to a Human Milk Bank. *Leaven*. 36(2):19-23.
- Balmer, S. E., and B. A. Wharton. 1992. Human milk banking at Sorrento Maternity Hospital, Birmingham. *Arch Dis Child*. 67(4):556-559.
- Brátová, M., and L. Vávra. 1981. Influence of heat treatment on some components of human milk. *L. Science et Technique du Froid*. 2:49-54.
- Buescher, S. E., and S. M. McIllehan. 1992. Colostral antioxidants: separation and characterization of two activities in human colostrum, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 14:47-56.
- Buss, I. H., F. McGill, B. A. Darlow, and C. C. Winterbourn. 2001. Vitamin C is reduced in human milk after storage. *Acta Paediatr*. 90:813-815.
- Clandinin, M. T., J. E. Chappell, and J. E. E. Van Aerde. 1989. Requirements of newborn infants for long chain polyunsaturated fatty acids. *Acta Paediatr Scand Suppl*. 351:63-71.
- Erb, F., A. Brice, J. C. Lhopitault, and N. Assy Seka. 1981. Changes in the vitamin content of maternal milk during pasteurization and freezing treatments carried out in the lactarium. *Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol*. 74(794):105-118.
- ESPGAN Committee on Nutrition, Committee Report. 1991. Comment on the content and composition of lipids in infant formulas, *Acta Paediatr Scand*. 80:887-896.

- Fidler, N., T. U. Sauerwald, H. Demmelmair, and B. Koletzko. 2001. Fat content and fatty acid composition of fresh, pasteurized, or sterilized human milk. *Adv Exp Med Biol.* 501: 485-495.
- Garza, C., J. Hopkinson, and R. J. Schanler. 1986. Human milk banking. Pages 225–255. In: Howell RR, Morriss FH and Pickering LK, ed. *Human milk in infant nutrition and health.* Thomas CC. Springfield (IL).
- Georgeson, G. D., B. J. Szony, and K. Streitman. 2002. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 103:136-139.
- Gibson, R. A., and G. M. Kneebone. 1981. Fatty acid composition of human colostrums and mature breast milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 34:252-257.
- Góes, H. C., A. G. Torres, C. M. Donangelo, and N. M. F. Trugo. 2002. Nutrient Composition of Banked Human Milk in Brazil and Influence of Processing on Zinc Distribution in Milk Fractions. *Nutrition.* 18:590-594.
- Hanna, N., K. Ahmed, M. Anwar, A. Petrova, M. Hiatt, and T. Heigy. 2004. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 89:F518-F520.
- Henderson, T. R., T. N. Fay, and M. Hamosh. 1998. Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. *J Pediatr.* 132(5):876-878.
- Hmbana.org. (homepage on the Internet). Human Milk Banking Association of North America (HMBANA). 2005. Online. Available: <http://www.hmbana.org>.
- Hoppu, D., M. Rinnie, P. Salo-Väänänen, A. M. Lampi, V. Piironen, and E. Isolauri. 2005. Vitamin C in breast milk may reduce the risk of atopy in the infant. *Eur J Clin Nutr.* 59:123-128.

- Innis, S. M. 2004. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 554:27–43.
- Israel-Ballard, K., C. Chantry, K. Dewey, B. Lonnerdal, H. Sheppard, R. Donovan, J. Carlson, A. Sage, and B. Abrams. 2005. Viral, Nutritional, and Bacterial Safety of Flash-Heated and Pretoria-Pasteurized Breast Milk to Prevent Mother-to-Child Transmission of HIV in Resource-Poor Countries: A Pilot Study. *JAIDS.* 40(2):175-181.
- Jandal, J. M. 1996. Factors affecting ascorbic acid content and keeping quality of Shammi goat milk. *Small Ruminant Research.* 21:121-125.
- Jensen, R. G. 1995. *Handbook of milk composition.* Academic Press, Inc.
- Kylae-Siurola, A. L., and V. Antila. 1972. Effect of processing of milk on the vitamin C content. *Suomen Kemistilehti.* 45B(2):65-67.
- Lawrence, R. A. 1989. *Breast-feeding: a guide for the medical profession.* Pages 476–487. Mosby CV. St. Louis (MO).
- Lepri, L., M. Del Bubba, R. Maggini, G. P. Donzelli, and P. Galvan. 1997. Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. *J Chromatogr B.* 704:1-10.
- López-López, A., A. I. Castellote, and M. C. López-Sabater. 2001. Comparison of two direct methods for the determination of fatty acids in human milk. *Chromatographia.* 54:743-747.
- Lykkesfeldt, J., S. Loft, and H. E. Poulsen. 1995. Determination of Ascorbic acid and Dehydroascorbic Acid in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Detection-Are They Reliable Biomarkers of Oxidative stress?, *Anal. Biochem.* 229:329-335.

- Miquel, E., A. Alegría, R. Barberá, and R. Farré. 2004. Clemente G. Stability of tocopherols in adapted milk-based infant formulas during storage. *International Dairy Journal*. 14:1003-1011.
- Naidu, K. A. 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Review. Nutr J*. 2:7-16.
- Neuringer, M. 2000. Infant vision and retinal function in studies of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids: methods, results, and implications. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:256S-267S.
- Packer, L., and J. Fuchs, eds. 1997. *Vitamin C in health and diseases*. New York. Ed. Marcel Dekker.
- Randoin, L., and A. Perroteau. Determination of the vitamin C, A, and B2 contents of different mother milks and a study of the mod. 1950. *Lait*. 30:622-629.
- Resto, M., D. O'Connor, K. Leef, V. Funanage, M. Spear, and R. Locke. 2001. Leptin Levels in Preterm Human Breast Milk and Infant Formula. *Pediatrics*. 108(1):15-18.
- Romeu-Nadal, M., S. Morera-Pons, A. I. Castellote, and M. C. López-Sabater. 2006a. Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. *J. Chromatogr. B*. 830(1):41-46.
- Romeu-Nadal, M., S. Morera-Pons, A. I. Castellote, and M. C. López-Sabater. 2006b. Determination of γ -and α -tocopherols in human milk by a Direct High-Performance Liquid Chromatographic Method with UV-vis detection and comparison with Evaporative Light Scattering detection. *J. Chromatogr. A*. 1114(1):132-137.

- Schanler, R. J., N. M. Hurst, and C. Lau. 1999. The use of human milk and breastfeeding in premature infants. *Clin Perinatol.* 26:379-398, vii.
- Sollid, L. M. 2002. Breast milk against coeliac disease. *Gut.* 51:767-768.
- The Committee on Nutrition of the American Academy of Pediatrics. 1978. Breastfeeding. *Pediatrics.* 62:591-601.
- Thibeault, D. W. 2000. The precarious antioxidant defenses of the preterm infant. *Am J Perinatol.* 17:167-181.
- Trifonova, L., D. Yankova, S. Spasov, S. Klain, V. Arnaudova, SvBruchkova, and T. Bakurdzhieva. 1981. Changes in maternal milk with pasteurization. *Hig Zdraveopaz.* 24(3):284-289.
- Zoeren-Grobbe, D., J. Schrijver, G. J. Van den Berg, and H. M. Berger. 1987. Human milk vitamin content after pasteurisation, storage, or tube feeding. *Arch Dis Child.* 62:161-165.
- Vidal-Varverde, C., R. Ruiz, and A. Medrano. 1993. Effects of frozen and other storage conditions on α -tocopherol content of cow milk. *J Dairy Sci.* 76:1520-1525.

Table 1. Effect of the slow- and fast-heat methods on the content ¹ (mg/L) of several compounds in human milk.

Treatment	Total vitamin C	Ascorbic Acid	α -Tocopherol	γ -Tocopherol
Unpasteurized	35.47 \pm 1.33	34.19 \pm 0.89	4.41 \pm 0.16	0.47 \pm 0.02
Slow-heat method	31.04 \pm 1.41 ^a	25.45 \pm 0.69 ^a	3.67 \pm 0.13 ^a	0.41 \pm 0.02 ^a
Fast-heat method	25.02 \pm 1.14 ^{a,b}	20.12 \pm 0.59 ^{a,b}	2.91 \pm 0.08 ^{a,b}	0.32 \pm 0.01 ^{a,b}

¹ Mean of twenty measurements \pm standard deviation

^a Significant difference from unpasteurized samples ($P < 0.05$)

^b Significant difference between slow- and fast-heat method ($P < 0.05$)

Table 2. Effect of the slow- and fast-heat methods on fatty acids ¹ (%)
in human milk.

Fatty acid	Unpasteurized	Slow-heat	Fast-heat
C8:0	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01
C10:0	0.95 ± 0.06	0.94 ± 0.05	0.96 ± 0.05
C12:0	5.08 ± 0.16	4.94 ± 0.29	4.84 ± 0.26
C14:0	5.60 ± 0.30	5.44 ± 0.16	5.49 ± 0.19
C14:1	0.09 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
C15:0	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.15 ± 0.00
C15:1	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
C16:0	19.77 ± 0.32	19.38 ± 0.31	19.54 ± 0.18
C16:1 n-7+n-9	1.50 ± 0.03	1.49 ± 0.04	1.50 ± 0.03
C17:0	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01
C17:1	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01
C18:0	7.19 ± 0.25	7.05 ± 0.14	7.16 ± 0.15
C18:1 n-9	38.08 ± 0.78	38.61 ± 0.30	38.37 ± 0.56
C18:2 n-6	17.98 ± 0.21	18.32 ± 0.43	18.11 ± 0.11
C18:3 n-6	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01
C18:3 n-3	0.64 ± 0.02	0.65 ± 0.02	0.64 ± 0.01
C20:0	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01
C20:1 n-9	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.02
C21:0	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.00
C20:2 n-6	0.25 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01
C20:3 n-6	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02
C20:4 n-6	0.47 ± 0.02	0.47 ± 0.03	0.47 ± 0.01
C22:0	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.01
C22:1	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01
C22:2	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
C22:4 n-6	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01
C22:5 n-6	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
C24:1	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
C22:5 n-3	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01
C22:6 n-3	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01

¹ Mean of twenty measurements ± standard deviation

Publicación 5**EFFECTO DE LA CONSERVACIÓN EN FRÍO SOBRE LAS VITAMINAS C Y E Y SOBRE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE HUMANA MADURA**

M. Romeu-Nadal, A.I. Castellote, M.C. Lopez-Sabater

La leche materna es el alimento más adecuado para la alimentación de los recién nacidos, especialmente para los prematuros. En ausencia de una adecuada lactancia por parte de la madre, la primera opción es la alimentación con la leche humana procedente de los bancos, sobretodo para los prematuros y para los recién nacidos enfermos. Por ello, es de gran importancia realizar una correcta conservación de dicha leche. Lo mismo sucedera con las madres que se extraen su leche y la conservan para su posterior alimentación al recién nacido. La mayoría de recomendaciones citadas en la literatura para la conservación en frío de la leche humana se basan en evitar el crecimiento bacteriano o en estudios de la fracción inmunológica de la leche. Sin embargo, existen pocos estudios que determinan la estabilidad de las vitaminas C y E y de los ácidos grasos en la leche humana conservadas a bajas temperaturas.

El objetivo de este estudio fue determinar si las concentraciones de vitamina C y E y los porcentajes de ácidos grasos disminuían con la refrigeración, congelación o ultracongelación. Y poder adaptar de este modo, las recomendaciones de la conservación de la leche humana a nivel doméstico, en las unidades neonatales de los hospitales o en los bancos de leche de acuerdo con la estabilidad de las vitaminas C y E y de los ácidos grasos.

Para el desarrollo del estudio se utilizó la leche madura obtenida al comienzo de la primera toma del día, y en ambos pechos de diferentes madres de edades entre 20 y 35 años, siendo esta mezclada para obtener un “pool” que posteriormente se dividió en alícuotas. La leche fresca fue analizada inmediatamente, y el resto de alícuotas se dividieron en 3 grupos: leche refrigerada a 4°C que se analizó a las 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 horas; leche congelada a -20°C que se analizó a los 3, 5, 8 y 12 meses; leche ultracongelada a -80°C que se analizó a los 5, 8 y 12 meses.

De cada muestra se analizaron las concentraciones de vitamina C total (ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico) y de α - y γ -tocoferol, así como los porcentajes de los ácidos grasos.

La vitamina C total en las muestras de leche refrigerada empezó a decrecer significativamente a las 6 horas de conservación, llegando a una pérdida del 63% después de las 96 horas. Estas pérdidas fueron menores en las muestras congeladas y ultracongeladas, llegando a un 24% y a un 12% de disminución a los 12 meses, respectivamente. No se apreciaron diferencias significativas en el contenido de vitamina C total entre las muestras frescas y las muestras congeladas (-20°C) hasta los 5 meses, o entre aquellas ultracongeladas (-80°C) durante 8 meses.

En relación a las concentraciones del α - y γ -tocoferol, éstas se mantuvieron en las muestras refrigeradas hasta las 24 horas, y en las congeladas o ultracongeladas hasta los 12 meses. Sin embargo, sus concentraciones empezaron a disminuir en las muestras

refrigeradas durante más de 24 horas, alcanzando un 25% y un 30% de reducción para el α y γ -tocoferol, respectivamente, después de las 96 horas.

En cambio, los porcentajes de ácidos grasos no se modificaron con la conservación de la leche a las temperaturas y tiempos analizados.

En conclusión, las pérdidas de vitamina C en las muestras conservadas en frío deben ser consideradas. A pesar de esto, la conservación en nevera durante 3 horas, la congelación durante 5 meses o ultracongelación durante 8 meses mantienen el contenido de vitamina C inicial. De este modo, recomendamos un cambio en la conservación de la leche humana, limitando la refrigeración a las 3 horas, la congelación (-20°C) a los 5 meses y la ultracongelación (-80°C) a los 8 meses. En caso de tener que conservar la leche durante periodos más prolongados se debería considerar la suplementación de vitamina C. Además, proponemos la vitamina C como un marcador muy sensible de la estabilidad de la leche.

La publicación “**Effect of Cold Storage on Vitamins C and E and Fatty Acids in Mature Human Breast Milk**” con los autores M. Romeu-Nadal, A. I. Castellote y M. C. López-Sabater fue enviada a la revista *Journal of Dairy Science* el 5 de septiembre del 2006. A continuación se adjunta el e-mail de recepción de la revista.

Data: Tue, 05 Sep 2006 09:35:53 -0400 (EDT)
De: adsa@assoqh.org
A: mromeu@ub.edu
Assumpte: Journal of Dairy Science - Manuscript JDS-06-0570
September 5th, 2006

Dear Meritxell Romeu-Nadal:

This e-mail is to inform you that the following manuscript submitted to the Journal of Dairy Science, for which you are a contributing author, has been successfully uploaded to JDS Manuscript Central:

Manuscript Title: Effect of Cold Storage on Vitamins C and E and Fatty Acids in Mature Human Breast Milk
Manuscript Number: JDS-06-0570

The corresponding author for your manuscript will be able to track the progress of the review by logging into <http://jds.manuscriptcentral.com>.

Thank you for your interest in Journal of Dairy Science.

Gary Rogers, Editor-in-Chief
Journal of Dairy Science

Cold storage of human milk

M. Romeu-Nadal

The recommended cold storage temperatures cited in the literature to storage human milk in neonatal units, at home and the human milk banks are focused mainly on the bacteriological and immunological effects of storage. Few and ancient data address how vitamins C and E and fatty acids in human milk vary with cold storage. Thus, it would be necessary to adapt recommendations on the cold storage of human milk (refrigeration, freezing and ultrafreezing) accordingly the stability of vitamins C and E and fatty acids.

Effect of cold storage in human milk

Effect of Cold Storage on Vitamins C and E and Fatty Acids in Mature Human Breast Milk

M. Romeu-Nadal,* A. I. Castellote and M. C. López-Sabater¹**

*Dept. Nutrition and Food Science, Reference Centre in Food Technology. Faculty of Pharmacy. University of Barcelona. Avda. Joan XXIII, s/n, E-08028 Barcelona, Spain.

¹Corresponding author: M. Carmen López-Sabater; e-mail: mclopez@ub.edu

Tel.: +34-93-4024512; Fax: +34-93-4035931.

ABSTRACT

In the present study, we estimated vitamins C and E as well as fatty acid level in both fresh human milk and milk under refrigerated (4°C) for 96 hours; at freezing (-20°C) and at ultrafreezing (-80°C) temperatures for 12 months. Total vitamin C at 4°C (6 hours), -20°C (8 months) and -80°C (12 months) was significantly decreased. Vitamin E levels did not change at either refrigeration temperature (under 24 hours) or at freezing or ultrafreezing temperatures. Our analysis revealed that fatty acids are not affected by cold storage. In conclusion, we recommend a change in milk storage practices; specifically, to preserve more than three-fourths of the initial vitamin C, samples should be stored in a refrigerator for less than 24 hours, and in a freezer or in an ultrafreezer for periods of up to 12 months. Alternatively, vitamin C supplementation may be considered. In addition, we propose vitamin C as a marker for human milk stability.

(Key words: fatty acid, freezing, refrigeration, vitamin)

Abbreviation Key: AA = arachidonic acid; DHA = docosahexaenoic acid; HMBANA = Human Milk Banking Association of North America; LC-PUFAs = long-chain polyunsaturated fatty acids; MUFAs = monounsaturated fatty acids; PUFAs = polyunsaturated fatty acids; SFAs = saturated fatty acids.

INTRODUCTION

Human breast milk is regarded as the most important nutrient for neonates, especially preterm infants (Simpson et al. 2002; Lindemann, 2004). The early use of breast milk for preterm infants has resulted in a reduced incidence of necrotising enterocolitis (Dvorak et al., 2003), faster tolerance of enteral feeding (Simpson et al. 2002) and thus a reduced need for parenteral nutrition.

If the mother does not produce sufficient milk, frozen milk from a bank should be made available to all ill neonates until the mother's own production is established (Lindemann, 2004). Of equal value, however, is the practice of mothers collecting their own milk for later feeding (Ogundele, 2002). Possible influences on the stability of milk properties include temperature and storage. Current recommendations for storing human milk in neonatal units and at home vary: for refrigerator storage, from 24-48 hours (Biancuzzo, 1999) to 3-5 days (Lawrence and Lawrence, 1999) – even up to 8 days (La Leche League International, 1998); for freezer storage at -18°C, from 3 to 12 months (Biancuzzo, 1999; Lawrence and Lawrence, 1999; La Leche League International, 1998). In human milk banks, donor milk can be: stored at 4°C in a refrigerator from 24 hours (Baumer, 2004) – even up to 8 days (HMBANA, 2006); frozen at -20°C from 3 months (Baumer, 2004) –even up to 12 months (HMBANA, 2006); or frozen at -70°C for even longer periods (Baumer, 2004; HMBANA, 2006).

The vitamins C and E play an important role in antioxidant activity and immunomodulation (Ahmed et al., 2004; Hoppu et al., 2005). Preterm infant have reduced antioxidant capacity (Baydas et al., 2002) and are often exposed to oxidant stress caused by infection, oxygen, mechanical ventilation, intravenous nutrition, and blood transfusions

(Hanna et al., 2004). Preterm infants who ingest human milk rapidly increase their antioxidant concentrations (Van Zoeren-Grobbe et al., 1993; Sommerburg et al., 2000).

Long-chain polyunsaturated fatty acids (**LC-PUFAs**), specifically arachidonic acid (C20:4n-6, **AA**) and docosahexaenoic acid (C22:6n-3, **DHA**), are of major importance during the perinatal period, during which the brain and retina are developing. They therefore have an influence upon visual acuity and learning abilities (Neuringer, 2000; Innis, 2004).

The usual cold storage conditions of human milk cited in the literature are as follows: refrigeration at temperatures between 4-6°C for 48-72 hours (Igumbor et al., 2000; Lawrence, 2001; Ogundele, 2000, 2002) and under freezing conditions at temperatures between -20°C /-70°C for 15-90 days (Lawrence, 2001; Bitman, 1983; Buss et al., 2001; Ogundele, 2002). These periods are used to prevent bacterial growth rather than preserve any nutritional properties. However, storage can result in the loss of nutrients sensitive to oxidation, such as vitamins C and E, since both are sensitive to light, oxygen and temperature (Esteve et al., 1995; Miquel et al., 2004). Loss of LC-PUFAs can also occur as they contain a large number of double bonds.

Nevertheless, there is scant historical data addressing how vitamins C and E and fatty acids change during cold storage. Therefore, we investigated potential differences in the concentrations of antioxidant vitamins C and E, as well as in the percentage of fatty acids, between fresh and stored milk at three different cold temperatures: refrigeration (4°C), freezing (-20°C) and ultrafreezing (-80°C). Thus, the objective of our study was to adopt recommendations on the cold storage of human milk based on the stability of vitamins C and E and fatty acids in human milk stored at these temperatures.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection

Identical volumes of mature human milk were collected from both breasts by means of a Chicco manual breast pump (Chicco®, Italy), following the manufacturer's instructions, from healthy mothers (age 20-35 years) at the department's Extraction Unit. Informed consent was obtained from all participating mothers, all of whom had experienced full term pregnancies. Human milk was collected into sterile opaque bottles in the morning at first expression. Milk from different mothers was directly pooled and divided into aliquots. Fresh samples were immediately tested, and the remaining aliquots refrigerated at 4°C or frozen at -20°C or at -80°C (ultrafreezer). Before processing milk samples were thawed at room temperature. This volume was sufficiently large to provide twenty samples for every analysis.

Storage Conditions

For this study, human milk aliquots were stored under three different conditions: in the refrigerator at 4°C (for analyses at 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 and 96 hours); in the freezer at -20°C (for analyses at 3, 5, 8 and 12 months); and in the freezer at -80°C (for analyses at 5, 8 and 12 months).

Total Vitamin C Analysis

Total vitamin C was measured following the direct method described by Romeu et al. (2006a). To analyze the amount of vitamin C, dehydroascorbic acid was reduced to ascorbic acid with dithiothreitol. The latter was resolved by reversed-phase high-performance liquid chromatography (C-18) using a mobile phase of Milli-Q water with acetic acid (0.1% v/v) and methanol (in a relative proportion of 95:5 v/v) and was detected at 254 nm.

Vitamin E Analysis

α - and γ -tocopherols were separated and quantified with reverse-phase high-performance liquid chromatography (C-18) using a mobile phase of acetonitrile:methanol:dichloromethane (60:38:2v/v) following the direct method described by Romeu et al. (2006b). Human milk, with the addition of an internal standard (α -tocopherol acetate), was diluted in hexane. The dried sample was reconstituted in a dichloromethane:acetonitrile (3:1) solution. Detection was performed at 292 nm.

Fatty Acids Analysis

Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared with sodium methylate and methanolic BF₃ and dissolved in hexane, following the method described by López-López et al. (2001). Fatty acids were separated and quantified with fast gas chromatography.

Fast gas chromatographic analyses were performed on a Shimadzu GC-2010 gas chromatograph (Kyoto, Japan) equipped with a flame ionization detector and a Shimadzu

AOC-20i Autoinjector. Separation of FAME was carried out on a capillary column (10 m x 0.10 mm I.D) coated with a Varian VF-23 ms stationary phase (high cyanopropyl phase, 0.10 μm film thickness) from Varian (Palo Alto, USA). Operation conditions were as follows: the split-splitless injector was used in split mode with a ratio of 1:100. The injection volume of the sample was 1 μl . The injector and detector temperatures were kept at 250°C and 270°C, respectively. The temperature program was as follows: initial temperature: 120°C, increased at 35°C/min until reaching 175°C (kept 0.5 min); increased at 20°C/min until reaching 250°C. Helium was used as the carrier gas, with a linear velocity of 59.4 cm/s (the average at 120°C). Pressure: 482 kPa; detector gas flows: H₂: 50 ml/min; air: 400 ml/min; make-up gas (N₂): 50 ml/min; sampling frequency: 50 Hz. Data acquisition and processing were performed with a Shimadzu-Chemstation software for gas chromatographic systems.

Statistical Analysis

The values reported for each aliquot were compared using paired Student's *t*-tests. The level of statistical significance was set at 5%. The results were processed using the statistical package SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Effect of Storage on Total Vitamin C Concentration

Table 1 shows the concentration of total vitamin C in pooled human milk before and after storage at 4°C for 96 hours, as well as at -20°C and -80°C for 12 months.

When calculating total vitamin C levels it is important to measure both ascorbic and dehydroascorbic acid levels. Ascorbic acid is the principal biologically active form of vitamin C. However, dehydroascorbic acid also exhibits biological activity since the human body can easily convert it into ascorbic acid (Tudela et al., 2002).

After 3 h refrigeration, total vitamin C concentration was slightly lower than that found in fresh milk. As storage continued (6, 9, 12, 24, 48, 72 and 96 hours) total vitamin C in milk decreased significantly ($P < 0.05$). After 96 hours, the decrease was equal to 63% with respect to initial concentration. These losses were lower when human milk was stored at -20°C and -80°C, decreasing 24% and 12% after 12 months, respectively. There were no differences in total vitamin C between fresh milk and stored milk (-20°C) over 5 months, or of that stored in the ultrafreezer (-80°C) for 8 months.

Effect of Storage on α - and γ -Tocopherol Concentrations

Table 1 shows the concentration of α - and γ -tocopherols in pooled human milk before and after storage at 4°C for 96 hours or at -20°C and -80°C for 12 months.

α - and γ -tocopherol concentrations did not change at either during refrigeration for 24 hours or at freezing temperatures (-20°C or -80°C) over 12 months. However, refrigeration significantly decreased α - and γ -tocopherol concentrations after 24 hours of

storage, decreasing about 25% and 30% in α - and γ -tocopherols after 96 hours, respectively.

Effect of Storage on Fatty Acid Percentages

Table 2 shows the percentages of fatty acids in pooled fresh human milk. Saturated fatty acids (**SFAs**) constitute 40% of the total acids in the lipids of mature breast milk. Palmitic acid (C16:0) accounts for 49.7% of the saturated fatty acids in mature milk saturates. Unsaturated fatty acids account for 60% of the total fatty acids in milk. These unsaturated fatty acids are mostly monounsaturated (**MUFAs**), constituting 41% of total fatty acids. The polyunsaturated content of both the linoleic (C18:2n-6) and linolenic (C18:3n-3) acid series constitute 18% and 1% of the total acids, respectively. AA and DHA account for 2.4% and 23.8% of the total polyunsaturated fatty acids n-6 and n-3, respectively.

Table 3 shows AA, DHA, essential fatty acids (linoleic and linolenic acids), SFAs, MUFAs, and the polyunsaturated fatty acids (**PUFAs**) n-6 and n-3 percentages in pooled human milk stored at 4°C, -20°C and -80°C. Fatty acid percentages did not change at either refrigeration temperature over 96 hours time period or at freezing and ultrafreezing temperatures for 12 months.

DISCUSSION

The effect of storage on the various components of human milk has been studied extensively. However, most of these studies have focused on bacteriological and immunological effects (Garza et al., 1982; Igumbor et al., 2000; Lawrence, 2001; Eteng et al., 2001; Ogundele, 2002), devoting scant attention to its effects on vitamins C and E and fatty acids.

The main findings of our study revealed a decrease in the total vitamin C concentration in human milk stored at both the refrigeration and freezing temperatures recommended by “La Leche League International” (1998), Lawrence and Lawrence (1999) and HMBANA (2006). Moreover, we observed a decrease in vitamin E concentration in human milk stored at refrigeration temperatures after 24 hours: i.e., storage at 4°C for 3-8 days, as recommended temperature described by the aforementioned authors (La Leche League International, 1998; Lawrence and Lawrence, 1999; HMBANA, 2006). The maximum decrease in vitamins C and E was detected in human milk samples stored at refrigeration temperatures for 96 hours. Refrigeration led to greater losses in vitamin C than did storage at freezing (-20°C) or ultrafreezing temperatures (-80°C).

The total mean vitamin C concentration detected in our fresh samples (35.10 ± 1.42 mg/L) was in agreement with that reported by Buss et al. (2001) (23.3-80.4 mg/L). The 18% loss of total vitamin C in refrigerated human milk after 24 hours was less than the 35% decrease found by Buss et al. (2001). The loss of vitamin C in milk caused by storage may stem from the increased conversion of ascorbic to dehydroascorbic acid and then, in turn, to diketogulonic acid (Aeschbacher and Brown, 1972; Naidu, 2003). Buss et al. (2001) observed that vitamin C losses were partly due to lactoperoxidase activity since

adding the peroxidase inhibitor potassium cyanide (KCN) to human milk samples provided some protection against these losses.

The mean α - and γ -tocopherol concentrations in our fresh samples were 3.85 ± 0.16 mg/L and 0.37 ± 0.02 mg/L, respectively. The α -tocopherol levels detected in this study were similar to those reported by Hoppu et al. (2005) in human milk (3.7-4.8 mg/L). Coinciding with our own findings, other authors have reported that vitamin E content in human milk is quite stable under various storage conditions for up to one week as well as freezing at -20°C or -70°C for a longer time period (Moffatt et al., 1987; Van Zoeren-Grobbe et al., 1993).

As the stability of vitamin C proved lower than that of vitamin E, it may constitute an effective indicator of human milk stability. This vitamin has already been proposed as a marker of oxidative stress in biological samples (Lykkesfeldt et al., 1995).

Our observation that vitamins C and E, especially the former, are lost during certain cold storage periods indicates that infants receiving stored human milk receive fewer antioxidant compounds than those given fresh milk (Miranda et al., 2004), since these vitamins are the components responsible for antioxidant activity (Moffatt et al., 1987; Sommerburg et al., 2000). The maximum decrease in vitamins C and E was detected at the refrigeration temperature over 96 hours.

In neonatal units, infants may be fed stored milk for extended periods of time, the oldest milk being given first. While many of these infants are supplemented with vitamin C term infants usually do not receive such supplementation. They may still be given stored milk, though usually not exclusively. Our main point of concern is the loss of vitamin C that occurs in stored samples. Storage time should therefore be kept as brief as possible. If long-term stored milk constitutes a major and regular proportion of consumption, vitamin C supplementation may be necessary.

Our results indicate that recommended storage conditions for human milk used in neonatal units, in the home and in milk banks (La Leche League International, 1998; Biancuzzo, 1999; Lawrence and Lawrence, 1999; Baumer, 2004; HMBANA, 2006) exert no significant effect upon fatty acid percentages. Previous published studies found that LC-PUFAs were unaffected by heat treatment, such as pasteurization at 62.5°C for 30 minutes (Lepri et al., 1997; Henderson et al., 1998; Fidler et al., 2001). Our observation that LC-PUFAs are unaffected by cold storage indicates that infants receiving this stored milk are not deprived of these crucial components. The stability of these LC-PUFAs during cold storage probably stems from the high anti-oxidant activity of human milk (Henderson et al., 1998; Buescher and McIllehan, 1992). In particular, arachidonic acid and docosahexaenoic acid, which we detected in fresh milk at levels of 0.44% and 0.25% respectively, were similar to those reported by Koletzko et al. (1988) (0.36 and 0.22%), Lepri et al. (1997) (0.42 and 0.21%) and Henderson et al. (1998) (0.52 and 0.21%) in pooled human milk.

In conclusion, fatty acid percentages did not decrease at the recommended refrigeration, freezing, or ultrafreezing temperatures. The same was observed for vitamin E content in human milk stored at both freezing and ultrafreezing temperatures. On the contrary, the extent of vitamin C loss during storage was considerable. Storage for 3 hours in a refrigerator, for 5 months in a freezer (-20°C) or for 8 months in an ultrafreezer (-80°C), will usually preserve initial vitamin C. Thus, we recommend a change in some human milk storage practices; specifically, it should be stored up to 3 hours in a refrigerator, to up to 5 months in a freezer or to up to 8 months in an ultrafreezer. Alternatively, vitamin C supplementation may be considered. In addition, we propose vitamin C as a marker for human milk stability.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by the *CeRTA (Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments, Generalitat de Catalunya)*. Meritxell Romeu Nadal acknowledges financial support from *Generalitat de Catalunya*. We also thank the “*Federació Catalana de Grups de Suport a la Lactància Materna*” for providing human milk and Robin Rycroft for revising the English manuscript.

REFERENCES

- Aeschbacher, H. U., and R. G. Brown. 1972. Automated Vitamin C Analysis. *Clin. Chem.* 18:965-967.
- Ahmed, L., S. K. Nazrul Islam, M. N. I. Khan, S. Huque, and M. Ahsan. 2004. Antioxidant Micronutrient Profile (Vitamin E, C, A, Copper, Zinc, Iron) of Colostrum: Association with Maternal Characteristics. *J Trop Pediatr.* 50(6):357-358.
- Baumer, J. H. 2004. Guidelines for the establishment and operation of human milk banks in the UK. *Arch. Dis. Child. Ed. Pract.* 89:27-28.
- Baydas, G., F. Karatas, M. F. Gursu, H. A. Bozkurt, N. Ilhan, A. Yasar, and H. Canatan. 2002. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Arch Med Res.* 33:276–280.
- Biancuzzo, M. 1999. *Breastfeeding the newborn_clinical strategies for nurses.* St Louis, Missouri: Mosby, Inc. 894-895.
- Bitman, J., D. L. Wood, N. R. Mehta, P. Hamosh, and M. Hamosh. 1983. Lipolysis of triglycerides of human milk during storage at low temperatures: a note of caution. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2:521-524.
- Buescher, S. E., and S. M. McIllehan. 1992. Colostral antioxidants: separation and characterization of two activities in human colostrum, *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 14:47–56.
- Buss, I. H., F. McGill, B. A. Darlow, and C. C. Winterbourn. 2001. Vitamin C is reduced in human milk storage. *Acta Paediatr.* 90:813-815.
- Dvorak, B., M. D. Halpern, H. Holubec, K. Dvorakova, J. A. Dominguez, C. S. Williams, Y. G. Meza, H. Kozakova, and R. S. McCuskey. 2003. Maternal milk

- reduces severity necrotizing enterocolitis and increases intestinal IL-10 in a neonatal rat model. *Pediatr Res.* 53:426-433.
- Esteve, M. J., R. Farré, and A. Frígola. 1995. Changes in ascorbic acid content of green asparagus during the harvesting period and storage. *J Agric Food Chem.* 43:2058-2061.
- Eteng, M. U., P. E. Ebong, E. U. Eyong, and R. R. Ettarh. 2001. Storage beyond three hours at ambient temperature alters the biochemical and nutritional qualities of breast milk. *Afr J Reprod Health.* 5:130–134.
- Fidler, N., T. U. Sauerwald, H. Demmelmair, and B. Koletzko. 2001. Fat content and fatty acid composition of fresh, pasteurized, or sterilized human milk. *Adv Exp Med Biol.* 501:485-495.
- Garza, C., C. A. Johnson, R. Harrist, and B. L. Nichols. 1982. Effects of methods of collection and storage on nutrients in human milk. *Early Hum Dev.* 6:295–303.
- Hanna, N., K. Ahmed, M. Anwar, A. S. Petrova, M. Hiatt, and T. Hegyi. 2004. Effect of storage on breast milk antioxidation activity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 89:F518-F520.
- Henderson, T. R., T. N. Fay, and M. Hamosh. 1998. Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. *J Pediatr.* 132(5):876-878.
- HMBANA. 2006. In: Jones F., and M. R. Tully. 2nd ed. *Best Practice for Expressing, Storing and Handling Human Milk in Hospitals, Homes and Child Care Settings.* Human Milk Banking Association of North America
- Hoppu, D., M. Rinnie, P. Salo-Väänänen, A. M. Lampi, V. Piironen, and E. Isolauri. 2005. Vitamin C in breast milk may reduce the risk of atopy in the infant. *Eur J Clin Nutr.* 59:123-128.

- Igumbor, E. O., R. D. Mukura, B. Makandirama, and V. Chihota. 2000. Storage of breast milk: effect of temperatura and storage duration on microbial growth. *Cent. Afr. Med.* 46:247-251.
- Innis, S. M. 2004. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 554:27-43.
- Koletzko, B., M. Mrotzek, B. Eng, and H. J. Bremer. 1988. Fatty acid composition of mature human milk in Germany. *Am J Clin Nutr.* 47:954-959.
- La Leche League International. 1998. Storing human milk. Brochure n° 4692. Schaumburg IL: La Leche League International.
- Lawrence, R. A., and R. M. Lawrence. 1999. Breastfeeding-a guide for the medical profession. 5th ed. St Louis, Missouri: Mosby Inc. 894-895.
- Lawrence, R. A. 2001. Milk banking: the influence of storage procedures and subsequent processing on immunological componenets of human milk. *Adv. Nutr. Res.* 10:389-404.
- Lepri, L., M. D. Bubba, R. Maggini, G. P. Donzelli, and P. Galvan. 1997. Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. *J Chromatogr B.* 704:1-10.
- Lindemann, P. C., I. Foshaugen, and R. Lindemann. 2004. Characteristics of breast milk and serology of women donating breast milk to a milk bank. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 89:F440-F441.
- López-López, A., A. I. Castellote, and M. C López-Sabater. 2001. Comparison of two direct methods for the determination of fatty acids in human milk. *Chromatographia.* 54:743-747.
- Lykkesfeldt, J., S. Loft, and H. E. Poulsen. 1995. Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography

- with Coulometric Detection - Are They Reliable Biomarkers of Oxidative Stress? *Anal Biochem.* 229(2):329-335.
- Miquel, E., A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, and G. Clemente. 2004. Stability of tocopherols in adapted milk-based infant formulas during storage. *Int Dairy J.* 14:1003-1011.
- Miranda, M., M. Muriach, I. Almansa, E. Jareño, F. Bosch-Morell, F. J. Romero, and D. Silvestre. 2004. Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. *Biofactors.* 20:129–137.
- Moffatt, P. A., C. J. Lammi-Keefe, A. M. Ferris, and R. G. Jensen. 1987. Alpha and gamma tocopherols in pooled mature human milk after storage. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 6:225–227.
- Naidu, K. A. 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. Review. *Nutr J.* 2:7-16.
- Neuringer, M. 2000. Infant vision and retinal function in studies of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids: methods, results, and implications. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:256S-267S.
- Ogundele, M. O. 2000. Techniques for the storage of human breast milk: implications for antimicrobial functions and safety of stored milk. *Eur J. Pediatr.* 159:793-797.
- Ogundele, M. O. 2002. Effects of storage on the physicochemical and antibacterial properties of human milk. *Br J Biomed Sci.* 59(4):205-211.
- Romeu-Nadal, M., S. Morera-Pons, A. I. Castellote, and M. C. López-Sabater. 2006a. Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. *J. Chromatogr. B.* 830(1):41-46.

- Romeu-Nadal, M., S. Morera-Pons, A. I. Castellote, and M. C. López-Sabater. 2006b. Determination of γ -and α -tocopherols in human milk by a Direct High-Performance Liquid Chromatographic Method with UV-vis detection and comparison with Evaporative Light Scattering detection. *J. Chromatogr. A.* 1114(1):132-137.
- Simpson, C., R. J. Schanler, and C. Lau. 2002. Early introduction of oral feeding in preterm infants. *Pediatrics.* 110:517-522.
- Sommerburg, O., K. Meissner, M. Nelle, H. Lenhartz, and M. Leichsenring. 2000. Carotenoid supply in breast-fed and formula-fed neonates. *Eur J Pediatr.* 159:86–90.
- Tudela, J. A., J. C. Espín, and M. I. Gil. 2002. Spinach. Fresh-cut Spinach stored for seven days in air or in a Modified atmosphere. *Postharvest Biol Technol.* 26:75-84.
- Van Zoeren-Grobbe, D., R. M. Moison, W. M. Ester, and H. M. Berger. 1993. Lipid peroxidation in human milk and infant formula: effect of storage, tube feeding and exposure to phototherapy. *Acta Paediatr.* 82:645–649.

Table 1. Effects of cold storage on several compounds^a (mg/L) in human milk.

Milk samples	Total vitamin C ^b	α -Tocopherol	γ -Tocopherol
Fresh	34.71 \pm 1.33	3.85 \pm 0.16	0.37 \pm 0.02
4°C (3 h)	33.93 \pm 0.79	3.88 \pm 0.15	0.36 \pm 0.02
4°C (6 h)	32.63 \pm 0.77*	3.92 \pm 0.18	0.38 \pm 0.01
4°C (9 h)	32.89 \pm 1.34*	3.93 \pm 0.17	0.37 \pm 0.01
4°C (12 h)	32.05 \pm 1.36*	3.93 \pm 0.19	0.37 \pm 0.02
4°C (24 h)	28.37 \pm 1.18*	3.74 \pm 0.11	0.36 \pm 0.01
4°C (48 h)	24.44 \pm 1.22*	3.25 \pm 0.11*	0.32 \pm 0.01*
4°C (72 h)	16.88 \pm 1.05*	3.08 \pm 0.12*	0.29 \pm 0.01*
4°C (96 h)	12.78 \pm 0.51*	2.88 \pm 0.10*	0.26 \pm 0.01*
-20°C (3 mo)	34.72 \pm 1.33	3.81 \pm 0.13	0.37 \pm 0.02
-20°C (5 mo)	33.89 \pm 1.35	3.80 \pm 0.16	0.36 \pm 0.01
-20°C (8 mo)	30.09 \pm 1.09*	3.81 \pm 0.17	0.35 \pm 0.01
-20°C (12 mo)	26.46 \pm 1.23*	3.77 \pm 0.15	0.38 \pm 0.02
-80°C (5 mo)	34.12 \pm 1.35	3.76 \pm 0.14	0.38 \pm 0.01
-80°C (8 mo)	33.95 \pm 0.90	3.73 \pm 0.12	0.36 \pm 0.01
-80°C (12 mo)	30.40 \pm 0.65*	3.78 \pm 0.14	0.37 \pm 0.02

^a Mean of twenty measurements \pm standard deviation.

^bTotal vitamin C: ascorbic acid + dehydroascorbic acid.

* $p < 0.05$ vs. fresh human milk.

Table 2. Fatty acids (%) found in fresh human milk.

Fatty acid	Mean ± SD^a
C8:0	0,16 ± 0,01
C10:0	1,04 ± 0,07
C12:0	4,74 ± 0,26
C14:0	5,55 ± 0,28
C14:1	0,11 ± 0,01
C15:0	0,16 ± 0,00
C15:1	0,05 ± 0,00
C16:0	19,78 ± 0,42
C16:1 n-7+n-9	1,69 ± 0,08
C17:0	0,25 ± 0,01
C17:1	0,18 ± 0,02
C18:0	7,34 ± 0,22
C18:1n-9	38,09 ± 1,84
C18:2n-6	17,34 ± 0,77
C18:3n-6	0,13 ± 0,01
C18:3n-3	0,66 ± 0,05
C20:0	0,25 ± 0,03
C20:1n-9	0,30 ± 0,02
C21:0	0,29 ± 0,02
C20:2n-6	0,24 ± 0,01
C20:3n-6	0,30 ± 0,01
C20:4n-6, AA^b	0,44 ± 0,02
C22:0	0,08 ± 0,01
C22:1	0,11 ± 0,01
C22:2	0,05 ± 0,00
C20:5n-3	0,04 ± 0,00
C22:4n-6	0,13 ± 0,01
C22:5n-6	0,02 ± 0,00
C24:1	0,03 ± 0,00
C22:5n-3	0,10 ± 0,01
C22:6n-3, DHA^c	0,25 ± 0,01
SFAs^d	39,63 ± 3,23
MUFAs^e	40,56 ± 3,41
PUFAs^f n-6	18,16 ± 1,13
PUFAs^f n-3	1,05 ± 0,09

n=20

^aStandard deviation^bAA: arachidonic acid^cDHA: docosahexaenoic acid^dSFAs: saturated fatty acids^eMUFAs: monounsaturated fatty acids^fPUFAs: polyunsaturated fatty acids

Table 3. Effects of cold storage on fatty acids^a (%) in human milk.

Milk samples	AA ^b C20:4n-6	DHA ^c C22:6n-3	Linoleic acid C18:2n-6	Linolenic acid C18:3n-3	SFAs ^d	MUFAs ^e	PUFAs ^f n-6	PUFAs ^f n-3
4°C (3 h)	0.42 ± 0.01	0.25 ± 0.01	17.88 ± 0.09	0.64 ± 0.02	38.89 ± 3.10	40.18 ± 3.43	18.75 ± 0.78	1.05 ± 0.09
4°C (6 h)	0.43 ± 0.02	0.25 ± 0.01	17.88 ± 0.12	0.64 ± 0.01	38.93 ± 3.30	40.50 ± 3.22	18.71 ± 0.82	1.04 ± 0.09
4°C (9 h)	0.44 ± 0.01	0.25 ± 0.01	17.83 ± 0.07	0.64 ± 0.01	38.95 ± 3.21	40.36 ± 3.71	18.67 ± 0.78	1.03 ± 0.09
4°C (12 h)	0.43 ± 0.01	0.24 ± 0.01	17.81 ± 0.30	0.64 ± 0.01	38.62 ± 3.48	40.31 ± 3.78	18.61 ± 1.04	1.02 ± 0.05
4°C (24 h)	0.43 ± 0.01	0.25 ± 0.01	17.97 ± 0.18	0.65 ± 0.01	39.37 ± 3.56	40.75 ± 3.11	18.78 ± 1.21	1.02 ± 0.08
4°C (48 h)	0.43 ± 0.01	0.24 ± 0.01	17.90 ± 0.08	0.66 ± 0.02	39.08 ± 3.37	40.85 ± 3.56	18.72 ± 1.33	1.05 ± 0.08
4°C (72 h)	0.43 ± 0.01	0.25 ± 0.01	17.93 ± 0.10	0.67 ± 0.02	38.68 ± 2.97	40.63 ± 3.26	18.76 ± 1.10	1.06 ± 0.08
4°C (96 h)	0.44 ± 0.01	0.25 ± 0.01	17.94 ± 0.07	0.66 ± 0.01	38.66 ± 3.13	40.70 ± 3.41	18.77 ± 1.04	1.04 ± 0.06
-20°C (3 mo)	0.44 ± 0.02	0.25 ± 0.01	17.73 ± 0.70	0.65 ± 0.03	38.99 ± 3.18	40.20 ± 3.54	18.57 ± 1.19	1.04 ± 0.07
-20°C (5 mo)	0.44 ± 0.01	0.26 ± 0.01	17.82 ± 0.14	0.66 ± 0.01	39.68 ± 3.44	40.25 ± 3.51	18.67 ± 1.03	1.06 ± 0.08
-20°C (8 mo)	0.44 ± 0.01	0.25 ± 0.01	17.68 ± 0.03	0.66 ± 0.01	39.87 ± 2.93	40.12 ± 3.27	18.56 ± 1.12	1.07 ± 0.07
-20°C (12 mo)	0.44 ± 0.02	0.26 ± 0.01	17.60 ± 0.13	0.65 ± 0.01	40.85 ± 3.34	38.97 ± 3.01	18.42 ± 1.03	1.09 ± 0.07
-80°C (5 mo)	0.44 ± 0.01	0.25 ± 0.01	17.97 ± 0.06	0.65 ± 0.01	39.24 ± 3.51	40.34 ± 3.38	18.81 ± 1.26	1.04 ± 0.09
-80°C (8 mo)	0.45 ± 0.02	0.26 ± 0.01	17.89 ± 0.24	0.64 ± 0.01	39.99 ± 3.02	39.71 ± 3.19	18.77 ± 1.02	1.04 ± 0.08
-80°C (12 mo)	0.45 ± 0.01	0.25 ± 0.00	17.96 ± 0.18	0.64 ± 0.02	39.03 ± 2.94	40.61 ± 3.04	18.79 ± 1.41	1.04 ± 0.07

^aMean of twenty measurements ± standard deviation.

^bAA: arachidonic acid

^cDHA: docosahexaenoic acid

^dSFAs: saturated fatty acids

^eMUFAs: monounsaturated fatty acids

Publicación 6**DESARROLLO DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DE ESPACIO EN CABEZA PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN PREPARADOS PARA LACTANTES**

M. Romeu-Nadal, A.I. Castellote, M.C. Lopez-Sabater

El deterioro de la calidad de los preparados para lactantes y en consecuencia la terminación de su vida útil se ve reflejado en la aparición de un flavor oxidado determinado sobretudo por la aparición de compuestos volátiles, siendo el propanal, el pentanal y el hexanal los compuestos volátiles mayoritarios que se generan en los preparados para lactantes.

El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar un método por cromatografía de gases de espacio en cabeza para la identificación y cuantificación del propanal, pentanal y hexanal presentes en los preparados para lactantes en polvo.

Para el desarrollo del estudio, se utilizaron preparados para lactantes en polvo suplementados con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, facilitados por "Ordesa S.L". Concretamente, fueron suplementados con ácido araquidónico (C20:4n-6) y ácido docosahexaenoico (C22:6n-3). Estos preparados se almacenaron a 50°C durante 4 semanas para producir de este modo una oxidación acelerada.

La validación del método se realizó en términos de linealidad, límites de detección y de cuantificación, precisión y recuperación para los tres compuestos volátiles

A las muestras se les añadió butil acetato como estándar interno y se calentaron durante 15 minutos a 60°C para ser inyectadas posteriormente en el cromatógrafo de gases.

El tiempo y temperatura de equilibrio, el tiempo de muestreo y la disolución de la muestra fueron optimizados para obtener la máxima recuperación de los compuestos volátiles y las mínimas interferencias posibles.

Tras probar diferentes temperaturas de equilibrio (60, 75, 80, 85 y 90°C), manteniendo el resto de parámetros constantes, se observó que el contenido de compuestos volátiles era constante en el rango de 60-80°C, y se optó por seleccionar la temperatura inferior (60°C).

En relación a los tiempos de equilibrio, se probaron los siguientes: 10, 15, 20 y 30 minutos, manteniendo el resto de parámetros constantes, y se observó que el contenido de compuestos volátiles era el mismo para el rango de 15-30 minutos, así se optó por el tiempo de menos duración (15 minutos).

Tras probar diferentes tiempos de muestreo (10, 20, 30 i 40 segundos), manteniendo el resto de parámetros constantes, no se observaron diferencias, y se optó por el de 30 segundos como indicaba el fabricante.

Y finalmente, se optimizó la disolución de la muestra, obteniendo los mejores resultados con la disolución de 0.05 gramos de preparado con 3 ml de agua Milli-Q.

Con los resultados obtenidos se concluyó que el método era lineal, preciso y sensible para la determinación de propanal, pentanal y hexanal en los preparados para lactantes en polvo. Este método puede ser utilizado en la industria alimentaria como control de calidad debido a su sencillez en la preparación de la muestra y a su rapidez.

Headspace gas chromatographic method for determining volatile compounds in infant formulas[☆]

M. Romeu-Nadal, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater*

Dept. Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, Barcelona 08028, Spain

Received 8 March 2004; received in revised form 28 May 2004; accepted 17 June 2004

Abstract

Powder infant milk formula quality deterioration and consequently the termination of shelf life results in the appearance of off-flavors mainly determined by a composite effect of spoilage volatiles. A headspace gas chromatographic method to determine propanal, pentanal and hexanal as the main volatiles present in the headspace of powder infant formula oxidation is described as a rapid indication of oxidative status. Under optimum conditions the limits of detection for propanal, pentanal and hexanal were 17.19, 16.87 and 19.60 ng and the limits of quantification were 37.37, 31.96 and 35.97, respectively. The calibration graphs of the method were linear from 25 to 1500, 20 to 3500 and 30 to 8500 ng for propanal, pentanal and hexanal, respectively, with determination coefficients exceeding 0.99. The precision results showed that the relative standard deviations of the repeatability and reproducibility were between 2.2 and 5.5%. The analytical method was simple, rapid, and reliable and permitted the analysis of a large number of formulas using small sample volumes.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Headspace analysis; Infant formulas; Food analysis; Volatile organic compounds; Hexanal

1. Introduction

The period between processing/packaging and the time when milk becomes unacceptable for consumption is called its “shelf-life”, and reflects its keeping quality [1]. In the case of powder infant formulas, flavour detection is governed, to a large extent, by fat oxidation [2]. Indeed, lipid oxidation is well recognized as a major cause of quality deterioration during processing or the storage of lipid-rich foods. During peroxidation of unsaturated fatty acids, hydroperoxides are formed and these primary products rapidly decompose to form a complex mixture of secondary lipid oxidation products (alkanes, alkenes, aldehydes, ketones, etc.). Various sampling techniques for aroma isolation and concentration have been reported, such as mass spectrometry-based electronic nose, solid-phase microex-

traction gas chromatography–mass spectrometry, and steam distillation [3–5].

On the other hand, the headspace technique [6–8], which requires minimal sample treatment and reduces artifactual volatile formation, has shown to be an easier, more rapid, and reliable method for the determination of the composition of volatile compounds. In the headspace method, the extraction times and the volumes of sample are less than when using the other methods mentioned previously.

Headspace is a technique used for the analysis of volatiles in food products such as oils [9–14], breast and fish [15–18] and milks [19–27]. The headspace methods extracted a greater number of volatile compounds from samples than did solid-phase microextraction method [28].

Powder milk formulas are rich in polyunsaturated fatty acids such as *n* – 6 arachidonic acid (AA) (C20:4, *n* – 6) and *n* – 3 docosahexaenoic acid (DHA) (C22:6, *n* – 3), that are much more susceptible to oxidation than linoleic acid (C18:2, *n* – 6), but the oxidation of the latter is also important because is the majority polyunsaturated fatty acid in these milk formulas [29,30]. Moreover DHA produces flavors and odors that are more objectionable. Pentanal and

[☆] Presented at the 3rd Meeting of the Spanish Association of Chromatography and Related Techniques and the European Workshop: Third Waste Water Cluster, Aguadulce (Almeria), 19–21 November 2003.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 4024512; fax: +34 93 4035931.
E-mail address: mclopez@ub.edu (M.C. López-Sabater).

hexanal are the specific volatile oxidation products of $n - 6$ polyunsaturated fatty acids and propanal is a product of $n - 3$ polyunsaturated.

The purpose of this study was to develop a technique to identify and quantify the propanal, pentanal and hexanal from oxidized and no-oxidized powder infant formulas. The system proposed is a static headspace gas chromatographic (SHS-GC) method.

2. Experimental

2.1. Samples

A formula rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) was selected for investigation. It was supplemented with arachidonic acid (C20:4, $n - 6$) and docosahexaenoic acid (C22:6, $n - 3$).

The powder formula was performed over a short period of time (4 weeks) in order to identify potential early oxidation markers. It was stored at 50 °C and analyzed at 0, 3, and 4 weeks.

2.2. Reagents and standards

Stock standard solutions were prepared by dissolution of volatile compounds in Milli-Q water; and stored at 4 °C. The Milli-Q water was purified by passing through a Compact Milli-Q water system from Millipore (Bedford, MA, USA). The propionaldehyde standard with 97% pure, the valeraldehyde standard with 97% pure, and the butyl acetate with 99.7% pure as internal standard were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). The hexanal standard was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.3. Assay procedure

2.3.1. Headspace analysis procedure

Exactly 0.05 g of powder infant formula was weighed into special 10 ml headspace vials and 2400 μ l of Milli-Q water and followed by 600 μ l of an internal standard solution (0.84 μ g/ml of butyl acetate in Milli-Q water) were added. The vial was sealed with silicone rubber PTFE caps by using a crimper. Immediately, the samples were equilibrated at 60 °C for 15 min with the 2t[®] Vial Heater Model VH 6200 from Tracer (Teknokroma, Barcelona, Spain). The sampling time (which was 30 s) was measured with a 2t[®] Static Headspace Sampler MHS 123 from Tracer.

Five hundred microlitres volume of the sample was injected and the volatile compounds were identified by comparison of their peak retention times with those of the standards.

2.3.2. Gas chromatographic analytical conditions

Propanal, pentanal and hexanal were separated in less than 10 min using a Shimadzu Model GC-14 A gas chro-

matograph equipped with a flame ionization detector, a split-splitless manual injector and an integrator Shimadzu Model C-R6 (Shimadzu, Kyoto, Japan). A fused-silica capillary column was employed, Supelcowax-10 (bonded, Carbowax 20 M polyethylene glycol) 60 m \times 0.32 mm i.d., 0.25 μ m film thickness, supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). The aldehydes were separated isothermally at 75 °C. The injector and the detector temperatures were 185 and 200 °C, respectively, with a split ratio of 1:20. Helium was used as a carrier gas at a linear velocity of 26.02 cm s⁻¹.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of sample

The influence of parameters that potentially affected the extraction process (equilibration and sampling time, equilibration temperature and dilutions with Milli-Q water) was studied in order to establish the optimal conditions for maximum recovery of volatile compounds and minimum appearance of interferences. The profiles of volatile compounds were obtained using a modification of the conditions of the method described by Ulberth and Roubicek [2].

The volatile compounds content was analyzed at different equilibration temperatures, at 60, 75, 80, 85 and 90 °C, keeping equilibration time (10 min), sampling time (30 s) and amount of sample (0.5 g with 3 ml Milli-Q water). Under these conditions, the content of volatile compounds was constant over the range 60–80 °C. We selected the lower temperature (60 °C).

When the equilibration temperature was optimized, different values of equilibration time were analyzed (10, 15, 20 and 30 min), using the same sampling time and the same amount of sample than previously. The content of volatile compound was the same at 15, 20 and 30 min, and it was smaller at 10 min, so the optimum equilibration time was 15 min.

We also proved different sampling time (10, 20, 30 and 40 s) keeping other parameters constants. We did not observed differences between them, and we selected 30 s because manufacturer of the 2t[®] Static Headspace Sampler MHS 123 recommended it.

Finally, the influence of dilution of the sample with Milli-Q water was studied with equilibration temperature, equilibration time and sampling time of 60 °C, 15 min and 30 s, respectively. In this method the powder milk samples were analyzed using nine different dilutions with Milli-Q water. The dilution range was from 0.5 g powder milk with 1 ml of Milli-Q water to 0.02 g with 3 ml (Fig. 1). The propanal content was constant in the different dilutions. On the contrary, the hexanal content increased markedly until the dilution of 0.05 g infant formula with 3 ml Milli-Q water, and the content decreased for more diluted solutions. The pentanal content increased slightly until the dilution of 0.20 g infant formula with 3 ml Milli-Q water, and the

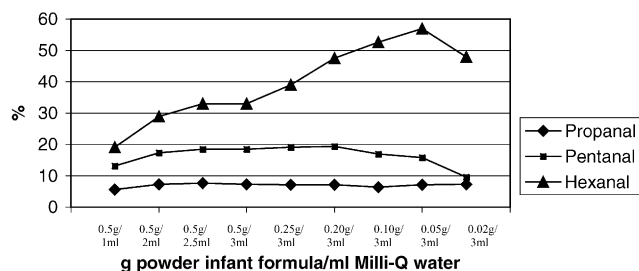


Fig. 1. Volatile compounds obtained in different dilutions of powder formula with Milli-Q water.

content decreased slightly for more diluted solutions. In this way, the optimum dilution was 0.05 g of powder formula with 3 ml of Milli-Q water (2400 μ l Milli-Q water and 600 μ l internal standard solution) because the majority volatile (hexanal) presented the maximum in this dilution, and the reduction of the pentanal was only 3% from the dilution of 0.20 g formula with 3 ml Milli-Q water to 0.05 g with 3 ml.

3.2. Validation of the chromatographic method

3.2.1. Sensitivity

The detection and the quantification limits were calculated according to the USP criteria [31] by analyzing a number of blank samples and calculating the standard deviation of the background response. The standard deviation multiplied by a factor 3 and 10 provides an estimated of the limit of detection and limit of quantification, respectively (Table 1).

3.2.2. Linearity

For quantitative analysis of volatile compounds, the calibration graph was by linear regression. A constant amount of internal standard (0.84 μ g butyl acetate/ml Milli-Q water) was added to increasing analyte concentrations. The

peak-area ratio between propanal, pentanal, hexanal and butyl acetate (y) versus the standard mass of propanal, pentanal and hexanal (x) under these conditions was linear over the range 25–1500 ng of propanal, 20–3500 ng pentanal and 30–8500 ng hexanal (Table 1).

3.2.3. Precision

Precision of the method was expressed as the relative standard deviation (R.S.D.) of replicate measurements. The repeatability was established by injecting the powder milk solution six times. The reproducibility was determined by analyzing each sample of powder formula on 6 different days. Table 1 shows precision results. These results met the acceptable precision standards proposed by Horwitz [32] for analyte concentrations with a range 5–40 ppm for the three volatiles studied.

3.2.4. Recovery

Analyzing a sample five times and comparing the analytical result to the known added value showed the accuracy of the method. For estimating the volatile compound recovery, powder milk samples were spiked with propanal, pentanal and hexanal at two fortification levels, 25 and 100% of the estimated initial volatile compound amount. Table 2 shows the recoveries of propanal, pentanal and hexanal after applying the headspace GC method.

The recovery percentages were satisfactory for three volatiles compounds. The results obtained were within the acceptable range of 87 and 109%.

3.3. Application

Propanal, pentanal and hexanal were identified and quantified in non-oxidized and oxidized powder infant formula samples by comparison of their peak retention times with those of the standards. Fig. 2 shows the chromatogram of standards, the retention times were 4.3, 5.6, 7.0 and 7.3 min

Table 1
Sensitivity, linearity and precision of the proposed method

	Propanal	Pentanal	Hexanal
Sensitivity			
Detection limit (ng)	17.19	16.87	19.60
Quantification limit (ng)	37.37	31.96	35.97
Linearity ($y = ax + b$)			
a : intercept	-0.0007	-0.0194	+0.0567
b : slope	0.8193	1.0956	1.0096
r^2 : determination coefficient	0.999	0.999	0.999
Precision			
Repeatability ^a	5.63 \pm 0.25	8.97 \pm 0.34	39.26 \pm 0.90
R.S.D. (%)	4.51	3.86	2.29
Reproducibility ^b	5.54 \pm 0.30	9.04 \pm 0.42	39.41 \pm 1.99
R.S.D. (%)	5.51	4.68	5.05

y is area of volatile compound/area of internal standard; x is amount of volatile compound (mcg).

^a Repeatability expressed as mean (mg kg^{-1}) \pm standard deviation.

^b Reproducibility expressed as mean (mg kg^{-1}) \pm standard deviation.

Table 2
Recovery of volatile compounds added to infant formula

Volatile compounds	Amount in formula ^a	Amount added ^b	Amount founded ^c	Recovery (%)	Mean recovery (%)
Propanal	3.58 ± 0.25	128	6.16 ± 0.31	107.18 ± 5.29	109.02
	3.58 ± 0.25	40.9	4.68 ± 0.28	110.87 ± 5.50	
Pentanal	7.68 ± 0.42	332	11.38 ± 0.52	88.27 ± 5.69	87.92
	7.68 ± 0.42	72.8	7.72 ± 0.55	87.58 ± 6.34	
Hexanal	27.38 ± 0.67	1484	47.25 ± 2.74	93.59 ± 3.38	90.86
	27.38 ± 0.67	424	30.00 ± 1.68	88.14 ± 5.34	

^a Values are expressed as mean (mg kg⁻¹) ± standard deviation.

^b Values are expressed as mcg.

^c Values are expressed as mean (mg kg⁻¹) ± standard deviation.

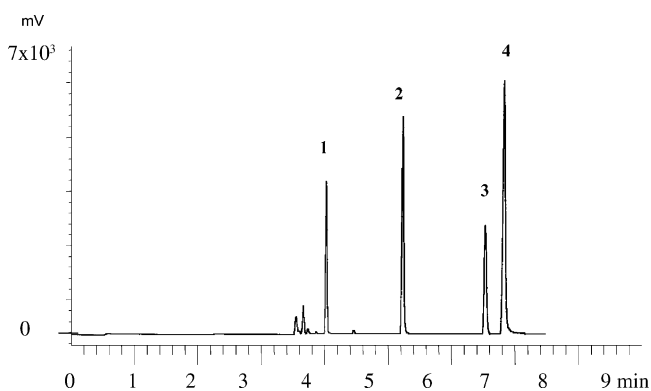


Fig. 2. Chromatogram of standards. Peaks numbered from 1 to 4 correspond to 1, propanal; 2, pentanal; 3, butyl acetate (IS); 4, hexanal. Refer to text for HS-GC conditions.

for propanal, pentanal, butyl acetate and hexanal, respectively.

The oxidized formulas had been stored for over 4 weeks at 50 °C, and analyzed at 0, 3 and 4 weeks. The amount of volatiles was different in these formulas submitted to the static headspace GC method. This procedure gave propanal, pentanal and hexanal amounts ranging from 1.4, 1.5 and 4.6 mg kg⁻¹, respectively, for the relative sample at 0 weeks, up to 5.6, 8.9 and 39.8 mg kg⁻¹ for an oxidized one (Table 3). Therefore, the concentrations of volatiles already present in oxidized milk formulas increased markedly, respectively, non-oxidized sample. Fig. 3 shows the volatile compounds profile obtained by analyzing an infant formula

Table 3
Volatile compounds^a in infant formula analyzed by HS-GC

Volatile compounds	0 weeks	3 weeks ^b	4 weeks ^c
Propanal	1.44 ± 0.06	3.58 ± 0.19	5.63 ± 0.25
Pentanal	1.51 ± 0.05	7.68 ± 0.42	8.97 ± 0.34
Hexanal	4.66 ± 0.21	27.38 ± 0.67	39.84 ± 0.90

^a Values are expressed as mean (mg kg⁻¹) ± standard deviation.

^b Infant formula stored 3 weeks at 50 °C.

^c Infant formula stored 4 weeks at 50 °C.

non-oxidized and oxidized (4 weeks of storage) sample. Volatile compound amounts are very dependent on milk powder formulations and storage conditions. On the basis of these results, propanal, pentanal and hexanal could be used to monitor changes in infant formula oxidation during storage. Because of the high level of propanal, pentanal and hexanal found in oxidized samples and its already observed correlation with off-flavors development in milk products [2], these aldehydes were preferred as potential chemical markers to evaluate infant formulas oxidation using the SHS-GC method.

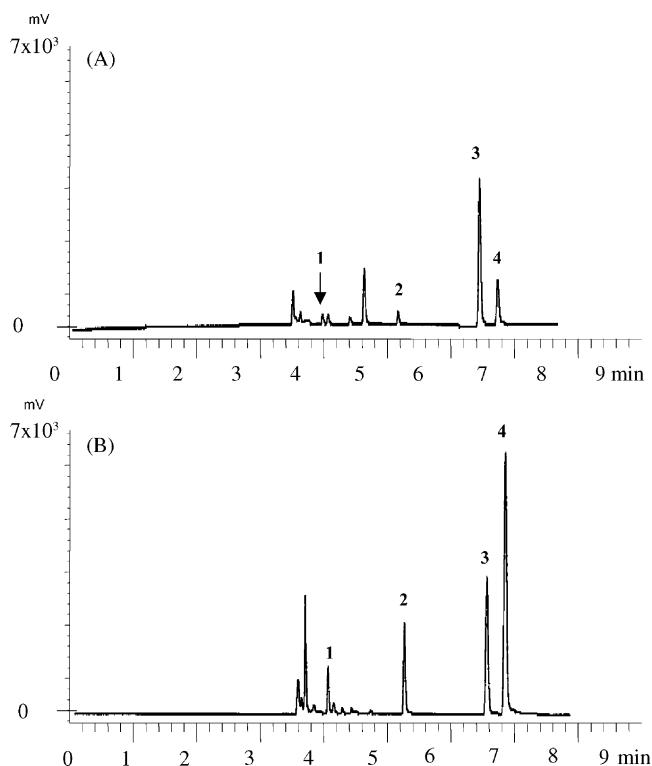


Fig. 3. Chromatograms of volatile compounds in infant formula at 0 weeks (A) and after 4 weeks (B). Peaks numbered from 1 to 4 correspond to 1, propanal; 2, pentanal; 3, butyl acetate (IS); 4, hexanal. Refer to text for HS-GC conditions.

4. Conclusions

The presented results suggest that the proposed method is a reliable, reproducible, and sensitive technique for detecting volatiles in powder infant formulas. The near-absence of sample preparation and the easy-to-use aspect of this technique has potential applications in the food industry as a powerful quality control tool.

Acknowledgements

This study was made possible by financial support from fundació Bosch i Gimpera project 4614 and by a grant of Generalitat de Catalunya who supported Meritxell Romeu Nadal. The authors are grateful to Laboratorios Ordesa S.L. (Sant Boi de Llobregat, Barcelona, Spain) for providing the powdered milk and Mr. Robin Rycroft for revising the English.

References

- [1] B. Vallejo-Cordoba, S. Nakai, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 989.
- [2] F. Ulberth, D. Roubicek, *Int. Dairy J.* 5 (1995) 523.
- [3] F. Fenaille, P. Visani, R. Fumeaux, C. Milo, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2790.
- [4] R.T. Marsili, *Chromatogr. Sci.* 37 (1999) 17.
- [5] N. Hardas, J.L. Danviriyakul, P.P. Nawar, P. Chinachoti, *JAOCS* 79 (2) (2002) 151.
- [6] J.A. Cruwys, R.M. Dinsdale, F.R. Hawkes, D.L. Hawkes, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 195.
- [7] B. Kolb, *J. Chromatogr. A* 842 (1999) 163.
- [8] L. Boyd, M. Fong King, B. Sheldon, *JAOCS* 69 (4) (1992) 325.
- [9] C. Jo, D.U. Ahn, M.W. Byun, *Food Chem.* 76 (2002) 299.
- [10] S.M. Van Ruth, E.S. Shaker, P.A. Morrissey, *Food Chem.* 75 (2001) 177.
- [11] A.K. Kiritsakis, *JAOCS* 75 (6) (1998) 673.
- [12] I. Lee, H.S. Fatemi, E.G. Hammond, P.J. White, *JAOCS* 72 (5) (1995) 539.
- [13] E.N. Frankel, *JAOCS* 70 (8) (1993) 767.
- [14] J.M. Snyder, *JAOCS* 67 (11) (1990) 800.
- [15] M. Du, K. C Nam, S.J. Hur, H. Ismail, D.U. Ahn, *Meat Sci.* 60 (2002) 9.
- [16] R.G. Brannan, M.C. Erickson, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 1361.
- [17] G.A. Schreiber, G. Schulzki, A. Spiegelberg, N. Helle, K.W. Bögl, *J. AOAC Int.* 77 (5) (1994) 1202.
- [18] E. Beltran, R. Pla, J. Yuste, M. Mor-Mur, *Meat Sci.* 64 (2003) 19.
- [19] E. Valero, M. Villamiel, B. Miralles, J. Sanz, I. Martinez-Castro, *Food Chem.* 72 (2001) 51–58.
- [20] N. Hardas, S. Danviriyakul, J.L. Foley, W.W. Nawar, P. Chinachoti, *Food Sci. Technol. Lebensm.-Wissensch. Technol.* 33 (2000) 506.
- [21] E. Valero, M. Villamiel, J. Sanz, I. Martinez-Castro, *Food Chem.* 70 (2000) 77.
- [22] R.A. Edwards, J.A. Ordóñez, R.H. Dainty, E.M. Hierro, L. Hoz, *Food Chem.* 64 (1999) 461.
- [23] E. Valero, J. Sanz, I. Martinez-Castro, *Food Chem.* 66 (1999) 333.
- [24] G. Contarini, M. Povolò, R. Leardi, P.M. Toppino, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3171.
- [25] Y.D. Kim, C.V. Morr, *Int. Dairy J.* 6 (1996) 185.
- [26] D.L. Moreau, M. Rosenberg, *J. Dairy Sci.* 78 (1995) 114.
- [27] H. Shiratsuchi, M. Shimoda, K. Imayoshi, K. Noda, Y. Osajima, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 984.
- [28] M. Fabre, V. Aubry, E. Guichard, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1497.
- [29] F. Ulberth, D. Roubicek, *Int. Dairy J.* 5 (1995) 523.
- [30] S. Giammarioli, A.M. Lammardo, B. Sanzini, G. Bellomonte, *Riv. Sci. Aliment.* 2 (1997) 80.
- [31] The United States Pharmacopeia (USP XXIII), Mack Printing, Easton, 1989, p. 1711.
- [32] W. Horwitz, *Anal. Chem.* 54 (1982) 67A.

Publicación 7**ESTABILIDAD OXIDATIVA DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA DE FÓRMULAS LÁCTEAS EN POLVO**

M. Romeu-Nadal, J. L. Chávez-Servín, A. I. Castellote, M. Rivero and M.C. López-Sabater

La oxidación lipídica es la principal causa de deterioro de los alimentos con una fracción grasa importante. La reacción del oxígeno atmosférico con lípidos insaturados produce los compuestos primarios de oxidación (hidroperóxidos), que pueden seguir evolucionando hasta los compuestos secundarios de oxidación, entre los que se encuentran los volátiles, siendo responsables de los cambios en el gusto y olor de los alimentos como son los preparados para lactantes.

La composición en ácidos grasos de la leche humana cubre perfectamente las necesidades del recién nacido, pero a veces en el caso de los preparados para lactantes se requiere adicionar ciertos ácidos grasos, como son los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CLs), concretamente el ácido araquidónico (AA, C20:4n-6) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3). Ambos son esenciales en el periodo perinatal porque los recién nacidos a pre-término, y posiblemente los nacidos a término no sintetizan suficiente cantidad de estos AGPI-CLs desde sus precursores, ácido linoleico y ácido α -linolénico para cubrir sus necesidades. El DHA y el AA son de mayor importancia durante este periodo en que el cerebro y la retina están en desarrollo.

También existen fórmulas lácteas en polvo suplementadas con AGPI-CLs de la serie n-3 para adultos con la finalidad de proteger frente las enfermedades coronarias.

Debido a la mayor cantidad en AGPI-CLs, las fórmulas lácteas suplementadas son más fácilmente oxidables que aquellas no suplementadas.

El objetivo de este estudio fue predecir la vida útil de unas fórmulas lácteas con diferentes niveles de AGPI-CLs y almacenadas a diferentes temperaturas.

Se estudiaron tres fórmulas lácteas en polvo de una escala piloto en una industria de alimentos. Una fórmula no suplementada (NSF), una suplementada con 0.83% y 0.47% de n-3 y n-6 AGPI-CLs (SFA), y otra suplementada con 27.80% y 3.51% de AGPI-CLs n-3 y n-6 (SFB), respectivamente. La suplementación se realizó mediante un aceite líquido del microorganismo *Mortierella alpina* (ARASCO[®]), rico en ácido araquidónico, y con aceite de pescado seco (Dry n-3[®]), rico en AGPI-CLs n-3.

Para realizar este estudio, la NSF se almacenó a 25°C y las fórmulas suplementadas se almacenaron a 25°C y a 37°C desde su producción hasta los 15 meses de almacenaje. Todas las muestras fueron analizadas al inicio del estudio y después de los 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 y 15 meses. Para cada periodo de análisis las muestras fueron congeladas a -80°C con atmósfera de nitrógeno hasta su análisis.

De las tres fórmulas se estudiaron los hidroperóxidos, los compuestos volátiles (propanal, pentanal y hexanal) y se realizaron dos ensayos sensoriales, un test duo-

trio y un test de comparación de parejas en el que se analizaron 4 características: "mejor sabor", "sabor más duradero", "mejor olor" y "más sabor a rancio". También se analizaron los AGPI-CLs mayoritarios de cada fórmula, así para la SFA se estudiaron el AA y el DHA, y para la SFB, se analizaron el DHA y el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3).

La estabilidad de las fórmulas estudiadas determinada en función del contenido en hidroperóxidos, del contenido en compuestos volátiles, así como en función del análisis sensorial, decrece en el orden de NSF > SFA a 25°C > SFA a 37°C >> SFB a 25°C > SFB a 37°C. Además el "sabor a rancio" no fue detectado hasta los 15 meses de conservación.

También se observó que el contenido DHA y AA en la SFA fue estable a lo largo de los 15 meses de almacenamiento, tanto a 25°C como a 37°C. En cambio, en la SFB se observó que el contenido de DHA y EPA disminuía a partir de los 6 meses de almacenaje tanto a 25°C como a 37°C.

En conclusión, la vida útil de los preparados lácteos en polvo depende claramente de su contenido en ácidos grasos poliinsaturados, y del tiempo y temperatura de su conservación.

Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas

M. Romeu-Nadal^a, J.L. Chávez-Servín^a, A.I. Castellote^a,
M. Rivero^b, M.C. López-Sabater^{a,*}

^a *Departament de Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII, s/n, E-08028 Barcelona, Spain*

^b *Scientific Department, ORDESA Lab. SL, Sant Boi de Llobregat, Barcelona, Spain*

Received 31 January 2005; accepted 19 October 2005

Abstract

The purpose of this study was to predict the shelf life of distinct milk powder formulas by measuring hydroperoxides, headspace volatile compounds (propanal, pentanal and hexanal), fatty acid content, and sensory quality. The oxidation stability of three formulas was followed over 15 months of storage at 25 and 37 °C. These formulas were a non-supplemented formula (NSF), and two formulas supplemented with $n - 3$ and $n - 6$ long-chain polyunsaturated fatty acids, a formula with 0.83 and 0.47% (SFA), and one with 27.8 and 3.51% of $n - 3$ and $n - 6$ long-chain polyunsaturated fatty acids (SFB), respectively. Relative stability decreased in the order NSF at 25 °C > SFA at 25 °C >> SFA at 37 °C >> SFB at 25 °C > SFB at 37 °C. Therefore, we conclude that the polyunsaturated fatty acid content, storage temperature and storage time are very important factors for determining the oxidation stability.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Milk formula; Volatile compound; Fatty acid; Sensory analysis

1. Introduction

Oxidative changes should be considered as a system of complex interactions between distinct food components. Lipid oxidation has received much attention because of its undesirable implications for human health and its contribution to a decrease in the nutritional value of foods. Lipid oxidation is the main cause of deterioration of lipids and lipid-containing foodstuffs. Reaction of atmospheric oxygen with unsaturated lipids produces a wide range of hydroperoxides. Lipid peroxidation is responsible for the changes in taste and odours of food products, such as milk powders, through the development of off-flavours, which are caused by the formation of secondary reaction products (alkanes, alkenes, aldehydes and ketones) (Fenaille, Visani, Fumeaux, Milo, & Guy, 2003; Valero, Villamiel, Miralles, Sanz, & Martínez-Castro, 2001; Vichi, Pizzale, Conte, Buxaderas, & López-Tamames, 2003). Current assays to

assess food oxidative rancidity involve the measurement of hydroperoxides for the determination of primary oxidation products and low molecular weight aldehydes for secondary products (Cho, McClements, & Decker, 2002; Frankel, Satué-Gracia, Meyer, & German, 2002; Hardas, Danviriyakul, Foley, Nawar, & Chinachoti, 2002; Nuchi, McClements, & Decker, 2001).

The fatty acid composition of human milk meets these requirements of the neonate perfectly but, at certain times, milk powder formulas are required, in addition to, or as substitutes for, human milk. Therefore, the ingredients of these formulas have a great influence on infant metabolism and tissue composition. At present, the amount of added essential fatty acids, linoleic acid (C18:2 $n - 6$) and linolenic acid (C18:3 $n - 3$), in milk powder formulas is adequate for the healthy growth of infants. However, there has been increasing interest in the supplementation of these formulas with long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA), specifically with arachidonic acid (C20:4 $n - 6$, AA) and docosahexaenoic acid (C22:6 $n - 3$, DHA), which are conditionally essential in the perinatal period because preterm,

* Corresponding author. Tel.: +34 93 4024512; fax: +34 93 4035931.
E-mail address: mclopez@ub.edu (M.C. López-Sabater).

and possibly new-born infants do not synthesize sufficient amounts of these fatty acids from their precursors, linoleic and linolenic acid, respectively, to cover their needs (Calson, 2000; Lapillonne et al., 2000; Minda, Molnár, Burus, & Decsi, 2002; Smit, Koopmann, Boersma, & Muskiet, 2000). DHA and AA are of major importance during this period of life in which the brain and retina are developing, and therefore have an influence upon visual acuity and learning abilities (Crawford, 2000; Jeffrey, Weisinger, Neuringer, & Mitchell, 2001; Jensen, Maude, Anderson, & Heird, 2000; Kulas & Ackman, 2001; Makrides & Gibson, 2000; Neuringer, 2000; Salem, Litman, Kim, & Gawrisch, 2001).

A number of highly unsaturated dietary lipid sources are currently available, e.g., as LC-PUFA supplements for infant formulas, such as egg yolk lipids, low eicosapentaenoic acid (C20:5, $n - 3$, EPA) fish oils and oils synthesized from *Mortierella alpina* and *Crypthenocodium cohnii*, fungal and algal organisms that synthesize oils rich in AA and DHA, respectively. These oils do not exhibit toxic effects (Arterburn et al., 2000; Frankel et al., 2002; Kulas & Ackman, 2001).

There are a lot of milk formulas supplemented with $n - 3$ LC-PUFA intended for adults. The $n - 3$ LC-PUFA can protect against coronary heart disease. Both health professionals and the public are increasingly interested in their role in the prevention and control of coronary heart disease. In this era of multiple pharmacological treatments for cardiovascular disease, many believe that simple dietary interventions or nutritional supplements may be a more natural and acceptable method of providing benefits (Din, Newby, & Flapan, 2004).

Because LC-PUFA are highly susceptible to oxidation, with simultaneous formation of adverse flavours, the aim of this study was to predict the oxidation stability of different powder milk formulas, a non-supplemented formula and two formulas supplemented with different content of $n - 3$ and $n - 6$ LC-PUFA.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Three types of milk powder formulas were obtained from a pilot scale food plant. The base of all formulas was whole milk, and all contained 26.0, 58.0 and 12.0 (g/100 g) of fat, carbohydrates and proteins, respectively. The difference between them was the supplementation with fatty acids. The first formula was non-supplemented (NSF). The other formulas were supplemented with $n - 3$ and $n - 6$ LC-PUFA at different levels (Table 1): supplemented with 0.83 and 0.47% of $n - 3$ and $n - 6$ LC-PUFA (SFA), and with 27.8% and 3.51% (SFB), respectively. They were packed in 400 g unbroken aluminium foil bags flushed with nitrogen. SFA and SFB were supplemented with wet oil of fungal microorganism *Mortierella alpina* (ARASCO® Martek Biosciences, Columbia, MD), rich in

Table 1
Fatty acid compositions of milk powder formulas

Fatty acid (%)	Means \pm SD ^a		
	NSF ^b	SFA ^c	SFB ^d
C4:0	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.46 \pm 0.02
C6:0	0.07 \pm 0.00	0.07 \pm 0.00	0.75 \pm 0.03
C8:0	0.74 \pm 0.01	0.73 \pm 0.02	0.63 \pm 0.00
C10:0	0.74 \pm 0.01	0.75 \pm 0.02	1.59 \pm 0.00
C12:0	9.53 \pm 0.11	9.67 \pm 0.24	2.38 \pm 0.03
C14:0	3.96 \pm 0.01	3.93 \pm 0.11	6.89 \pm 0.09
C15:0	0.05 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	0.70 \pm 0.01
C16:0	21.9 \pm 0.05	21.9 \pm 0.60	22.4 \pm 0.27
C16:1 $n - 7$	0.13 \pm 0.00	0.15 \pm 0.01	0.17 \pm 0.03
C17:0	0.09 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.32 \pm 0.00
C18:0	4.02 \pm 0.01	4.12 \pm 0.14	8.24 \pm 0.03
C18:1 $n - 9$ $n - 7$	40.3 \pm 0.15	40.3 \pm 0.18	19.78 \pm 0.11
C18:2 $n - 6$	16.5 \pm 0.08	16.47 \pm 0.49	2.82 \pm 0.04
C20:0	0.65 \pm 0.02	0.36 \pm 0.01	0.04 \pm 0.00
C18:3 $n - 3$	1.06 \pm 0.00	1.03 \pm 0.00	0.41 \pm 0.00
C20:1 $n - 9$	0.18 \pm 0.00	0.26 \pm 0.00	0.86 \pm 0.16
C22:0	n.d. ^e	0.03 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00
C20:4 $n - 6$ (AA)	0.34 \pm 0.00	0.42 \pm 0.01	1.81 \pm 0.01
C22:1 $n - 9$	n.d. ^e	n.d. ^e	0.02 \pm 0.00
C20:5 $n - 3$ (EPA)	n.d. ^e	0.20 \pm 0.01	5.47 \pm 0.05
C22:2 $n - 6$	n.d. ^e	0.01 \pm 0.00	0.06 \pm 0.00
C22:4 $n - 6$	n.d. ^e	0.04 \pm 0.00	1.64 \pm 0.03
C22:5 $n - 3$	n.d. ^e	0.06 \pm 0.00	1.48 \pm 0.06
C22:6 $n - 3$ (DHA)	n.d. ^e	0.57 \pm 0.01	20.9 \pm 0.35
PUFA ^f	17.9	18.8	34.54
SFA ^g	41.7	41.7	44.4
SFA/PUFA	2.33	2.22	1.29
$n - 3$ LC-PUFA ^h	n.d. ^e	0.83	27.8
$n - 6$ LC-PUFA ⁱ	0.34	0.47	3.51
$n - 3$ PUFA ^j	1.06	1.86	28.21
$n - 6$ PUFA ^k	16.8	16.9	6.33

^a SD, standard deviation.

^b NSF, non-supplemented formula.

^c SFA, supplemented formula A.

^d SFB, supplemented formula B.

^e n.d., not detected.

^f PUFA, polyunsaturated fatty acids.

^g SFA, saturated fatty acids.

^h $n - 3$ LC-PUFA, $n - 3$ long-chain polyunsaturated fatty acids.

ⁱ $n - 6$ LC-PUFA, $n - 6$ long-chain polyunsaturated fatty acids.

^j $n - 3$ PUFA, $n - 3$ polyunsaturated fatty acids.

^k $n - 6$ PUFA, $n - 6$ polyunsaturated fatty acids.

arachidonic acid, and with encapsulated dry fish oil (Dry $n - 3$ ®, BASF Health and Nutrition, Ballerup, Denmark), rich in $n - 3$ LC-PUFA.

2.2. Storage

For this study, the formulas were stored (in a storage chamber with a heater thermostat) at two controlled temperatures (25 and 37 °C), from production until 15 months of storage. The NSF was stored at 25 °C, and the SFA and SFB at 25 and 37 °C. All samples were analyzed at the beginning of storage (0 months) and after 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 and 15 months.

For each analysis period, the samples were withdrawn and stored at -80 °C under nitrogen until analysis was performed.

2.3. Fat extraction

Fat was extracted from the supplemented powder formulas, following a procedure by the manufacturer to liberate the oil from the coated product, using a modification of the method proposed by De la Presa, López, and Rivero, 1995. Supplemented milk formula (30 g) was reconstituted with distilled water (100 ml) and 8 g alcalase[®] 3.0 T (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark). The sample was placed in a water bath at 35 °C for 30 min with regular stirring. Absolute ethanol (100 ml), absolute dichloromethane (200 ml) and sodium chloride (approximately 5 g) were added while the flask was stirred to avoid protein precipitation. The sample was placed in a water bath at 25 °C for 30 min with regular stirring, and was centrifuged at 3000g for 5 min. The organic phase was filtered through anhydrous granulated Na₂SO₄, and dichloromethane was removed by a rotatory evaporator. Diethyl ether (40 ml) was added while the flask was being stirred. The sample was then filtered through sodium sulfate anhydrous, and diethyl ether was removed by a rotatory evaporator. Fat was kept in dark vials that were flushed with nitrogen, capped tightly, and stored at –20 °C prior to analysis. To prevent possible oxidative decay of polyunsaturated fatty acids, exposure to high temperatures and bright light were avoided throughout the process. Fat was extracted from NSF using the same method, but without alcalase.

2.4. Fatty acid composition

Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared with methanolic BF₃ and dissolved in hexane, following the method described by López-López, Castellote, and Lopez-Sabater (2001). Injector and detector temperatures were kept at 250 and 270 °C, respectively, with a split ratio of 1:30. Fatty acids were separated on a fused silica column (30 m × 0.25 mm ID) coated with SP-2330 stationary phase. The oven temperature was programmed as follows: initial temperature 70 °C for 3 min, followed by an increase of 7 °C/min to 180 °C, and then an increase of 4 °C/min to 240 °C, then left to stand for 5 min at 240 °C. The FAMES were stored at –20 °C until injection into the gas chromatograph. Analyses were carried out in triplicate.

2.5. Peroxide value determination

Lipid hydroperoxides were determined using an iodometric method described in The Regulation EEC/2568/91 of the European Union Commission. Analyses were carried out in triplicate.

2.6. Volatile compound determination

Headspace aldehydes were determined, following the method described by Romeu-Nadal, Castellote, and

López-Sabater, 2004. The sample (0.05 g) was weighed into 10 ml headspace vials and 2400 µl of Milli-Q water and 600 µl of an internal standard solution (butyl acetate in Milli-Q water) were added.

For supplemented formulas, it was also necessary to add 0.9 g alcalase[®] 3.0 T. The vial was placed in a water bath at 35 °C for 30 min to release the volatile compounds from the coated product.

The headspace conditions were the following: equilibration temperature, 60 °C; equilibration time, 15 min, and sampling time, 30 s. Aldehydes were separated isothermally in less than 10 min at 75 °C on a fused-silica capillary column, Supelcowax-10, 60 m × 0.32 mm ID, 0.25 µm film thickness. The injector and the detector temperatures were 185 and 200 °C, respectively, with a split ratio of 1:20. Concentrations of propanal, pentanal and hexanal were determined, in triplicate, from peak area using their respective calibration curves.

2.7. Sensory analysis

Sensory analysis was performed at the beginning of the experiment (0 months), and after 8 and 15 months of storage at 25 °C for the SFA, and at 0, 8 and 15 months of storage at 25 °C for the SFB. Fourteen panel members were selected for the taste panel on the basis of their ability to consistently select the oxidized samples in a preliminary duo-trio test. Panel members were trained for a duo-trio test and several supplemented formulas, which had been stored under distinct conditions, were used to train them to recognize the taste and smell of oxidized fat.

In the duo-trio test, the panel members were presented with three products; the first was identified as the reference (R) and the other two were coded with a randomized three decimal number code, one of which matched the reference sample. The panel members were asked to indicate the product that was most similar to the reference.

The pair comparison test was a two-product test, and the panel members were asked to indicate, by circling or by similar means, the product that had more of a specific characteristic, which was identified before the test and stated on the scoreboard. Four characteristics were studied: better flavour, more lasting flavour, better smell and more rancid flavour. In this study, we accepted the option “no difference”.

The 14 panel members carried out each duo-trio test and each pair comparison test, in triplicate, over several days. Therefore, a total of 42 sensory tests were performed.

To test for significant differences in flavour, duo-trio tests were conducted between the SFA at 0, 8 and 15 months of storage, and between the SFB at 0, 8 and 15 months of storage.

The milk powder formulas were reconstituted with water, following the manufacturer's instructions, and 25 ml of the formulas were presented to the panel members in coded, odourless, opaque plastic cups.

2.8. Statistical analysis

For the statistical analysis of the sensory test, we used the tables T9 (duo-trio test for difference and two-sided paired comparison test for difference: critical number of correct answers) presented in the book “Sensory Evaluation Techniques” (Meilgaard, Civille, & Carr, 2000) and established the significance level at $\alpha = 0.01$ (1%).

3. Results and discussion

To determine the effects of polyunsaturated fatty acids content, storage temperature (25 and 37 °C) and storage time on the oxidative stability of milk powder formulas, we measured hydroperoxides and volatile compounds (propanal, pentanal and hexanal) as primary and secondary oxidation products, respectively. We also measured the concentrations of DHA, AA and EPA, and assessed sensory quality.

The NSF was selected as control and it was studied at 25 °C. The SFA and SFB were selected for having LC-PUFA contents very different between them and were studied at 25 and 37 °C.

The peroxide value is a good indicator of the quality of fat. Freshly refined fats should have hydroperoxide levels of less than 1 mequiv. O₂/kg (Rosell (1989)). The limiting peroxide value specified by Joint FAO/WHO, 1989 standards for refined oil is 10 mequiv. O₂/kg. This study showed values of 0.52, 0.85 and 0.98 mequiv. O₂/kg for the NSF, SFA and SFB, respectively, at the beginning of storage, indicating that they were satisfactory (Fig. 1).

After 15 months of storage, NSF showed a hydroperoxide level of only 1.48 mequiv./kg. In contrast, for SFA at 25 and 37 °C, these levels increased slowly, being 4.5- and 10.5-fold greater than initial values.

In contrast, for SFB, hydroperoxides increased at an accelerated rate, reaching a maximum at 8 month's storage as at 25 and 37 °C (12.9 and 20.3 mequiv. O₂/kg, respectively), and declined thereafter. The accelerated rate of

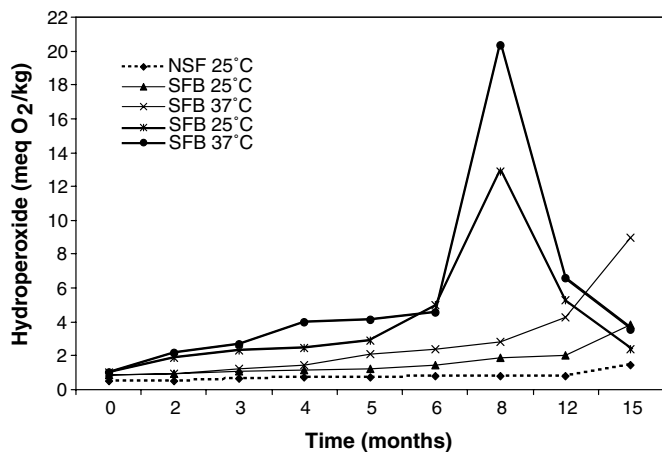


Fig. 1. Evolution of hydroperoxides in non-supplemented formula (NSF) stored at 25 °C, supplemented formula A (SFA) at 25 and 37 °C and supplemented formula B (SFB) at 25 and 37 °C. Means of $n = 3$ analyses.

hydroperoxide development at 8 months was 13.2- and 20.7-fold greater than the initial values for SFB stored at 25 and 37 °C, the hydroperoxide values in both being higher than permitted values for refined oils.

Storage temperature is a key parameter of oxidation stability in powdered milk (Cluskey et al., 1997; De la Presa et al., 1995; Stapelfeldt, Nielsen, & Skibsted, 1997). Thus, the relative stability of powder formulas, measured as hydroperoxide concentrations at 15 months of storage, decreased in the order NSF > SFA at 25 °C > SFA at 37 °C \gg SFB at 25 °C > SFB at 37 °C.

Three volatile compounds were selected for monitoring the secondary oxidation process: propanal, pentanal and hexanal. Static headspace gas chromatography was used to analyze propanal as a specific marker for the oxidation of $n - 3$ fatty acids (Boyd, King, & Sheldon, 1992; Frankel et al., 2002; Frankel, 1993; Nuchi et al., 2001); and pentanal and hexanal, mostly hexanal, for the oxidation of $n - 6$ fatty acids (Abdalla & Roozen, 1999; Frankel, 1982; Nuchi et al., 2001; Satué-Gracia, Frankel, Rangavajhyala, & German, 2000). Several authors have already reported this group of compounds in dairy products (Fenaille et al., 2003; Marsili, 1999). As aldehydes were the most abundant volatiles, their ability to discriminate the milk samples was further checked by following their formation kinetics through 15 months of storage. NSF and SFA samples exhibited clear differences in terms of the evolution of these three aldehydes compared to those for SFB.

SFA stored at 37 °C showed a lag time of 3 months for pentanal and hexanal formation, 5 months for SFA stored at 25 °C, and 12 months for NSF at 25 °C (Fig. 2).

Pentanal and hexanal levels at 15 months of storage were 8.0- and 13.2-fold greater than the values of the third month in NSF, 12.8- and 17.4-fold greater in SFA at 25 °C, and 20.4- and 28.3-fold greater in SFA at 37 °C, respectively (Fig. 2(b)–(c)). The low volatile compound formation in NSF was consistent with the corresponding hydroperoxide levels obtained for this formula. On the other hand, propanal formation, in SFA samples, increased very slowly during the 15 months of storage.

Regarding SFB, pentanal and hexanal values increased but these values were lower than those in the SFA. In contrast, the propanal content increased, the concentration at 15 months being 15.8- and 22.1-fold greater than the values of the third month in SFB at 25 and 37 °C, respectively. SFB showed lag periods for propanal formation of 5 and 3 months for samples stored at 25 and 37 °C, respectively (Fig. 2(a)).

An inverse relationship was observed between hydroperoxides and volatile compounds in SFB after 8 months at 25 and 37 °C, indicating the progression of oxidation from a primary to a secondary state (Figs. 1 and 2). These results are consistent with those reported in other studies (Cluskey et al., 1997; Diaz, Dunn, McClements, & Decker, 2003; Nuchi et al., 2001).

A distinct order of stability was observed on the basis of pentanal and hexanal analyses after 15 months of storage,

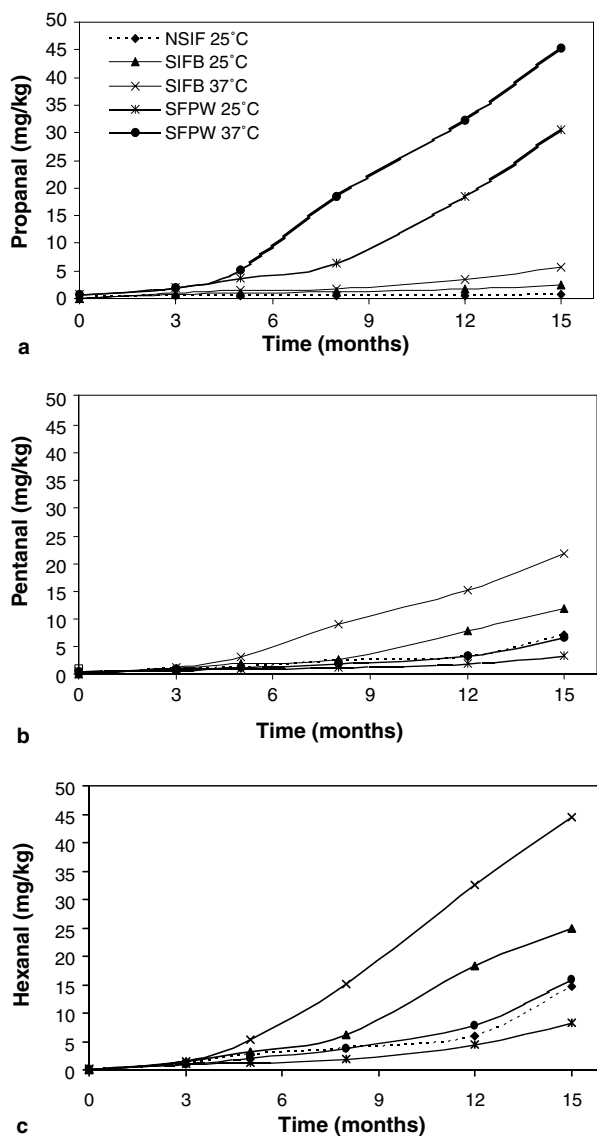


Fig. 2. Evolution of propanal (a), pentanal (b) and hexanal (c) in non-supplemented formula (NSF) stored at 25 °C, supplemented formula A (SFA) at 25 and 37 °C, and supplemented formula B (SFB) at 25 and 37 °C.

with a decreasing order $NSF > SFA$ at 25 °C \gg SFA at 37 °C. And on the basis of propanal analyses, the stability decreased in the order SFB at 25 °C \gg SFB at 37 °C. Lipid oxidation was greater and more rapid at 37 °C than at 25 °C in all the formulas.

On the basis of our results, pentanal and hexanal could be used to monitor oxidative changes in formulas with high levels of $n - 6$ PUFA, e.g., NSF (16.8%) and SFA (16.9%), and propanal for formulas with high levels of $n - 3$ PUFA, e.g., SFB (28.2%), due to pentanal and hexanal, are breakdown products from the oxidation of $n - 6$ polyunsaturated fatty acids, and propanal is a breakdown product from the oxidation of $n - 3$ polyunsaturated fatty acids.

In addition, we studied the major LC-PUFAs: DHA and AA for the SFA (Fig. 3), and DHA and EPA for the SFB (Fig. 4). DHA and AA concentrations in SFA samples

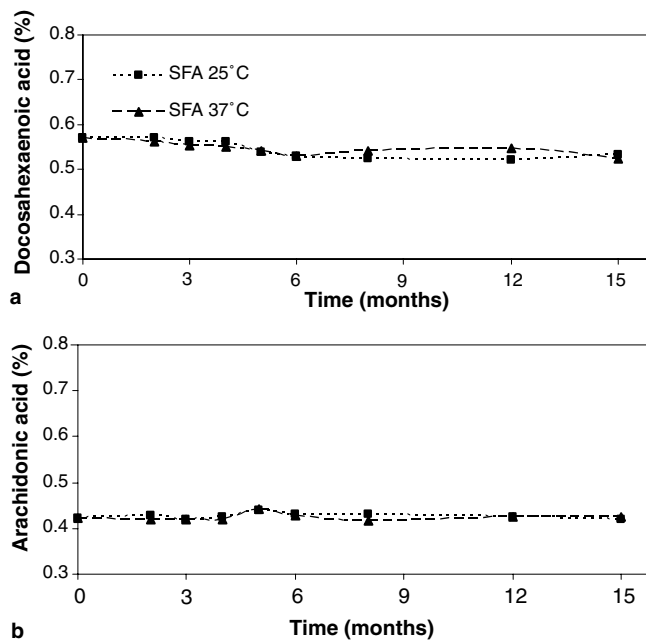


Fig. 3. Evolution of docosahexaenoic acid (a) and arachidonic acid (b) for the supplemented formula A (SFA) at 25 and 37 °C.

were stable during 15 months of storage, as well as at 25 and 37 °C.

In contrast, DHA and EPA concentrations decreased in SFB stored at 25 and 37 °C. This decrease occurred in the same storage time in which maximum hydroperoxide values were recorded (8 months) and was higher at 37 °C than at 25 °C.

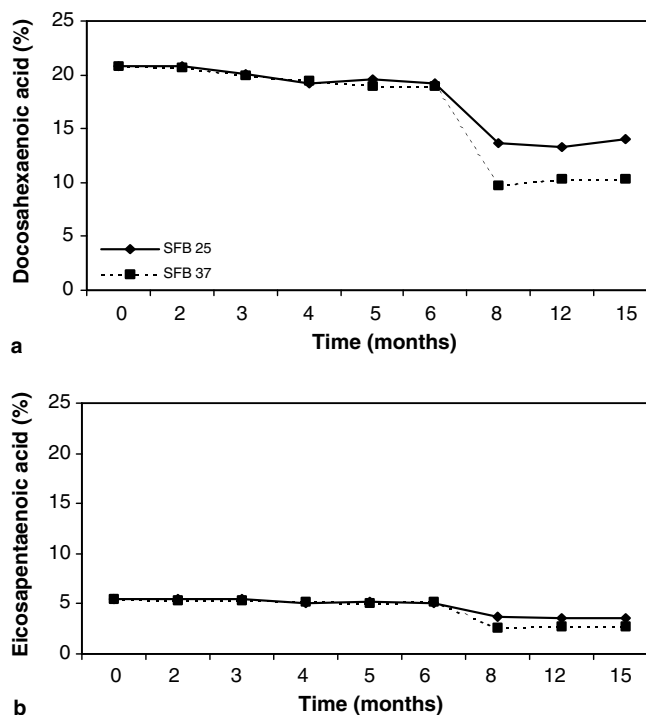


Fig. 4. Evolution of docosahexaenoic acid (a) and eicosapentaenoic acid (b) for the supplemented formula B (SFB) at 25 and 37 °C.

Several studies have addressed the sensorial quality of milk powder formulas (De la Presa et al., 1995; Stapelfeldt et al., 1997). Sensorial tests were performed for SFA and SFB (Table 2) and 0 months was compared with 8 and 15 months of storage at 25 °C. No significant differences were found between 0 and 8 months for either formula.

In contrast, significant differences were found between the SFB at 0 months and after 15 months of storage at 25 °C; 95% of the panel members detected differences. Significant differences were also found when the SFA at 0 months were compared with the SFA stored for 15 months at 25 °C (88%).

Four characteristics were analyzed using the pair comparison test, “better flavour”, “more lasting flavour”, “better smell” and “more rancid flavour” for SFA (Table 3) and for SFB (Table 4) at 0, 8 and 15 months of storage. No significant differences in SFA and SFB at 25 °C were observed between 0 and 8 months of storage. The same occurred in SFA and SFB for “better smell” and “more lasting flavour” when 0 and 15 months of storage were compared.

However, significant differences for “rancid flavour” and “better flavour” were found when we compared 0 and 15 months of storage for the two formulas. When SFA at 0 months was compared with that at 15 months

of storage, 75% of the panel members classified the samples at 0 months as “better flavour”, and 78% selected the samples stored for 15 months as “more rancid flavour”.

Regarding the SFB, 88% of panel members recorded the samples at 0 months as “better flavour” and 89% selected the samples stored for 15 months as “more rancid flavour”.

The sensory analysis results agree with the volatile compound values, which were higher at 15 months of storage than at the beginning of the experiment. At 15 months of storage, the pentanal and hexanal concentrations were about 12 and 25 mg/kg for SFA at 25 °C, respectively, and propanal was above 30 mg/kg for SFB at 25 °C.

In conclusion, the shelf life of whole milk powder clearly depends on the polyunsaturated fatty acid content, storage temperature and storage time. The relative stability of powder formulas, measured as hydroperoxides, lag time of the volatile compounds and sensory analysis, decreased in the order: NSF > SFA at 25 °C > SFA at 37 °C ≫ SFB at 25 °C > SFB at 37 °C. Therefore, the concentration of polyunsaturated fatty acids is crucial for oxidation stability: in SFB, the percentages of AA, EPA and DHA (1.81%, 5.47% and 20.85%; respectively) were higher than NSF (0.34%, not detected and not detected) and than SFA (0.42%, 0.20% and 0.57%) at the beginning of storage (Table 1).

Table 2
Duo-trio sensory analysis test in milk powder formulas at 25 °C during storage period

	SFA ^a		SFB ^b	
	0 vs. 8 months	0 vs. 15 months	0 vs. 8 months	0 vs. 15 months
Detected differences (%)	62	88*	55	95*
Not detected differences (%)	38	12	45	5

^a SFA, supplemented formula A.

^b SFB, supplemented formula B.

* Significant differences detected ($p < 0.01$), $n = 42$.

Table 3
Paired comparison test in supplemented formula A (SFA) during storage period at 25 °C

Characteristic	SFA 0 vs. 8 months			SFA 0 vs. 15 months		
	0 months	8 months	Indifferent	0 months	15 months	Indifferent
Better flavour (%)	37	24	39	75*	5	20
More lasting flavour (%)	24	36	40	21	26	53
Better smell (%)	21	21	58	33	24	43
More rancid flavour (%)	14	14	72	7	78*	15

* Significant differences detected ($p < 0.01$), $n = 42$.

Table 4
Paired comparison test in supplemented formula B (SFB) during storage period at 25 °C

Characteristic	SFB 0 vs. 8 months			SFB 0 vs. 15 months		
	0 months	8 months	Indifferent	0 months	15 months	Indifferent
Better flavour (%)	47	26	27	88*	8	4
More lasting flavour (%)	21	43	36	31	30	59
Better smell (%)	24	24	52	33	24	43
More rancid flavour (%)	10	20	70	4	89*	7

* Significant differences detected ($p < 0.01$), $n = 42$.

Nevertheless, an off-flavour was not detected until 15 months of storage in the formulas stored at 25 °C. The propanal is used to monitor oxidative changes in formulas supplemented with $n - 3$ PUFA, and pentanal and hexanal for formulas supplemented with $n - 6$ PUFA. On the other hand, we observed that the samples stored at 37 °C were less stable than the same samples stored at 25 °C, indicating that storage temperature is important in lipid oxidation of milk powder formulas.

Acknowledgement

This study was supported by the *Fundació Bosch i Gimpera* Project 4614 and by a Grant from *Generalitat de Catalunya* to Meritxell Romeu Nadal. The authors thank Laboratorios Ordesa S.L. (Sant Boi de Llobregat, Barcelona, Spain) for providing the powdered milk and Mr. Robin Rycroft for revising the English.

References

- Abdalta, A. E., & Roozen, J. P. (1999). Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chemistry*, *64*, 323–329.
- Arterburn, L. M., Boswell, K. D., Lawlor, T., Cifone, M. A., Murli, H., & Kyle, D. J. (2000). In vitro genotoxicity testing of ARASCO® and DHASCO® oils. *Food and Chemical Toxicology*, *38*, 971–976.
- Boyd, L. C., King, M. F., & Sheldon, B. (1992). A rapid method for determining the oxidation of $n - 3$ fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *69*(4), 325–330.
- Calson, S. E. (2000). Behavioral methods used in the study of long-chain polyunsaturated fatty acid nutrition in primate infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, *71*, 268S–274S.
- Cho, Y., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2002). Ability of surfactant micelles to alter the physical location and reactivity of iron in oil-in-water emulsion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *50*, 5704–5710.
- Cluskey, S. M. C., Connolly, J. F., Devery, R., O'Brien, B., Harrington, D., & Stanton, C. (1997). Lipid and cholesterol oxidation in whole milk powder during processing and storage. *Journal of Food Science*, *62*(2), 331–337.
- Commission Regulation (EEC) n 2568/91 of July 11th 1991 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis.
- Crawford, M. A. (2000). Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants. *Journal Clinical of Nutrition*, *71*, 275S–284S.
- De la Presa, S., López, M. C., & Rivero, M. (1995). Shelf life prediction of an infant formula using an accelerated stability tests (rancimat). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *43*, 2879–2882.
- Diaz, M., Dunn, C. M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2003). Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *51*, 2365–2370.
- Din, J. N., Newby, D. E., & Flapan, A. D. (2004). Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment. *British Medical Journal*, *328*, 30–35.
- Fenaile, F., Visani, P., Fumeaux, R., Milo, C., & Guy, P. A. (2003). Comparison of mass spectrometry-based electronic nose and solid phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry technique to asses infant formula oxidation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *51*, 2790–2796.
- Frankel, E. N. (1982). Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research*, *22*, 1–33.
- Frankel, E. N. (1993). Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oils vs oxidized vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *70*, 767–772.
- Frankel, E. N., Satué-Gracia, T., Meyer, A. S., & German, J. B. (2002). Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *50*, 2094–2099.
- Hardas, N., Danviriyakul, S., Foley, J. L., Nawar, W. W., & Chinachoti, P. (2002). Effect of relative humidity on the oxidative and physical stability of encapsulated milk fat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *79*(2), 151–158.
- Jeffrey, B. G., Weisinger, H. S., Neuringer, M., & Mitchell, D. C. (2001). The role of docosahexaenoic acid in retinal function. *Lipids*, *36*(9), 859–871.
- Jensen, C. L., Maude, M., Anderson, R. E., & Heird, W. C. (2000). Effect of docosahexaenoic acid supplementation of lactating women on the fatty acid composition of breast milk and infant plasma phospholipids. *American Journal of Clinical Nutrition*, *71*, 292S–299S.
- Joint FAO/WHO (1989). London: Food Standard Program Recommended International Standards.
- Kulas, E., & Ackman, R. G. (2001). Different tocopherols and the relationship between two methods for determination of primary oxidation products in fish oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *49*, 1724–1729.
- Lapillonne, A., Picaud, J., Chirouze, V., Goudable, J., Reygrobellet, B., Claris, O., et al. (2000). The use of low-EPA fish oil for long-chain polyunsaturated of preterm infants. *Paediatric Respiratory*, *48*(6), 835–841.
- López-López, A., Castellote, A. I., & Lopez-Sabater, M. C. (2001). Comparison of two direct methods for the determination of fatty acids in human milk. *Chromatographia*, *54*, 743–747.
- Makrides, M., & Gibson, R. A. (2000). Long-chain polyunsaturated fatty acid requirements during pregnant and lactation. *American Journal of Clinical Nutrition*, *71*, 307S–311S.
- Marsili, R. T. (1999). Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the gas chromatographic–mass spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *Journal of Chromatography Science*, *37*, 17–23.
- Meilgaard, M. D., Civille, C. V., & Carr, B. T. (2000). *Sensory evaluation techniques*. USA: CRC Press, Inc.
- Minda, H., Molnár, S., Burus, I., & Decsi, T. (2002). Effect of different types of feeding on fatty acid composition of erythrocyte membrane lipids in full-term infants. *Acta Paediatrica*, *91*, 874–881.
- Neuringer, M. (2000). Infant vision and retinal function in studies of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids: methods, results, and implications. *American Journal of Clinical Nutrition*, *71*, 256S–267S.
- Nuchi, C. D., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2001). Impact of Tween 20 hydroperoxides and iron on the oxidation of methyl linoleate and salmon oil dispersions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *49*, 4912–4916.
- Romeu-Nadal, M., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2004). A headspace gas chromatographic method for determining volatile compounds in infant formulas. *Journal of Chromatography A*, *1046*, 235–239.
- Rosell, J. B. (1989). Measurement of rancidity. In J. C. Allen & R. J. Hamilton (Eds.), *Rancidity in foods*. London: Elsevier Applied Science.
- Salem, N., Litman, B., Kim, H. Y., & Gawrisch, K. (2001). Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids*, *36*(9), 945–959.
- Satué-Gracia, M. T., Frankel, E. N., Rangavajhyala, N., & German, J. B. (2000). Lactoferrin in infant formulas: effect on oxidation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *48*, 4984–4990.

- Smit, E. N., Koopmann, M., Boersma, E. R., & Muskiet, F. A. J. (2000). Effect of supplementation of arachidonic acid (AA) or a combination of AA plus docosahexaenoic acid on breastmilk fatty acid composition. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 62(2), 335–340.
- Stapelfeldt, H., Nielsen, B. R., & Skibsted, L. H. (1997). Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. *International Dairy Journal*, 7, 331–339.
- Valero, E., Villamiel, M., Miralles, B., Sanz, J., & Martínez-Castro, I. (2001). Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. *Food Chemistry*, 72, 51–58.
- Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L. S., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2003). Solid-phase microextraction in the analysis of virgin olive oil volatile fraction: modifications induced by oxidation and suitable markers of oxidative status. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 6564–6571.

Publicación 8**CONVERSIÓN DEL ÁCIDO α -LINOLÉNICO EN LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA EN RATAS MACHO, HEMBRAS EMBARAZADAS Y HEMBRAS NO EMBARAZADAS**

M. Romeu-Nadal, C. Childs, G. C. Burdge, P. C. Calder

El ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) pueden ser aportados directamente por la dieta o pueden ser sintetizados en el organismo a partir de su precursor, el ácido α -linolénico (ALA). Recientemente se ha observado que la conversión del ALA a DHA no es un proceso directo ya que el EPA se transforma primero en el ácido graso C24:6n-3, el cual es transferido desde el retículo endoplasmático a los peroxisomas donde sufre un proceso denominado retroconversión. Además existe una competencia entre el ALA y el ácido C24:5n-3 por la Δ 6-desaturasa. Igualmente, el otro ácido graso esencial, el ácido linoleico (LA, C18:2n-6), es también sustrato de la Δ 6-desaturasa. De este modo, la síntesis de DHA a partir del ALA, podría verse afectada por esta competencia.

Diferentes estudios realizados en humanos observaron que las mujeres tenían una mayor capacidad de convertir el ALA a DHA comparado con los hombres.

Por otro lado, se ha observado que las mujeres embarazadas presentan una mayor capacidad de conversión de ALA a DHA comparado con aquellas mujeres no embarazadas debido que dicha conversión podría estar regulada por la acción de hormonas sexuales para cubrir las demandas del feto y neonato por estos ácidos grasos.

El objetivo de este estudio fue evaluar si existían diferencias en la conversión del ALA a EPA, a ácido docosapentaenoico (DPA) y a DHA entre ratas macho y hembras, entre hembras embarazadas y no embarazadas, y entre machos y embarazadas.

Para investigar dicha capacidad de conversión en las ratas Wistar se analizaron los porcentajes de ácidos grasos en las diferentes fracciones lipídicas del plasma: fosfatidilcolina (PC), triglicéridos (TAG), ácidos grasos no esterificados (NEFA) y ésteres de colesterol (CE); en las diferentes fracciones lipídicas del hígado: PC, fosfatidiletanolamina (PE), TAG, NEFA y CE; y en el tejido adiposo subcutáneo e intra-abdominal. Concretamente en machos, hembras no embarazadas y hembras embarazadas (n=6 por grupo) alimentados con una dieta sin DHA durante 20 días. A parte de los ácidos grasos, se determinó el porcentaje de peso ganado, la cantidad de dieta ingerida, el contenido calórico ingerido, el peso y porcentaje del hígado fresco y seco en todas las ratas. Así como el porcentaje de ácidos grasos en las crías de las ratas embarazadas.

La fracción lipídica total fue extraída del plasma o de los tejidos con cloroformo-metanol (2:1, v/v). A la muestra se le añadieron triheptadecanoína, fosfatidilcolina de diheptadecanoil, heneicosanoato, heptadecanoato de colesteril y fosfatidiletanolamina de diheptadecanoil como patrones internos. Las fracciones TAG, PC, PE, NEFA y CE fueron separadas desde la fracción lipídica total por extracción en fase sólida usando

cartuchos de aminopropilsilica BondElut® según el método descrito por Burdge y col. (2000). Las fracciones lipídicas puras se metilaron por incubación a 50°C durante 2 horas con metanol conteniendo un 2% (v/v) de ácido sulfúrico. Los esteres metilados de los ácidos grasos se recuperaron por extracción con hexano y se determinaron por cromatografía de gases.

En relación al peso de las ratas, se observó que el porcentaje de peso ganado de las hembras vírgenes fue significativamente inferior que el de los machos desde el día 14 del estudio. Las hembras embarazadas presentaron un mayor incremento de peso al compararse con las hembras vírgenes durante todo el estudio, y desde el día 14 del estudio comparado con los machos.

El peso del hígado en los machos fue significativamente mayor que en las hembras vírgenes y embarazadas. El peso del hígado seco fue significativamente mayor en las hembras vírgenes comparado con los machos.

En relación a las diferencias debidas al sexo en la capacidad de conversión el ALA a sus precursores (DPA, EPA y DHA), los resultados mostraron que dicha capacidad era mayor en las hembras que en los machos, y la magnitud de esta diferencia fue específica por ciertas fracciones lipídicas.

Dado que todos los animales tuvieron la misma dieta y no hubieron diferencias entre los grupos en relación a la composición de ácidos grasos, y además la dieta ingerida fue menor en las hembras vírgenes que en los machos, una posible explicación por el hallazgo de que las concentraciones de DPA, EPA y DHA son mayores en las hembras vírgenes comparado con los machos, es la mayor capacidad de conversión del ALA a los AGPI-CLs n-3 en el sexo femenino que en el masculino.

Si nos fijamos en el estado de embarazo, los resultados del presente estudio muestran que la capacidad metabólica para convertir el ALA a DHA fue más elevada en las ratas embarazadas comparado con aquellas no embarazadas y con los machos. Además, la cantidad de ALA en el tejido adiposo (intra-abdominal y subcutáneo) fue inferior en las hembras vírgenes y en las embarazadas comparado con los machos, sugiriendo que dicho ácido graso podría ser utilizado para generar DHA.

En conclusión, la conversión de ALA a DHA en las hembras embarazadas es más elevada que aquella en las hembras vírgenes, y ésta más elevada que aquella conversión presente en los machos. De este modo, la suplementación de la dieta de las mujeres embarazadas con ALA podría ser una buena fuente de DHA para el feto, ya que las mujeres embarazadas tienen incrementada la conversión de ALA a DHA.

A continuación se muestra un proyecto del trabajo realizado en la Universidad de Southampton, UK, que dará lugar a la publicación “**Conversion of α -Linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in male, pregnant and virgin female rats**” con los autores Meritxell Romeu-Nadal, Caroline Childs, Graham C. Burdge, y Philip C. Calder.

Conversion of α -Linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in male, pregnant and virgin female rats

Meritxell Romeu-Nadal¹, Caroline Childs², Graham C. Burdge², Philip C. Calder²

¹*Dept. Nutrició i Bromatologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Avda. Joan XXIII, s/n, E-08028 Barcelona, Spain*

²*Institute of Human Nutrition, University of Southampton, Southampton, SO16 7PX, United Kingdom*

*Corresponding author: Dr

Institute of Human Nutrition,
University of Southampton,
Biomedical Sciences Building,
Bassett Crescent East,
Southampton, SO16 7PX, UK
Telephone
FAX
e-mail:

Short tittle: DPA, EPA and DHA in pregnant, virgin and male rats

Abstract

Background: Although endogenous DHA synthesis from dietary α -LNA is limited in humans, evidence suggests that this synthesis may increase during pregnancy. Dietary α -LNA may be an effective for increasing maternal and neonatal DHA status.

Objective: We evaluated whether there were differences in the capacity to form eicosapentaenoic acid (EPA), dososapentaenoic acid (DPA) and docosahexaenoic acid (DHA) from α -linolenic acid (α -LNA) between female rats in the non-pregnant state, female rats in the pregnant state and male rats.

Design: We investigated the capacity of conversion α -LNA to EPA, DPA and DHA on plasma PC, TAG, NEFA and CE, on liver PC, PE, TAG, NEFA and CE, and in intra-abdominal and subcutaneous adipose tissue in female rats in the non-pregnant state, female rats in the pregnant state and male rats for 20 d (n=6 per group). We measured the size, weight gain percentage, food intake, fresh and dry liver weight and liver percentage in all the rats, and the fatty acids in fetal plasma and liver.

Results: The results of the present study show the principal products of desaturation and elongation of α -LNA were EPA and DPA. The conversion of α -LNA to longer chain PUFA, particularly DHA, in rats appears to be limited. However, the capacity for synthesis of DHA from α -LNA was significantly greater in virgin females than in male rats in both plasma and liver. When comparing virgin with pregnant females, DHA percentage was greater in the pregnant females.

Conclusions: The results of the present study show that during pregnancy the DHA demand is increased and thus the synthesis from its precursor α -LNA is greater than in virgin females. Thus, because of the low reported intake of DHA, dietary α -LNA supplementation may be considered during pregnancy to increase DHA levels.

Key Words: α -Linolenic acid: Docosahexaenoic acid: Eicosapentaenoic acid: Pregnant: Rats

Abbreviations: α -LNA, α -linolenic acid; CE, cholesteryl esters; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; FAME, fatty acid methyl esters; NEFA, non-esterified fatty acid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; TAG, Triacylglycerol, VLC PUFA, very long chain polyunsaturated fatty acids.

Introduction

The very long chain n-3 polyunsaturated fatty acids (VLC n-3 PUFA) found in oily fish and fish oils, especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), have been demonstrated to exert favourable effects on human health (British Nutrition Foundation, 1992, 1999; Nettleton 1993). Intake of these fatty acids is typically low in Western populations. However, a pathway for conversion of α -linolenic acid (α -LNA) to EPA and DHA has been identified (reviewed in Sprecher, 2000). The potential of dietary α -LNA to exert the favourable health effects associated with its longer chain derivatives, EPA and DHA, will depend to a large extent on the rate and efficiency of its conversion to these longer chain, more unsaturated derivatives. Since western populations generally consume low levels of VLC n-3 PUFA, such as EPA and DHA, the ability to convert α -LNA to VLC n-3 PUFA may be an important mechanism for maintaining adequate EPA and DHA concentrations in cell membranes and thus ensuring optimal tissue function. Studies in experimental animals report that α -LNA intake has a direct relationship to erythrocyte, liver, and brain EPA levels, and α -LNA supplementation of the human diet increases blood, red cell and leukocyte EPA levels (see Burdge and Calder, 2005 for a review). Studies with stable-isotopes identified that women of child-bearing age (about 28 years) have a much greater capacity to convert α -LNA to EPA and DHA compared with men of a similar age (Burdge and Wootton, 2002; Burdge et al. 2002). The extent to which pregnant women are able to convert α -LNA to EPA and DHA is not known. DHA is conditionally essential in the perinatal period, in which the brain and retina are developing (Gibson and Makrides, 1999; Clandinin, 1999; Innis, 2003). Preterm, and possibly new-born infants, do not synthesize sufficient amounts of the VLC n-3 PUFA from their precursor α -LNA, to cover their needs (Chambaz et al. 1985; Carlson, 2000; Gibson and Makrides, 1998; Minda et al. 2002). The fetus is therefore dependent upon the effective supply of pre-formed DHA from the maternal circulation, either from the maternal diet, tissue reserves or synthesis from α -LNA. Although endogenous DHA synthesis from dietary α -LNA is limited in humans, evidence suggests that this synthesis may increase during pregnancy (Otto *et al.* 1999). Dietary α -LNA may be an effective for increasing maternal and neonatal DHA status. However, information on whether VLC n-3 PUFA synthesis is upregulated in

pregnancy in order to meet the increased demands for these fatty acids is not yet clear. Therefore, in the present study we have determined whether there are differences in the capacity to form EPA, DPA and DHA from α -LNA between female rats in the non-pregnant state, female rats in the pregnant state and male rats.

Materials and Methods

Materials

Fatty acids standards and all other reagents were obtained from Sigma (Poole, Dorset, UK). BondElut solid phase extraction cartridges were from Varian Limited (Walton-on-Thames, Surrey, UK).

Method for animal work

Female and male Wistar rats were fed standard laboratory maintenance chow for at least one week before mating. Mating occurred by monogamous breeding. Plug checks were undertaken every 24 hrs. Once mating was confirmed by the appearance of a vaginal plug (recorded as day 1 of gestation), females were housed alone and started on diet for the duration of their pregnancy (20 days). 6 virgin females and 6 males also received the same diet for 20 days. Dietary intake was monitored by weighing food intake. Fresh diet was provided every two to three days, to ensure that no food would become unpalatable due to oxidation or rancidity. The weights of all animals were monitored on a weekly basis. At day 20, the rats were culled.

Diet information

The animals received standard rat maintenance chow obtained from Special Diet Services (Witham, Essex, England). The diet contained 2.7% soyabean oil by weight. The fatty acid composition of the diet determined by analysing random samples taken from five pellets by gas chromatography is shown in Table 1. No DHA was included in the diet.

Weight gain and food intake

Dam weights were recorded at day 1 (day plug first observed), 7, 14 and 20 of gestation and weights of virgin females and males were recorded over the same time period. Weight gain was then converted into a % increase over initial weight to remove any variations due to differences in animal initial weight.

Fatty acid composition analysis

Blood samples were separated into plasma and erythrocytes by centrifugation. Plasma was collected and stored at -20°C prior to analyses. Livers and adipose tissues were snap frozen in liquid nitrogen after collection and stored at -80°C prior to analysis.

Total lipids were prepared from plasma (0.2 ml homogenised in 0.6 ml saline) or tissue (100 mg liver homogenised in 0.8 ml saline) by extraction with chloroform–methanol (2:1, v/v) (Folch et al. 1957) containing butylated hydroxytoluene (50 µg/ml). Triheptadecanoin, diheptadecanoyl phosphatidylcholine (PC), heneicosanoate, cholesteryl heptadecanoate and dihepatdecanoyl phosphatidylethanolamine (PE) were added to samples as internal standards as appropriate. Triacylglycerol (TAG), PC, PE, non-esterified fatty acid (NEFA) and cholesteryl esters (CE) were isolated from total lipid extracts by solid phase extraction using 100 mg aminopropylsilica BondElut cartridges (Varian, Walton-on-Thames, Surrey, UK) as described (Burdge et al. 2000). Purified lipid fractions were transmethylated by incubation with methanol containing 2% (v/v) sulphuric acid at 50°C for 2 hours (Burdge et al. 2000). Fatty acid methyl esters (FAME) were recovered by extraction with hexane. FAME were resolved by gas chromatography using an 6890 gas chromatograph (Agilent Technologies UK Limited, Stockport UK) equipped with a 30m x 0.25mm x 0.25µm BPX-70 fused silica capillary column (SGE Europe Limited, Milton Keynes, UK) and flame ionisation detection. FAME were identified by their retention times relative to standards (Sigma, Poole, Dorset, UK) and peak areas quantified using the Chemstation program (Agilent Technologies UK Limited). The concentrations of individual fatty acids were calculated relative to the peak area of the appropriate internal standard and expressed as the proportion of total fatty acids in each lipid fraction.

Statistical analysis

Data sets were analysed for normality, and significant differences between groups determined using One-way Anova with Bonferroni correction.

Results

Size and weight gain of rats

The absolute initial weight and percentage weight gain of rats are summarised in Table 2. Males weighed more when compared both to pregnant and virgin females. By converting weight gain into a percentage gain over the animal's initial weight, we were able to remove the variation due to differences in initial animal weight. There was little variation in percentage weight gain when comparing males and females, although the percentage weight gain of virgin females was significantly lower ($p < 0.05$) than males from day 14 of gestation. Pregnant females had a significantly increased growth rate compared to virgins at all time points, and compared to males from day 14 of gestation. When comparing pregnant females with virgin and male animals, pregnant animals differed from virgins at all time points, and differed from males from day 14 of gestation.

Food intake of rats

Table 3 shows the mean cumulative food intake per animal expressed in grams and MJ. Virgin females had a consistently lower dietary intake (in both g and MJ) when compared to males at all time points, and when compared to pregnant animals in the second week. Pregnant females had a consistently lower dietary intake (in both g and MJ) when compared to males in the first and third weeks.

Liver of control and linseed oil rats

The liver size, the proportion of body weight and the liver dry are summarised in Table 4. The liver size in the males was significantly greater than that in virgin females and pregnant. Liver dry weight was significantly greater in virgin compared to male animals. There were no significant differences in liver size as a percentage of body weight.

Percentages of fatty acids in liver and plasma PC

Percentages of fatty acids in plasma and liver PC are summarised in Table 5. Liver and plasma DHA, and liver EPA percentages in virgin females were significantly greater than that seen in males (61%, 73% and 65% higher content, respectively). There was no effect of sex upon DPA percentage. Pregnant animals had significantly

increased DHA percentages in liver (85% and approximately three-fold increase) and in plasma (89% and approximately four-fold increase) compared to virgin and male rats, respectively. DPA percentage in pregnant animals was significantly 23% higher compared to the level in male rats in liver PC, and 35% and 68% higher in plasma PC compared to virgin and male animals, respectively. The pregnant state did not significantly alter EPA percentages in plasma when compared with either virgin or male animals. However, a dramatic decrease in liver EPA of approximately four fold increase was shown in pregnant animals compared to virgin females. There was no effect of sex or pregnancy upon the total amount of PC recovered from plasma or liver.

Percentages of fatty acids in liver PE

Percentages of fatty acids in plasma and liver PE are summarised in Table 6. DHA and DPA percentages in virgin females was significantly greater than that seen in males, concretely it was an increase of 66% by DHA and 27% by DPA percentages. There was no effect of sex upon EPA percentage. EPA percentage in pregnant rats were significantly lower by four-fold decrease compared to virgin and male animals. On the contrary, DHA percentage significantly increased in pregnant animals compared to virgin (48% higher content) and male (approximately two-fold increase) rats. A decrease of DPA percentage in pregnant rats when comparing both with virgin (65% lower content) and male (30% lower content) animals was shown. There was no effect of sex or pregnancy upon the total amount of PE recovered from liver.

Percentages of fatty acids in liver and plasma TAG

Percentages of fatty acids in plasma and liver TAG are summarised in Table 7. Liver DHA percentages in virgin females were significantly lower by approximately two-fold decrease compared to male rats. There was no effect of sex upon EPA and DPA percentage. Pregnant animals had significantly increased plasma DHA percentages by three-fold increase when comparing with virgin females. Not differences were detected in liver DHA when comparing pregnant animals with virgin and male animals. The pregnancy state did not significantly alter either EPA or DPA percentages in plasma when comparing both virgin and male animals. However, liver EPA percentage in pregnant animals was significantly lower than that in male animals

(approximately two-fold decrease). There was no effect of sex or pregnancy upon the total amount of TAG recovered from plasma or liver.

Percentages of fatty acids in liver and plasma NEFA

Percentages of fatty acids in plasma and in liver NEFA are summarised in Table 8. Liver EPA percentages in virgin females was significantly greater than that seen in males (39% higher content). There was no effect of sex neither upon DPA nor DHA percentage. Pregnant animals had significantly increased plasma DHA percentages when comparing with males (approximately four-fold increase) and increased liver DHA percentages when comparing both with virgin (56%) and male (91%) animals. The pregnancy state did not significantly alter neither EPA nor DPA percentages in plasma when comparing both virgin and male animals. However, liver EPA percentage in pregnant animals significantly decreased by approximately three-fold decrease and two-fold decrease compared to virgin and male animals, respectively. Pregnancy significantly increased circulating plasma NEFA levels when comparing both virgin and male animals.

Percentages of fatty acids in liver and plasma CE

Percentages of fatty acids in liver and in plasma CE are summarised in Table 9 and 10, respectively. There was no effect of sex upon EPA, DPA and DHA percentage in plasma and in liver. Pregnant animals had significantly increased plasma and liver DHA percentages by approximately three-fold increase when comparing with virgin females, and four-fold and two-fold increase, respectively, when comparing with males. The pregnancy state did not significantly alter either EPA or DPA percentages in liver when comparing both virgin and male animals. However, plasma EPA percentage in pregnant animals was significantly lower than that in virgin females (approximately three-fold of decrease). There was no effect of sex or pregnancy upon the total amount of CE recovered from plasma or liver.

Percentages of fatty acids in adipose tissue

Percentages of fatty acids in intra-abdominal and in subcutaneous adipose tissue are summarised in Table 11. α -LNA percentages in intra-abdominal and in subcutaneous adipose tissue of male animals was significantly greater than that seen in virgin

females (30% and 65% higher content, respectively) and in pregnant females (39% and two-fold of increase, respectively).

Percentages of fatty acids in fetal liver and plasma

Percentages of fatty acids in fetal plasma PC, TAG and NEFA and in fetal liver PC, PE, TAG and NEFA are summarised in Table 12. DHA percentages in the liver PE fraction was greater compared to the other plasma and liver fractions. For EPA percentage, this was greater in the plasma TAG fraction.

Differences in longer-chain polyunsaturated fatty acids because of sex

The results of the present study show that the metabolic capacity for conversion of α -LNA to DPA, EPA and DHA was greater in virgin females compared to male animals, and the magnitude of this difference was specific to individual lipid classes. Comparison between the groups of virgin females and males animals showed, as expected, males animals had a consistently greater dietary intake (in both g and MJ) when compared to virgin females.

The present findings show that EPA percentage in liver PC and in liver NEFA, and DPA percentage in liver PE were significantly greater in virgin females compared to male animals. DHA percentage was also significantly greater in virgin females compared to males in the fractions PC and PE. The fatty acids in liver PC and PE are membrane phospholipids, suggesting a major necessity of EPA, DPA and DHA in the membrane for women compared to men.

Since all the animals had the same diet and so there were no differences between groups in fatty acid composition, and moreover the dietary intake was lower in virgin females compared to males, one possible explanation for the finding that the concentration of DPA, EPA and DHA is higher in virgin females compared to males is greater capacity for conversion of α -LNA to very long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in women than in men. Different studies in both women (Silfverstolpe et al. 1981; Ottosson et al., 1984; Burdge and Wootton, 2002; Pawlosky et al. 2003) and rats (Eden et al 1987) suggest that one possible explanation for the greater apparent synthesis of DHA in women compared with men may be up regulation of the conversion from DPA to DHA in women compared to men. In this process exists competition from α -LNA and for 24:5n-3 metabolism by Δ 6-desaturase to DHA

(Blank et al., 2002; Cleland et al., 2005). Moreover, DHA synthesis involves translocation of 24:6n-3 from the endoplasmatic reticulum to peroxisomes and removal of C₂ by β -oxidation.

The males possessed lower capacity to synthesis very long chain n-3 polyunsaturated fatty acids from α -LNA, suggesting that demands for these VLC PUFA by individual tissues in men are relatively modest, possibly due to efficient recycling, and can met by the diet or the low level of α -LNA conversion. Nevertheless, men with a poor DHA intake together with higher partitioning of fatty acids towards β -oxidation would be at greater risk of marginal DHA status than women (Burdge, review 2004). The nutritional demands for DHA in healthy adults are likely to be modest as they reflect principally the need to supply DHA to support turnover and resynthesis of cell membranes. In well-nourished men, metabolic demands for DHA may have been satisfied by existing pools of DHA within the body or by dietary supply of DHA (Burdge et al. 2002).

Differences in longer-chain polyunsaturated fatty acids because of pregnancy

The results of the present study show the metabolic capacity for conversion of α -LNA to DHA in the fractions PC, PE, CE and in the liver NEFA was greater in pregnant animals compared to virgin female and males. This conversion was also greater in pregnant in plasma TAG compared to virgin females, and greater in plasma NEFA compared to male animals.

One possible role for greater capacity for DHA synthesis in pregnant females may be the capacity to regulate α -LNA conversion by the action of sex hormones meeting the demands of the fetus and neonate for these fatty acids (Neuringer et al. 1984; Burdge et al. 1994; Burdge and Postle, 1994; Postle et al. 1995; Otto et al., 1997). This may occur by establishment of reserves of DHA in adipose tissue, which can be mobilised during gestation (Herrera, 2000; Al et al. 1997) and/ or by synthesis of DHA from its precursors during pregnancy. It is well known that an enhanced accumulation of fat depots is one of the characteristic features during pregnancy both in women (Hyttén and Leitch, 1971; Villar et al. 1992) and rats (López-Luna et al. 1986, 1991).

The results of the present study show the amount of α -LNA in the adipose tissue is reduced in virgin and pregnant females compared to males, suggesting that this can be used to generate more DHA for circulation in plasma.

The developing human fetus assimilates at least 400 mg DHA per week during the last trimester (Lauritzen et al., 2001). Since this estimate reflects only brain, adipose tissue and liver, the overall demands for DHA are likely to be substantially greater. The desaturase activities in human fetal appear less than in adults (de Gomez Dumm and Brenner, 1975), suggesting that assimilation of DHA by the fetus has to be met primarily by supply of pre-formed DHA by the mother. Since DHA status and synthesis appear to be up-regulated by oestrogen (Burdge and Wootton, 2002; Giltay et al. 2004b), the increase in plasma oestrogens that occurs during gestation may be an important determinant of maternal DHA status and, in turn, DHA supply to the fetus.

DHA percentage increase was accompanied by an increase of C16:0 hepatic PC and PE and plasma PC. In agreement with the results obtained by Burdge et al. (1994) in the late pregnancy rats there was a specific increase in liver PC and PE and plasma PC of molecular species containing C16:0 at the *sn*-1 position and DHA at the *sn*-2 position.

Pregnancy significantly increased circulating plasma NEFA compared to virgin females and male animals. This may be that the pregnant switches to a catabolic condition during the last third of gestation, adipose tissue lipolytic activity becomes enhanced, increasing the plasma levels of NEFA (Herrera, 2000).

During pregnancy, only TAG fraction accumulated AA compared to virgin females, whereas PC and PE fractions was depleted of AA. It was shown by Cunnane and Armstrong in rats. One possible reason for the temporal difference in the accumulation of AA in lipid fractions is that destination AA in TAG may be different from that of AA in phospholipid fractions; one may be largely restricted to the fetal compartment and the other to the maternal compartment or to specific fetal/neonatal lipid compartments. Because AA is the second most abundant LC-PUFA in neural tissue (Lauritzen et al. 2001), its accumulation in liver TAG may be important like a good fat depot.

The decreased of AA percentage in PC fraction in pregnant animals compared to virgin females was accompanied by a decrease in C18:0 percentage (Burdge et al. 1994).

In conclusion, the results of the present study show that during pregnancy the DHA demand is increased and thus the synthesis from its precursor α -LNA is greater than

in virgin females. Thus, because of the low reported intake of DHA, dietary α -LNA supplementation may be considered during pregnancy to increase DHA levels.

References

Al MD, van Houwelingen AC, Hornstra G. Relation between birth order and the maternal and neonatal docosahexaenoic acid status. *Eur J Clin Nutr.* 1997;51:548-53.

Blank C, Neuman MA, Makrides M, Gibson RA. Optimizing DHA Levels in Piglets by Lowering the linoleic Acid to α -Linolenic acid Acid Ratio. *J Lipid Res.* 2002; 43, 1537-1543.

BNF (British Nutrition Foundation). Unsaturated fatty acids: Nutritional and physiological significance. 1992. Ed. Chapman and Hall, London.

BNF (British Nutrition Foundation). n-3 Fatty Acids and Health. 1999. British Nutrition Foundation, London.

Burdge GC, Postle AD. Hepatic phospholipid molecular species in the guinea pig. Adaptations to pregnancy. *Lipids* 1994;29:259-64.

Burdge GC, Hunt AN, Postle AD. Mechanisms of hepatic phosphatidylcholine synthesis in adult rat: effects of pregnancy. *Biochem. J.* 1994;303:941-7.

Burdge GC, Wright P, Jones AE, Wootton SA. A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid phase extraction. *Br J Nutr.* 2000;84:781-7.

Burdge GC, Jones AE, Wootton SA. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of α -linolenic acid metabolism in young men. *Br J Nutr.* 2002;88:355-63.

Burdge GC, Wootton SA. Conversion of α -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr.* 2002;88: 411-20.

Burdge GC (2004). Review. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 7(2):137-144.

Burdge GC, Calder PC. α -Linolenic acid metabolism in adults humans: the effects of gender and age on conversion to longer-chain polyunsaturated fatty acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2005;107:426-39.

Carlson SE. Behavioral methods used in the study of long-chain polyunsaturated fatty acid nutrition in primate infants. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(suppl):268S-74S.

Chambaz J, Ravel D, Manier MC, Pepin D, Mulliez N, Bereziat G. Essential fatty acid interconversion in the human liver. *Biol Neonate.* 1985;47:136-40.

Clandinin MY. Brain development and assessing the supply of polyunsaturated fatty acids. *Lipids.* 1999;34:131-7.

Cleland LG, Gibson RA, Pedler J, James MJ. Paradoxical Effect of n-3-Containing Vegetable Oils on Long-Chain n-3 Fatty Acids in Rat Heart. *Lipids.* 2005;40(10):995-8.

Eden S, Oscarsson J, Jansson JO & Svanborg A (1987) The influence of gonadal steroids and the pituitary on the levels and composition of plasma phospholipids in the rat. *Metabolism.* 1987;36, 527–532.

Folch JL, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 1957; 226:497-509.

Gibson RA, Makrides M. The role of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) in neonatal nutrition. *Acta Paediatr.* 1998;87:1017-22.

Gibson RA, Makrides M. Polyunsaturated fatty acids and infant visual development: a critical appraisal of randomized clinical trials. *Lipids* 1999; 34: 179-84.

Giltay EJ, Gooren LJ, Toorians AW, Katan MB, Zock PL. Docosahexaenoic acid concentrations are higher in women than in men because of estrogenic effects. *Am J Clin Nutr.* 2004a;80:1167-1174.

De Gomez Dumm IN, Brenner RR. Oxidative desaturation of alpha-linolenic, linoleic, and stearic acids by human liver microsomes. *Lipids* 1975; 10:315-17.

Helland IB, Saugstad OD, Smith L, et al. Similar effects on infants of n-3 and n-6 fatty acids supplementation to pregnant and lactating women. *Pediatrics* 2001;108:e82.

Herrera E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr.* 2000;54 Suppl 1:S47-51.

Hytten FE, Leitch I. *The Physiology of Human Pregnancy.* Oxford; Blackwell Scientific, 1971.

Innis SM. Perineal Biochemistry and Physiology of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *J Pediatr*. 2003;143:S1-S8.

Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH, Michaelsen KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 2001;40:1–94.

López-Luna P, Muñoz T, Herrera E. Body fat in pregnant rats at mid- and late-gestation. *Life Sci*. 186;39:1389-93.

López-Luna P, Maier I, Herrera E. Carcass and tissue fat content in the pregnant rat. *Biol Neonate* 1991;60:29-38.

Minda H, Molnár S, Burus I., Decsi T. Effect of different types of feeding on fatty acid composition of erythrocyte membrane lipids in full-term infants. *Acta Paediatrica*. 2002;91:874-81.

Nettleton JA. Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development? *J Am Diet Assoc*. 1993;93(1):58-64. Review

Neuringer M, Connor WE, Van Petten, Barsrad L. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and visual loss in infant rhesus monkeys. *J Clin Invest*. 1984;73:272-76.

Otto SJ, van Houwelingen AC, Manninen A, Godfrey K, Lopez-Jaramillo P, Hornstra G. Maternal and neonatal essential fatty acid status in phospholipids: an international comparative study. *European Journal of Clinical Nutrition* 1997;51:232-42.

Otto SJ, van Houwelingen AC, Badart-Smook A, Hornstra G. The postpartum docosahexaenoic acid status of lactating and nonlactating mothers. *Lipids* 1999;34(suppl):S227.

Ottosson UB, Lagrelius A, Rosing U, Von Schoultz B. (1984). Relative fatty acid composition of lecithin during postmenopausal replacement therapy – a comparison between ethynyl estradiol and estradiol valerate. *Gynecology and Obstetric Investigation*. 18:296–302.

Pawlosky R, Hibbeln J, Lin Y, Salem N. n-3 fatty acid metabolism in women. *Br J Nutr*. 2003;90:993-4.

Postle AD, Al MDM, Burdge GC, Hornstra G. The composition of individual molecular species of plasma phosphatidylcholine in human pregnancy. *Early Hum Dev*. 1995;43:47-58.

Silfverstolpe G, Johnson P, Samsice G, Svanborg A, Gustafson A. Effects induced by two different estrogens on serum individual phospholipids and serum lecithin fatty acid composition. *Hormone and Metabolic Research*. 1981;13:141–145.

Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1486, 219-231.

Villar J, Cogswell M, Kestler E, Castillo P, Menendez R, Repke JT. Effect of fat and fat-free mass deposition during pregnancy on birth weight. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1992;167: 1344-52.

Table 1. Nutrient composition as per information provided by Special Diet Services for RM(1) diet.

Fatty acid percentage (Mean \pm Standard Deviation) determined by gas chromatographic analysis of total lipid extracts.

Energy content (KJ/g)		14.74
Nutrients (%)		
Ash	6.00	
Fibre	4.65	
Moisture	10.0	
Protein	14.4	
Carbohydrate	61.7	
Fat	2.71	
Fatty acid content		(% of total fat content)
14:0	0.16	± 0.23
16:0	18.98	± 1.13
16:1n-7	0.35	± 0.39
18:0	4.61	± 1.02
18:1n-9	13.98	± 1.42
18:2n-6	53.80	± 1.98
18:3n-3	5.93	± 0.54
20:0	0.46	± 0.55
20:1n-9	0.30	± 0.28
20:2n-6	0.38	± 0.65
20:4n-6	0.08	± 0.18
22:0	0.20	± 0.23
22:1n-9	0.12	± 0.17
20:5n-3	0.24	± 0.27
24:0	0.41	± 0.42

Table 2. Weight (g) and percentage weight gain of rats.

Rats	Initial Weight (g)	Percentage weight gain		
		7	14	20
Male	282.50 \pm 12.32	5.73 \pm 0.88	11.45 \pm 0.83	15.16 \pm 1.97
Virgin Female	214.17 \pm 18.35	2.82 \pm 3.64	6.72 \pm 3.67	6.92 \pm 1.72
Pregnant Female	208.67 \pm 20.30	9.22 \pm 1.20	19.85 \pm 3.02	30.73 \pm 7.49
ANOVA	0.000 ^{ab}	0.001 ^c	0.000 ^{abc}	0.000 ^{abc}

Significant differences between groups identified using one-way ANOVA (p values in table). Bonferroni correction used for multiple comparisons.

^a Significant difference between males and virgin females (p<0.05)

^b Significant difference between males and pregnant females (p<0.05)

^c Significant difference between virgin females and pregnant females (p<0.05)

Table 3. Food intake in g and in MJ of rats.

	Day 1-7		Day7-14		Day14-20	
	g	MJ	g	MJ	g	MJ
Male	130.30 ± 7.66	1.92 ± 0.11	156.27 ± 7.06	2.30 ± 0.11	135.82 ± 5.96	2.00 ± 0.09
Virgin Female	101.83 ± 5.98	1.50 ± 0.09	117.50 ± 8.92	1.73 ± 0.13	101.83 ± 8.59	1.50 ± 0.13
Pregnant Female	108.83 ± 8.75	1.60 ± 0.13	144.83 ± 16.80	2.14 ± 0.25	104.50 ± 20.83	1.54 ± 0.31
ANOVA	0.000 ^{ab}	0.000 ^{ab}	0.000 ^{ac}	0.000 ^{ac}	0.001 ^{ab}	0.001 ^{ab}

Significant differences between groups identified using one-way ANOVA (p values in table). Bonferroni correction used for multiple comparisons.

- ^a Significant difference between males and virgin females (p<0.05)
^b Significant difference between males and pregnant females (p<0.05)
^c Significant difference between virgin females and pregnant females (p<0.05)

Table 4. Liver of rats

	Weight (g)	% of body weight	Liver dry weight (mg/g liver)
Male	12.23 ± 0.90	3.78 ± 0.13	266.83 ± 23.64
Virgin Female	8.36 ± 0.66	3.65 ± 0.10	294.34 ± 9.50
Pregnant Female	9.82 ± 1.57	3.60 ± 0.35	284.44 ± 13.37
ANOVA	0.000 ^{ab}	0.409	0.035 ^a

Significant differences between groups identified using one-way ANOVA (p values in table). Bonferroni correction used for multiple comparisons.

- ^a Significant difference between males and virgin females (p<0.05)
^b Significant difference between males and pregnant females (p<0.05)
^c Significant difference between virgin females and pregnant females (p<0.05)

Table 5. Percentage of fatty acids detected in liver and plasma PC \pm 1 std.dev

PC Fatty acid	Liver				Plasma				
	Male (n=6)	Virgin Female (n=6)	Pregnant Female (n=6)	Anova	Male (n=6)	Virgin Female (n=6)	Pregnant Female (n=6)	Anova	
14:0	0.37 \pm 0.06	0.22 \pm 0.03	0.16 \pm 0.02	0.000 ^{ab}	0.30 \pm 0.04	0.19 \pm 0.11	0.24 \pm 0.08	0.157	
16:0	22.70 \pm 1.23	18.39 \pm 0.67	28.39 \pm 1.73	0.000 ^{abc}	24.45 \pm 0.94	20.71 \pm 1.23	27.38 \pm 1.58	0.000 ^{abc}	
18:0	19.53 \pm 0.93	28.62 \pm 1.45	20.25 \pm 1.42	0.000 ^{ac}	18.48 \pm 0.81	26.72 \pm 1.62	19.86 \pm 2.08	0.000 ^{ac}	
18:1n-9	4.20 \pm 0.37	3.30 \pm 0.48	3.63 \pm 0.73	0.037 ^a	4.83 \pm 0.50	4.27 \pm 0.90	4.60 \pm 0.84	0.474	
18:2n-6	16.47 \pm 0.59	12.40 \pm 1.22	10.55 \pm 0.91	0.000 ^{abc}	25.23 \pm 0.94	20.08 \pm 1.79	12.18 \pm 1.84	0.000 ^{abc}	
18:3n-6	0.23 \pm 0.06	0.35 \pm 0.08	0.38 \pm 0.04	0.002 ^{ab}	0.49 \pm 0.48	1.18 \pm 0.86	1.32 \pm 0.93	0.182	
18:3n-3	0.09 \pm 0.03	0.13 \pm 0.11	0.19 \pm 0.05	0.084	0.23 \pm 0.08	0.20 \pm 0.13	0.13 \pm 0.10	0.249	
20:4n-6	26.38 \pm 2.30	24.33 \pm 1.24	18.54 \pm 0.49	0.000 ^{bc}	18.67 \pm 2.00	16.14 \pm 1.51	11.99 \pm 1.37	0.000 ^{bc}	
20:5n-3	0.43 \pm 0.22	0.71 \pm 0.15	0.17 \pm 0.11	0.000 ^{ac}	0.25 \pm 0.18	1.06 \pm 0.85	0.88 \pm 0.86	0.151	
24:0	0.38 \pm 0.20	0.17 \pm 0.19	0.24 \pm 0.13	0.139	0.34 \pm 0.20	0.72 \pm 0.22	6.05 \pm 0.71	0.000 ^{bc}	
22:5n-3	1.11 \pm 0.17	1.34 \pm 0.08	1.37 \pm 0.21	0.026 ^b	0.76 \pm 0.07	0.95 \pm 0.11	1.28 \pm 0.34	0.002 ^{bc}	
22:6n-3	4.90 \pm 0.34	7.90 \pm 1.12	14.59 \pm 1.47	0.000 ^{abc}	3.01 \pm 0.27	5.22 \pm 1.02	12.00 \pm 1.73	0.000 ^{abc}	
Absolute amounts detected									
mg/g liver	15.28 \pm 0.77	14.19 \pm 1.78	13.82 \pm 1.09	0.157	ug/ml plasma	1018.86 \pm 244.86	1057.07 \pm 172.78	1034.07 \pm 353.76	0.970

Significant differences between groups identified using one-way ANOVA (p values in table). Bonferroni correction used for multiple comparisons.

- ^a Significant difference between males and virgin females (p<0.05)
^b Significant difference between males and pregnant females (p<0.05)
^c Significant difference between virgin females and pregnant females (p<0.05)

Table 6. Percentage of fatty acids detected in liver PE \pm 1 std.dev

PE Fatty acid	Liver			Anova
	Male (n=6)	Virgin Female (n=6)	Pregnant Female (n=6)	
14:0	0.05 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.000 ^{ab}
16:0	19.33 \pm 1.50	18.41 \pm 0.64	22.16 \pm 1.35	0.000 ^{bc}
18:0	21.52 \pm 1.17	26.77 \pm 0.59	27.18 \pm 1.43	0.000 ^{ab}
18:1n-9	3.16 \pm 0.52	2.17 \pm 0.38	1.89 \pm 0.40	0.001 ^{ab}
18:2n-6	9.62 \pm 1.13	6.40 \pm 0.95	3.60 \pm 0.38	0.000 ^{abc}
18:3n-6	0.15 \pm 0.03	0.21 \pm 0.08	0.07 \pm 0.13	0.070
18:3n-3	0.15 \pm 0.01	0.23 \pm 0.03	0.09 \pm 0.08	0.001 ^c
20:4n-6	31.14 \pm 0.79	25.80 \pm 0.68	19.79 \pm 0.68	0.000 ^{abc}
20:5n-3	0.47 \pm 0.14	0.49 \pm 0.09	0.12 \pm 0.08	0.000 ^{bc}
24:0	0.56 \pm 0.12	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.000 ^{ab}
22:5n-3	2.37 \pm 0.22	3.00 \pm 0.21	1.82 \pm 0.22	0.000 ^{abc}
22:6n-3	9.10 \pm 0.86	15.11 \pm 1.86	22.38 \pm 1.14	0.000 ^{abc}
Absolute amounts detected				
mg/g liver	4.43 \pm 1.51	5.57 \pm 1.54	5.13 \pm 0.87	0.392

Significant differences between groups identified using one-way ANOVA (p values in table). Bonferroni correction used for multiple comparisons.

- ^a Significant difference between males and virgin females (p<0.05)
^b Significant difference between males and pregnant females (p<0.05)
^c Significant difference between virgin females and pregnant females (p<0.05)

Table 7. Percentage of fatty acids detected in liver and plasma TAG \pm 1 std.dev

TAG	Liver				Plasma				
	Fatty acid	Male (n=6)	Virgin Female (n=6)	Pregnant Female (n=6)	Anova	Male (n=6)	Virgin Female (n=6)	Pregnant Female (n=6)	Anova
14:0	1.37 \pm 0.48	1.03 \pm 0.23	0.44 \pm 0.06	0.000 ^{bc}	0.83 \pm 0.20	0.77 \pm 0.27	0.34 \pm 0.19	0.003 ^{bc}	
16:0	31.41 \pm 6.18	31.75 \pm 3.86	25.25 \pm 1.05	0.030	26.55 \pm 4.22	26.70 \pm 2.76	22.74 \pm 2.85	0.100	
18:0	2.70 \pm 0.36	3.88 \pm 1.06	3.53 \pm 0.41	0.026 ^a	2.89 \pm 0.56	5.26 \pm 2.61	5.10 \pm 1.58	0.066	
18:1n-9	21.63 \pm 2.21	27.18 \pm 3.58	22.65 \pm 3.35	0.017 ^a	20.89 \pm 2.04	22.29 \pm 3.90	19.27 \pm 4.38	0.369	
18:2n-6	26.03 \pm 7.12	24.18 \pm 2.88	30.40 \pm 1.21	0.078	33.53 \pm 4.59	29.97 \pm 3.76	26.74 \pm 4.12	0.041 ^b	
18:3n-6	0.36 \pm 0.09	0.56 \pm 0.15	0.90 \pm 0.15	0.000 ^{bc}	0.54 \pm 0.26	1.03 \pm 0.64	4.00 \pm 3.72	0.031 ^b	
18:3n-3	1.61 \pm 0.37	1.51 \pm 0.29	1.61 \pm 0.22	0.815	2.64 \pm 0.28	2.24 \pm 0.38	1.35 \pm 0.40	0.000 ^{bc}	
20:4n-6	3.94 \pm 1.39	3.41 \pm 1.15	7.89 \pm 2.97	0.003 ^{bc}	3.32 \pm 1.21	3.85 \pm 1.10	8.34 \pm 2.56	0.000 ^{bc}	
20:5n-3	0.47 \pm 0.19	0.39 \pm 0.14	0.20 \pm 0.12	0.022 ^b	0.53 \pm 0.18	0.81 \pm 0.67	2.11 \pm 2.29	0.142	
24:0	0.47 \pm 0.21	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.000 ^{ab}	0.44 \pm 0.16	0.45 \pm 0.29	1.10 \pm 0.18	0.000 ^{bc}	
22:5n-3	1.06 \pm 0.41	0.66 \pm 0.20	1.48 \pm 0.73	0.038 ^c	0.80 \pm 0.32	0.67 \pm 0.33	1.20 \pm 0.51	0.083	
22:6n-3	1.69 \pm 0.70	0.74 \pm 0.13	1.53 \pm 0.66	0.023 ^a	1.57 \pm 0.57	1.05 \pm 0.56	3.14 \pm 1.90	0.022 ^c	
Absolute amounts detected mg/g liver					ug/ml plasma				
	2.67 \pm 0.38	1.78 \pm 0.57	2.45 \pm 0.86	0.071	1050.19 \pm 310.44	632.56 \pm 228.95	594.03 \pm 358.91	0.037	

Significant differences between groups identified using one-way ANOVA (p values in table). Bonferroni correction used for multiple comparisons.

^a Significant difference between males and virgin females (p<0.05)

^b Significant difference between males and pregnant females (p<0.05)

^c Significant difference between virgin females and pregnant females (p<0.05)

Table 8. Percentage of fatty acids detected in plasma and in liver NEFA \pm 1 std.dev

NEFA Fatty acid	Liver				Plasma			
	Male (n=6)	Virgin Female (n=6)	Pregnant Female (n=6)	Anova	Male (n=6)	Virgin Female (n=6)	Pregnant Female (n=6)	Anova
14:0	0.59 \pm 0.08	0.48 \pm 0.11	0.33 \pm 0.07	0.001 ^{bc}	0.82 \pm 0.24	1.38 \pm 0.34	1.19 \pm 0.74	0.208
16:0	25.83 \pm 2.85	25.05 \pm 1.91	26.31 \pm 2.03	0.642	25.52 \pm 1.84	27.47 \pm 3.14	25.22 \pm 1.93	0.256
18:0	22.74 \pm 1.50	19.51 \pm 1.94	16.89 \pm 1.58	0.000 ^{abc}	30.37 \pm 9.64	19.39 \pm 5.16	11.17 \pm 1.81	0.001 ^{ab}
18:1n-9	6.00 \pm 1.16	10.02 \pm 2.11	9.39 \pm 1.60	0.002 ^{ab}	12.27 \pm 3.21	15.85 \pm 2.74	19.24 \pm 1.13	0.001 ^b
18:2n-6	12.91 \pm 1.98	14.73 \pm 1.99	14.67 \pm 2.01	0.231	16.58 \pm 5.27	19.09 \pm 4.77	23.91 \pm 3.04	0.042 ^b
18:3n-6	0.13 \pm 0.10	0.45 \pm 0.12	0.49 \pm 0.18	0.001 ^{ab}	0.14 \pm 0.31	1.84 \pm 3.19	1.79 \pm 1.75	0.378
18:3n-3	0.50 \pm 0.10	0.92 \pm 0.19	0.79 \pm 0.11	0.000 ^{ab}	1.20 \pm 0.76	1.65 \pm 0.48	2.20 \pm 0.80	0.087
20:4n-6	20.38 \pm 1.46	16.67 \pm 2.03	15.23 \pm 1.05	0.000 ^{ab}	5.59 \pm 1.07	5.39 \pm 1.12	3.65 \pm 1.26	0.024 ^b
20:5n-3	0.41 \pm 0.07	0.57 \pm 0.10	0.17 \pm 0.09	0.000 ^{abc}	0.15 \pm 0.25	1.20 \pm 1.85	1.74 \pm 1.82	0.269
24:0	0.46 \pm 0.11	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.000 ^{ab}	0.00 \pm 0.00	0.12 \pm 0.10	0.68 \pm 0.36	0.000 ^{bc}
22:5n-3	1.46 \pm 0.24	1.68 \pm 0.30	1.56 \pm 0.44	0.561	0.41 \pm 0.13	0.36 \pm 0.13	0.94 \pm 0.92	0.184
22:6n-3	5.75 \pm 0.62	7.01 \pm 1.01	10.96 \pm 1.54	0.000 ^{bc}	0.88 \pm 0.27	1.77 \pm 0.74	3.60 \pm 2.64	0.043 ^b
Absolute amounts detected mg/g liver					ug/ml plasma			
	1.18 \pm 0.21	1.76 \pm 0.75	1.49 \pm 0.36	0.165	139.76 \pm 91.14	176.28 \pm 73.22	336.99 \pm 87.11	0.003 ^{bc}

Significant differences between groups identified using one-way ANOVA (p values in table). Bonferroni correction used for multiple comparisons.

- ^a Significant difference between males and virgin females (p<0.05)
^b Significant difference between males and pregnant females (p<0.05)
^c Significant difference between virgin females and pregnant females (p<0.05)

Table 9. Percentage of fatty acids detected in liver CE \pm 1 std.dev

Fatty acid	Anova	Male (n=6)	Virgin Female (n=6)	Pregnant Female (n=6)
14:0	0.238	0.50 \pm 0.34	0.61 \pm 0.20	0.35 \pm 0.18
16:0	0.001 ^{a,b}	34.89 \pm 4.25	43.69 \pm 3.16	42.95 \pm 3.38
16:1n-7	0.939	1.90 \pm 0.59	2.04 \pm 0.72	1.96 \pm 0.72
18:0	0.007 ^{b,c}	22.14 \pm 3.61	21.07 \pm 3.48	15.54 \pm 2.61
18:1n-9	0.430	8.29 \pm 0.94	7.47 \pm 1.98	9.06 \pm 2.83
18:2n-6	0.438	13.73 \pm 3.06	13.43 \pm 1.58	15.01 \pm 1.64
18:3n-6	0.226	0.12 \pm 0.09	0.37 \pm 0.28	0.35 \pm 0.35
18:3n-3	0.168	0.68 \pm 0.37	0.99 \pm 0.24	0.97 \pm 0.29
20:3n-6	0.122	0.33 \pm 0.17	0.21 \pm 0.17	0.12 \pm 0.15
20:4n-6	0.044	10.28 \pm 1.70	7.84 \pm 1.23	9.64 \pm 1.73
20:5n-3	0.677	0.37 \pm 0.20	0.22 \pm 0.18	0.23 \pm 0.51
24:0	<0.001 ^{b,c}	ND	ND	0.40 \pm 0.08
22:5n-3	0.066	0.50 \pm 0.25	0.20 \pm 0.16	0.22 \pm 0.25
22:6n-3	<0.001 ^{b,c}	0.80 \pm 0.44	0.66 \pm 0.40	1.88 \pm 0.39
Total (mg/g liver)	0.027	2.01 \pm 0.59	1.35 \pm 0.39	1.34 \pm 0.27

Significant differences between groups identified using one-way ANOVA (p values in table). Bonferroni correction used for multiple comparisons.

- ^a Significant difference between males and virgin females (p<0.05)
^b Significant difference between males and pregnant females (p<0.05)
^c Significant difference between virgin females and pregnant females (p<0.05)

Tabel 10. Percentage of fatty acids detected in plasma CE \pm 1 std.dev

Fatty acid	Anova	Male (n=6)	Virgin Female (n=6)	Pregnant Female (n=6)
14:0	0.715	0.27 \pm 0.06	0.19 \pm 0.20	0.21 \pm 0.23
16:0	0.175	10.97 \pm 1.58	11.72 \pm 3.65	14.23 \pm 3.29
16:1n-7	0.012 ^b	0.64 \pm 0.16	1.23 \pm 0.56	1.39 \pm 0.35
18:0	0.003 ^b	1.62 \pm 0.54	3.02 \pm 1.51	5.23 \pm 2.10
18:1n-9	0.586	6.59 \pm 2.52	5.56 \pm 2.40	6.77 \pm 1.32
t18:1n-9	0.001 ^a	1.46 \pm 0.42	0.75 \pm 0.10	1.07 \pm 0.12
18:2n-6	<0.001 ^{a,b,c}	25.62 \pm 1.74	20.48 \pm 2.04	16.81 \pm 2.49 ^c
18:3n-6	0.009 ^b	0.54 \pm 0.18	0.74 \pm 0.14	0.89 \pm 0.19 ^b
18:3n-3	0.198	0.54 \pm 0.42	0.29 \pm 0.06	0.33 \pm 0.08
20:3n-6	0.923	0.36 \pm 0.10	0.25 \pm 0.20	0.31 \pm 0.75
20:4n-6	0.147	49.22 \pm 6.52	52.46 \pm 5.88	45.91 \pm 3.32
20:5n-3	0.006 ^c	0.72 \pm 0.38	1.25 \pm 0.44	0.44 \pm 0.27
24:0	<0.001 ^{b,c}	ND	ND	1.46 \pm 0.22
22:6n-3	<0.001 ^{b,c}	1.16 \pm 0.32	1.85 \pm 0.48	4.83 \pm 0.99
Total (UG/ML)	0.123	719.05 \pm 289.47	488.42 \pm 141.97	519.51 \pm 112.47

Significant differences between groups identified using one-way ANOVA (p values in table). Bonferroni correction used for multiple comparisons.

^a Significant difference between males and virgin females (p<0.05)

^b Significant difference between males and pregnant females (p<0.05)

^c Significant difference between virgin females and pregnant females (p<0.05)

Table 11. Percentage of fatty acids (mean \pm 1 standard deviation) detected in intra-abdominal and in subcutaneous adipose tissue

	Intra-abdominal				Subcutaneous			
	Male (n=6)	Virgin Female (n=6)	Pregnant Female (n=6)	Anova	Male (n=6)	Virgin Female (n=6)	Pregnant Female (n=6)	Anova
14:0	0.41 \pm 0.08	0.25 \pm 0.02	0.32 \pm 0.06	0.001 ^a	0.42 \pm 0.03	0.38 \pm 0.06	0.54 \pm 0.24	0.169
16:0	5.63 \pm 0.71	4.13 \pm 0.46	5.05 \pm 0.60	0.002 ^a	5.18 \pm 0.48	5.07 \pm 1.06	7.44 \pm 3.10	0.083
16:1n-7	5.11 \pm 1.00	3.01 \pm 0.31	3.91 \pm 0.94	0.002 ^a	4.11 \pm 0.52	3.26 \pm 0.52	4.71 \pm 1.38	0.044 ^c
18:0	0.52 \pm 0.04	0.46 \pm 0.06	0.51 \pm 0.08	0.209	0.55 \pm 0.07	0.62 \pm 0.12	0.95 \pm 0.49	0.073
18:1n-9	14.05 \pm 0.78	14.85 \pm 0.66	16.69 \pm 2.37	0.023 ^{b,c}	15.33 \pm 1.92	17.95 \pm 2.35	21.59 \pm 4.54	0.012 ^b
t18:1n-9	1.92 \pm 0.15	1.93 \pm 0.16	2.22 \pm 0.30	0.047	1.97 \pm 0.18	2.21 \pm 0.39	2.92 \pm 0.90	0.031 ^b
18:2n-6	56.30 \pm 3.60	59.43 \pm 1.34	56.52 \pm 4.24	0.218	58.23 \pm 1.20	57.11 \pm 2.89	45.06 \pm 11.02	0.006 ^{b,c}
18:3n-6	0.38 \pm 0.06	0.49 \pm 0.04	0.52 \pm 0.08	0.002 ^{a,b}	0.36 \pm 0.06	0.39 \pm 0.08	0.67 \pm 0.16	<0.001 ^{b,c}
18:3n-3	8.41 \pm 0.44	6.45 \pm 0.59	6.04 \pm 1.78	0.005 ^{a,b}	7.46 \pm 1.21	4.52 \pm 1.31	3.11 \pm 1.71	<0.001 ^{a,b}
20:2n-6	0.58 \pm 0.25	0.68 \pm 0.15	0.46 \pm 0.29	0.327	0.31 \pm 0.04	1.65 \pm 0.80	2.63 \pm 2.71	0.076
20:3n-6	0.37 \pm 0.05	0.55 \pm 0.05	0.53 \pm 0.13	0.003 ^{a,b}	0.30 \pm 0.05	0.46 \pm 0.06	0.79 \pm 0.26	<0.001 ^{b,c}
20:4n-6	2.72 \pm 0.60	3.45 \pm 0.67	3.25 \pm 0.82	0.211	2.69 \pm 0.58	2.98 \pm 0.71	5.04 \pm 2.01	0.012 ^{b,c}
20:5n-3	0.28 \pm 0.11	0.18 \pm 0.04	0.16 \pm 0.07	0.034 ^b	0.19 \pm 0.07	0.13 \pm 0.09	0.22 \pm 0.11	0.276
24:0	0.86 \pm 0.18	1.53 \pm 0.30	1.37 \pm 0.44	0.007 ^{a,b}	0.80 \pm 0.22	1.12 \pm 0.22	2.06 \pm 1.12	0.014 ^b
22:5n-3	0.90 \pm 0.32	1.01 \pm 0.13	0.87 \pm 0.19	0.589	0.80 \pm 0.34	0.74 \pm 0.37	0.90 \pm 0.47	0.786
22:6n-3	1.27 \pm 0.50	1.42 \pm 0.34	1.32 \pm 0.45	0.838	0.98 \pm 0.39	1.04 \pm 0.46	0.97 \pm 0.48	0.948

Significant differences between groups identified using one-way ANOVA (p values in table). Bonferroni correction used for multiple comparisons.

^a Significant difference between males and virgin females (p<0.05)

^b Significant difference between males and pregnant females (p<0.05)

^c Significant difference between virgin females and pregnant females (p<0.05)

Table 12. Percentage of fatty acids detected in fetal plasma and liver.

Fetal Plasma and Liver									
	PC		PE		TAG		NEFA		
	Liver	Plasma	Liver	Liver	Plasma	Liver	Plasma		
% Fatty acid									
14:0	1.18 ± 0.11	0.80 ± 0.14	0.15 ± 0.09	2.28 ± 0.29	0.79 ± 0.31	1.30 ± 0.15	1.61 ± 0.57		
16:0	31.62 ± 0.47	26.83 ± 0.89	17.46 ± 0.80	24.28 ± 1.20	24.89 ± 1.52	26.08 ± 0.58	24.84 ± 7.35		
18:0	12.23 ± 0.42	17.83 ± 1.14	20.97 ± 0.60	6.55 ± 1.11	10.28 ± 2.93	15.23 ± 3.38	23.67 ± 6.64		
18:1n-9	12.56 ± 1.05	10.27 ± 1.06	6.93 ± 0.32	28.97 ± 2.71	25.95 ± 1.69	15.13 ± 2.07	16.28 ± 7.28		
18:2n-6	12.59 ± 1.08	12.55 ± 1.16	4.33 ± 0.49	17.80 ± 2.66	14.47 ± 1.36	10.88 ± 3.19	10.57 ± 4.45		
18:3n-6	0.63 ± 0.16	1.13 ± 1.01	0.17 ± 0.04	1.00 ± 0.16	1.98 ± 0.66	0.50 ± 0.11	0.00 ± 0.00		
18:3n-3	0.34 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.10	1.11 ± 0.17	0.76 ± 0.27	0.55 ± 0.29	0.77 ± 0.23		
20:4n-6	14.46 ± 0.60	14.94 ± 1.63	25.40 ± 0.67	3.44 ± 0.57	4.49 ± 0.64	14.67 ± 1.46	4.58 ± 1.97		
20:5n-3	0.55 ± 0.11	1.00 ± 0.90	0.43 ± 0.11	0.33 ± 0.12	1.67 ± 1.12	0.42 ± 0.10	1.11 ± 1.67		
24:0	0.19 ± 0.31	1.75 ± 0.40	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.69 ± 0.89	0.00 ± 0.00	1.63 ± 2.03		
22:5n-3	0.54 ± 0.32	0.39 ± 0.08	0.78 ± 0.16	0.55 ± 0.16	0.58 ± 0.12	0.55 ± 0.11	0.47 ± 0.37		
22:6n-3	7.06 ± 0.35	6.83 ± 0.54	20.63 ± 0.98	6.71 ± 1.60	4.59 ± 0.45	9.95 ± 1.26	8.91 ± 2.59		
	Total mg/g liver	Total ug/ml plasma	Total mg/g liver	Total mg/g liver	Total ug/ml plasma	Total mg/g liver	Total ug/ml plasma		
	7.56 ± 0.58	640.20 ± 118.19	3.62 ± 0.20	4.09 ± 1.47	407.94 ± 63.79	1.32 ± 0.37	102.89 ± 17.44		

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Estudio de los niveles de vitaminas C y E y de los ácidos grasos de la leche humana conservada en la nevera (4°C), en el congelador (-20°C) y en el ultracongelador (-80°C).

El primer objetivo planteado fue adaptar las recomendaciones existentes para la conservación en frío de la leche humana utilizadas tanto en el ámbito familiar, en las unidades neonatales de los hospitales como en los bancos de leche en función de la estabilidad de las vitaminas C y E, así como de la estabilidad de los ácidos grasos de la leche.

Hasta el momento las recomendaciones para conservar la leche humana en las unidades neonatales y en casa puede variar entre: la nevera desde 24-48 horas (Biancuzzo, 1999) hasta 3-5 días (Lawrence y Lawrence, 1999) y hasta un máximo de 8 días (La Leche League International, 1998; HMBANA, 2006); y en el congelador a -18°C, desde los 3 hasta los 12 meses (Biancuzzo, 1999; Lawrence y Lawrence, 1999; La Leche League International, 1998; HMBANA, 2006). En los bancos se recomienda que la leche de las donantes se puede conservar a 4°C hasta un máximo de 24 horas según Baumer (2004) o bien hasta los 8 días según la HMBANA (2006); en el congelador a -20°C hasta los 3 meses (Baumer, 2006) o bien hasta los 12 meses (HMBANA, 2006); o en el ultracongelador a -70°C durante periodos de tiempo más largos (Baumer, 2004; HMBANA, 2006).

Asimismo, también existen otras recomendaciones para la conservación de la leche basadas en citas bibliográficas: en nevera (4-6°C) durante 48-72 horas (Ogundele, 2000, 2002, Igumbor y col. 2000; Lawrence, 2001) y en temperaturas de congelación entre -20°C y -70°C durante 15-90 días (Bitman y col. 1983; Lawrence, 2001; Buss y col. 2001; Ogundele, 2002). No obstante, estos estudios científicos y las recomendaciones anteriores se han basado principalmente en las propiedades microbiológicas e inmunológicas de dicha leche. A pesar de esto, la conservación de la leche puede causar una pérdida de nutrientes sensibles a la oxidación como son las vitaminas C y E, debido a que son sensibles a la luz, oxígeno y temperatura (Esteve y col. 1995; Miquel y col. 2004), y pérdidas de los AGPI-CLs debido a su elevado número de dobles enlaces.

Para determinar las vitaminas C y E en la leche humana se desarrollaron y validaron dos métodos directos, es decir con muy poca preparación de la muestra, por cromatografía líquida de alta eficacia que mejoraron la recuperación y la rapidez que mostraban otros métodos de análisis de vitamina C o E en leche humana.

Concretamente para la vitamina C se desarrollaron y validaron dos métodos directos de cromatografía líquida de alta eficacia, uno para la determinación del ácido ascórbico sólo y otro para la vitamina C total (ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico). Además el método para determinar el ácido ascórbico fue comparado con un método enzimático. Los límites de detección y cuantificación encontrados, así como la linealidad, la precisión y la recuperación demostraron la idoneidad de los dos métodos de HPLC. Igualmente, el método enzimático fue lineal y preciso, aunque no podía determinar la vitamina C total y proporcionó peores

resultados, ya que sólo podía detectar el 63% de ácido ascórbico detectado con el método de HPLC.

En referencia al método directo de la vitamina E, se determinó el α - y γ -tocoferol por cromatografía líquida de alta eficacia con detector UV/VIS utilizando una columna corta (de 5 cm frente a los 15 o 25 cm usuales) útil para la determinación rutinaria de un gran número de muestras, evitando la etapa de la saponificación, y acortando el tiempo de análisis. Este método directo (Método I) fue comparado con dos métodos que requieren saponificación; uno con detección UV/VIS, que determina el γ - y α -tocoferol (Método II), y el otro con detección de difusión de la luz (ELSD) que cuantificó sólo el α -tocoferol (Método III).

El Método I proporcionó mejores resultados que los Métodos II y III. Concretamente, el Método II detectó sólo el 76% y el 78% de los niveles de γ - y α -tocoferol, respectivamente, detectados con el nuevo método. Y para el Método III, se encontraron los mismos niveles de α -tocoferol que para el Método II. Esta diferencia entre el Método I y los Métodos II y III fue atribuida a la fase de saponificación, la cual podía haber incrementado las pérdidas de analito. Otro inconveniente del Método III era que sólo podía detectar el α -tocoferol, no el γ -tocoferol, ya que el ELSD es menos sensible que el detector UV/VIS y además en la leche humana el γ -tocoferol se encuentra en cantidades muy bajas. Además el Método I fue más rápido, más fácil y utilizaba menos cantidad de muestra que los Métodos II y III.

Al estudiar la conservación en frío de la leche humana en el refrigerador (4°C) durante 96 horas, y en el congelador (-20°C) y ultracongelador (-80°C) durante 12 meses, se observó que la vitamina C total en las muestras refrigeradas empezó a decrecer significativamente a las 6 horas de conservación, llegando a una pérdida del 63% después de las 96 horas. Estas pérdidas fueron menores en las muestras congeladas y ultracongeladas, llegando a un 24% y a un 12% de disminución a los 12 meses, respectivamente. No se apreciaron diferencias significativas en el contenido de vitamina C total entre las muestras frescas y las muestras congeladas (-20°C) hasta los 5 meses, o entre aquellas ultracongeladas (-80°C) hasta los 8 meses.

En relación a las concentraciones del α - y γ -tocoferol, éstas se mantuvieron sin cambios significativos en las muestras refrigeradas hasta las 24 horas, y en las congeladas o ultracongeladas hasta los 12 meses. Sin embargo, sus concentraciones empezaron a disminuir en las muestras refrigeradas durante más de 24 horas, alcanzando un 25% y un 30% de reducción para el α y γ -tocoferol, respectivamente, después de las 96 horas.

De este modo, en nuestro estudio se observó una disminución de la concentración de vitamina C total en la leche humana conservada a las temperaturas de refrigeración y congelación recomendadas por “La Leche League International” (1998), por Lawrence y Lawrence (1999) y por la HMBANA (2006). Además se observó una disminución de la concentración de vitamina E en la leche conservada en nevera durante más de 24 horas, contradiciendo del mismo modo las recomendaciones descritas por las citas anteriores.

La concentración media de vitamina C total en las muestras de leche fresca (35.10 ± 1.42 mg/L) concuerda con un estudio previo de Buss y col. (2001) ($23.3-80.4$ mg/L). El 18% de pérdida de dicha vitamina producida en la leche refrigerada durante 24 horas fue menor que la pérdida del 35% encontrada por Buss y col. (2001). Esta pérdida podría haberse producido por una conversión del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico, y este a ácido dicetogulónico (Aeschbacher y Brown, 1972; Naidu, 2003). Por otro lado, Buss y col. (2001) observaron que las pérdidas eran debidas a la actividad de la lactoperoxidasa, ya que adicionando un inhibidor de esta enzima, se producía cierta protección en las pérdidas de vitamina C.

Las concentraciones medias de α - y γ -tocoferol en las muestras de leche fresca fueron de 3.85 ± 0.16 mg/L y 0.37 ± 0.02 mg/L, respectivamente, siendo similares a las encontrados por Hoppu y col. (2005) ($3.7-4.8$ mg/L). Como en trabajos previos, el contenido de vitamina E en la leche humana fue bastante estable en diferentes condiciones de conservación hasta 1 semana y a temperaturas de congelación (-20°C o -70°C) durante periodos de tiempo más largos (Moffatt y col. 1987; Van Zoeren-Grobbe y col. 1993).

Debido a que la estabilidad de la vitamina C fue inferior a aquella de la vitamina E, la vitamina C podría constituir un indicador de la estabilidad de la leche humana. Del mismo modo, las vitaminas han estado ya propuestas como indicadores del estrés oxidativo en muestras biológicas (Lykkesfeldt y col. 1995).

También se observó que los niveles de AGPI-CLs no se afectaban con la conservación en frío de la leche. Esta estabilidad podría ser debida a la elevada capacidad antioxidante de la leche humana (Henderson y col. 1998; Buescher y McIllehan, 1992). Particularmente, los ácidos araquidónico y docosahexaenoico fueron detectados en la leche fresca en un 0.44% y 0.25% respectivamente, siendo similares a aquellos encontrados por Koletzko y col. (1988) (0.36 y 0.22%), Lepri y col. (1997) (0.42 y 0.21%) y Henderson y col. (1998) (0.52 y 0.21%) en un "pool" de leche humana.

En conclusión, el porcentaje de ácidos grasos no disminuyó a las temperaturas de refrigeración, congelación y ultracongelación recomendadas. Lo mismo se observó con el contenido de la vitamina E en la leche congelada o ultracongelada. Por el contrario, las pérdidas de vitamina C fueron considerables. Sin embargo, la conservación durante 3 horas en nevera, durante 5 meses en el congelador (-20°C) o durante 8 meses en el ultracongelador (-80°C) mantienen el contenido de vitamina C inicial. De este modo, se recomienda un cambio en las prácticas de conservación de la leche humana: refrigeración hasta las 3 horas como máximo, congelación hasta los 5 meses y ultracongelación hasta los 8 meses. En caso de requerirse la conservación durante periodos más prolongados se debería considerar la opción de suplementar la leche con vitamina C.

Además, en el estudio de la conservación en frío de la leche humana se propone la vitamina C como marcador de la estabilidad de la leche humana.

II. Estudio de los niveles de vitaminas C y E y de los ácidos grasos de la leche humana pasteurizada con un método lento (62.5°C, 30 min) o con un método rápido (100°C, 5 min).

Dentro del primer objetivo planteado también se estudió la estabilidad de las vitaminas C y E y de los ácidos grasos en muestras de leche pasteurizadas con un método lento (62.5°C, 30 minutos) o con un método rápido (100°C, 5 minutos).

En ausencia de un adecuado suplemento de leche materna, los recién nacidos tienen la posibilidad de ser alimentados con la leche de otras mujeres procedente de los bancos de leche, siendo una importante alternativa para los prematuros y los niños enfermos (Góes y col. 2002). La leche de las donantes debe ser pasteurizada antes de darse a los niños para evitar de este modo la transmisión de enfermedades infecciosas (Lawrence, 1989).

Actualmente, las pasteurizaciones más utilizadas en los bancos de leche humana se efectúan con un método lento a 62.5°C durante 30 minutos (conocida como Holder Pasteurization) o con un método rápido a 100°C durante 5 minutos según la Asociación de bancos de leche de Norte América (Resto y col. 2001; HMBANA, 2005), la Asociación de bancos de leche del Reino Unido (Royal College of Pediatrics and Child Health and United Kingdom Association for Milk Banking, 1999) y según los protocolos de otros bancos como los de Brasil.

Existen pocos y antiguos estudios en relación a los efectos producidos por la pasteurización sobre las vitaminas C y E.

Al estudiar los dos métodos más habituales de pasteurización de la leche humana en los bancos de leche por un proceso lento (62.5°C, 30min) y por un proceso rápido (100°C, 5min), se observó que los dos métodos disminuyeron significativamente la concentración de vitamina C total en un 12% y un 29%, respectivamente, comparado con las muestras no pasteurizadas. Estas pérdidas fueron mayores cuando se determinó únicamente el ácido ascórbico (26% y 41%, respectivamente). Lo mismo se observó en las concentraciones de los α - y γ -tocoferoles, las pérdidas producidas fueron entre el 13 y el 17% para el método lento, y entre el 32 y 34% para el rápido, respectivamente.

Nuestra observación que las vitaminas C y E son perdidas durante la pasteurización indica que los recién nacidos alimentados con la leche de las donantes reciben menos capacidad antioxidante debida a dichas vitaminas que aquellos alimentados directamente con la leche de sus madres.

La pérdida de vitamina C que se ha encontrado en este estudio está de acuerdo con un estudio previo de Jandal, 1996 realizado sobre leche de cabra pasteurizada con un método muy similar al lento.

Igualmente, observamos que los niveles de AGPI-CLs no se afectaban con la pasteurización, lo que concuerda con estudios previos (Lepri y col. 1997; Henderson y col. 1998; Fidler y col. 2001) e indica que los niños que toman leche humana pasteurizada no son privados de estos componentes cruciales. La estabilidad de los AGPI-CLs durante la pasteurización es probablemente debida a la actividad

antioxidante de la leche humana (Henderson y col. 1998; Buescher y McIllehan, 1992).

En conclusión, para limitar las pérdidas de vitamina C y E en la leche humana durante la pasteurización, recomendamos la pasteurización a 62.5°C durante 30 minutos en lugar de la pasteurización a 100°C durante 5 minutos. Además, proponemos la vitamina C como marcador de la estabilidad de la leche humana.

III. Estudio de los niveles de ácidos grasos, así como de los compuestos primarios de oxidación y de los compuestos volátiles producidos en fórmulas lácteas, con diferentes niveles de AGPI-CLs, almacenadas a temperatura ambiente (25°C) y en la estufa a 37°C a lo largo de un periodo de tiempo controlado.

El segundo objetivo planteado fue determinar la estabilidad oxidativa de fórmulas lácteas en polvo con diferentes niveles de AGPI-CLs y almacenadas a diferentes temperaturas (25°C y 37°C) por medio de la determinación de los hidroperóxidos, los compuestos volátiles (propanal, pentanal y hexanal), los niveles de DHA, AA y EPA, y por medio de realizar ensayos organolépticos.

Para determinar los compuestos volátiles se desarrolló y validó un método por cromatografía de gases de espacio en cabeza para la identificación y cuantificación de propanal, pentanal. El método fue lineal, preciso y sensible. El tiempo y temperatura de equilibrio, el tiempo de muestreo y la disolución de la muestra fueron optimizados para obtener la máxima recuperación de los compuestos volátiles y las mínimas interferencias posibles. Las condiciones óptimas fueron las siguientes: temperaturas de equilibrio de 60°C, tiempo de equilibrio de 15 minutos, tiempo de muestreo de 30 segundos y disolución de la muestra de 0.05 gramos de preparado con 3 ml de agua Milli-Q.

Se estudió la estabilidad oxidativa de unas fórmulas lácteas con diferentes niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, concretamente una fórmula no suplementada (NSF), una suplementada con 0.83% y 0.47% de n-3 y n-6 AGPI-CLs (SFA), y otra suplementada con 27.80% y 3.51% de AGPI-CLs n-3 y n-6 (SFB), respectivamente. Para realizar este estudio, la NSF se almacenó a 25°C y las fórmulas suplementadas se almacenaron a 25°C y a 37°C desde su producción hasta los 15 meses de almacenaje.

Los niveles de hidroperóxidos fueron estables para la NSF, y incrementaron muy lentamente para la SFA. En cambio, para la SFB el incremento observado fue mayor y más rápido, alcanzando su máximo a los 8 meses, tanto a 25°C como a 37°C (12.9 y 20.3 mequiv. O₂/Kg, respectivamente), y reduciéndose después.

Al inicio del estudio, los valores de hidroperóxidos de todas las fórmulas estaban dentro de los límites especificados por la Joint FAO/WHO, 1989 para aceites refinados (10 mequiv O₂/Kg). Estos valores de hidroperóxidos fueron más elevados cuanto mayores eran los niveles de AGPI-CLs de las fórmulas, y cuanto mayor era la temperatura de almacenamiento. En estudios previos ya se había visto que la temperatura de almacenaje era un punto clave en la estabilidad oxidativa de las leches en polvo (Cluskey y col. 1997, De la Presa y col. 1995, Stapelfeldt y col. 1997).

La cuantificación de propanal se utilizó como marcador específico de la oxidación de los ácidos grasos n-3, y el pentanal y el hexanal para los ácidos grasos n-6. Los niveles de pentanal y hexanal fueron estables durante 3 meses para la SFA almacenada a 37°C, durante 5 meses para la SFA almacenada a 25°C y durante 12 meses para la NSF a 25°C. Los niveles de pentanal y hexanal a los 15 meses fueron 8 y 13.2 veces más grandes que los valores presentes en el tercer mes de almacenaje para la NSF, 12.8 y 17.4 en la SFA a 25°C y 20.4 y 28.3 en la SFA a 37°C, respectivamente. La formación de propanal en la SFA incrementó muy lentamente a lo largo de los 15 meses. En relación a la SFB, los niveles de pentanal y hexanal también incrementaron, pero de forma mucho menos acentuada que para la SFA. En cambio, la concentración de propanal a los 15 meses fue 15.8 y 22.1 veces superior que a los 3 meses en la SFB a 25°C y a 37°C, respectivamente.

Al determinar el contenido de los ácidos grasos poliinsaturados, se observó que el contenido de DHA y AA en la SFA fue estable a lo largo de los 15 meses de almacenaje, tanto a 25°C como a 37°C. En cambio, en la SFB el contenido de DHA y EPA, especialmente DHA, disminuyó a partir de los 6 meses de almacenaje, tanto a 25°C como a 37°C.

Al realizar el ensayo sensorial dúo-trío los panelistas detectaron diferencias significativas entre las muestras suplementadas (SFA y SFB) a tiempo zero y aquellas almacenadas a 25°C durante 15 meses. En relación al ensayo por comparación de parejas, el "sabor a rancio" no se detectó hasta los 15 meses en las muestras suplementadas a 25°C.

De este modo, la estabilidad de las fórmulas estudiadas determinada en función del contenido en hidroperóxidos y en compuestos volátiles, así como en función del análisis sensorial, decrece en el orden de NSF > SFA a 25°C > SFA a 37°C >> SFB a 25°C > SFB a 37°C.

En conclusión, la vida útil de las fórmulas lácteas en polvo está inversamente relacionada con su contenido en AGPI-CLs, con la temperatura y con el tiempo de almacenaje. Serán menos estables aquellas fórmulas que contengan mayor cantidad de AGPI-CLs, o que estén almacenadas a mayores temperaturas o durante mayor tiempo.

IV. Estudio de los niveles de ácidos grasos, especialmente del ácido α -linolénico y de sus AGPI-CLs derivados en ratas Wistar, concretamente en machos, hembras no embarazadas y hembras embarazadas.

El tercer objetivo planteado fue determinar si existían diferencias en la conversión del ácido α -linolénico a ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) entre hombres y mujeres, y en el caso de las mujeres si habían diferencias entre el estado de embarazo y no embarazo.

El estudio se realizó sobre animales, concretamente sobre 3 grupos de ratas Wistar: machos, hembras vírgenes y hembras embarazadas.

Al comparar las ratas hembras vírgenes con los machos alimentados con la misma dieta se observó que la concentración de DHA era mayor en las hembras vírgenes, sugiriendo que existía una mayor capacidad de conversión del ALA al DHA

por parte de las hembras. Esto concuerda con estudios anteriores realizados en humanos, en los que se observó que las mujeres tenían una mayor capacidad de convertir el ALA a DHA comparado con los hombres (Burdge y Wootton, 2002; Burdge y col. 2002). Estos resultados también concuerdan con aquellos en que incrementos en la dieta de ALA en hombres, no se asociaron con un incremento de la concentración de DHA en plasma y/o en las membrana celulares (revisado por Gerster, 1998).

Diferentes estudios realizados tanto en mujeres (Silfverstolpe y col. 1981; Ottosson y col. 1984; Burdge y Wootton, 2002; Pawlosky y col. 2003) como en ratas (Eden y col. 1987) sugieren que una posible explicación para la mayor síntesis de DHA en mujeres comparado con hombres podría ser debido a una mayor regulación en la conversión del DPA a DHA en las mujeres. En este proceso, existe competencia entre el ALA y el C24:5n-3 por la $\Delta 6$ -desaturasa para la síntesis de DHA (Blank y col. 2002; Cleland y col. 2005). Además, la síntesis del DHA implica la translocación del C24:6n-3 desde el retículo endoplasmático hacia los peroxisomas donde se eliminan dos carbonos por β -oxidación.

Los hombres poseen una menor capacidad de sintetizar DHA desde el ALA que las mujeres, sugiriendo que su demanda por los AGPI-CLs n-3 por parte de los tejidos es modesta, y puede ser cubierta por la dieta o por la baja conversión a partir del ALA. A pesar de esto, los hombres con una baja ingesta de DHA tendrían un mayor riesgo de déficit de DHA que las mujeres (Burdge, revisión 2004).

Además en este estudio se observó que la capacidad metabólica para convertir el ALA a DHA era más elevada en las ratas embarazadas que en aquellas no embarazadas y que en los machos. Una posible explicación para la mayor capacidad de la síntesis de DHA a partir del ALA en las embarazadas podría ser que dicha conversión estuviese regulada por hormonas sexuales teniendo en cuenta las demandas de DHA por parte del feto y neonato (Neuringer et al. 1984; Burdge et al. 1994; Burdge and Postle, 1994; Postle et al. 1995; Otto et al., 1997). Esta mayor demanda de DHA por parte del feto se podría cubrir porque se establecen reservas de DHA en el tejido adiposo que podrían ser movilizadas durante la gestación (Herrera, 2000; Al y col. 1997) y/o por la síntesis de DHA a partir de sus precursores durante el embarazo. Es bien conocido que la acumulación de grasa es una de las características del embarazo tanto en mujeres (Hyttén y Leitch, 1971; Villar y col. 1992) como en ratas (Lopez-Luna y col. 1986, 1991). De este modo, en el estudio se observó una disminución del contenido de ALA en el tejido adiposo de las ratas hembras vírgenes y hembras embarazadas comparado con los machos, sugiriendo una posible utilización de este ALA para formar DHA.

El feto asimila al menos 400 mg de DHA por semana durante el último trimestre de embarazo (Lauritzen y col. 2001). El problema surge cuando en los prematuros, y posiblemente en los recién nacidos a término, la conversión de los ácidos grasos esenciales, LA (n-6) y ALA (n-3), a sus precursores, AA para la serie n-6 y, EPA y DHA para la serie n-3, es limitada, siendo no suficiente para cubrir sus necesidades (Chambaz y col. 1985; Gibson y Makrides, 1998; Carlson, 2001; Minda y col. 2002). Así el feto es dependiente de los niveles de DHA que le llegan a través de la circulación materna, ya sean procedentes de la dieta de la madre, de la reserva de los tejidos o de la síntesis a partir del ALA.

Desde que se conoce que los niveles de DHA y su síntesis están regulados por los estrógenos (Burdge y Wootton, 2002; Giltay y col. 2004b), el incremento de estrógenos que se produce durante la gestación podría ser un factor determinante de los niveles de DHA de la madre, y por tanto, de la suplementación de DHA al feto. También observamos que el incremento de DHA fue acompañado de un incremento de ácido palmítico (C16:0) en las fracciones hepáticas PC y PE. Estos resultados están de acuerdo con Burdge y col. (1994) que encontraron que en el último periodo de embarazo de las ratas se producía un incremento en las fracciones hepáticas PC y PE y en la fracción PC del plasma de especies moleculares que contenían el C16:0 en la posición *sn*-1 y DHA en la posición *sn*-2.

Durante el estado de embarazo también se produjo un incremento de la circulación de la fracción NEFA en plasma, lo que podría ser debido a que durante el último trimestre de embarazo se acelera la actividad lipolítica del tejido adiposo incrementándose los niveles en plasma de NEFA (Herrera, 2000).

Durante el embarazo, se observó un incremento del porcentaje de AA en la fracción TAG en comparación con las hembras vírgenes. Por el contrario, en las fracciones PC y PE se produjo una disminución de AA comparado con aquellas hembras vírgenes. Una posible explicación por las diferencias en la acumulación de AA en las fracciones lipídicas es que la destinación del AA en los TAG podría ser diferente que aquella del AA en la fracción de los fosfolípidos; uno se puede restringir en gran parte al compartimiento fetal y el otro al compartimiento maternal o a los compartimientos lipídicos específicos fetales/neonatales. Debido a que el AA es el segundo AGPI-CLs más abundante en el tejido neuronal (Lauritzen y col. 2001), su acumulación en la fracción hepática de TAG podría ser importante como un buen depósito de grasa.

En conclusión, la conversión de ALA a DHA es más elevada en hembras embarazadas que aquella en hembras vírgenes, y esta más elevada que aquella conversión presente en los machos. De este modo, la suplementación de la dieta de las mujeres embarazadas con ALA podría ser una buena fuente de DHA para el feto, ya que las mujeres embarazadas tienen incrementada la conversión de ALA a DHA.

9. CONCLUSIONES

A continuación se resumen las principales conclusiones derivadas del presente estudio:

1. Se ha puesto a punto un método de extracción de la fracción grasa de la leche humana. El nuevo método presenta los mismos resultados que un método convencional con las ventajas de ser más rápido y utilizar menos reactivos.
2. Se han desarrollado y validado dos métodos directos de HPLC: uno para la determinación y cuantificación de la vitamina C total (ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico) y otro para el ácido ascórbico en la leche humana. Los métodos presentan óptimos niveles de precisión, linealidad, exactitud y sensibilidad.
3. Se ha desarrollado y validado un método directo de HPLC para la determinación de la vitamina E (α - y γ -tocoferoles) en la leche humana. El método presenta óptimos niveles de precisión, linealidad, exactitud y sensibilidad.
4. De los dos métodos de pasteurización más utilizados en los bancos de leche humana, la pasteurización lenta a baja temperatura reduce las pérdidas de vitamina C y E frente a la pasteurización rápida a alta temperatura.
5. Tanto en el ámbito familiar, en las unidades neonatales de los hospitales como en los bancos de leche se recomiendan cambios en las pautas de conservación en frío de la leche humana, estableciendo como máximo la refrigeración a las 3 horas, la congelación (-20°C) a los 5 meses y la ultracongelación (-80°C) a los 8 meses. En caso de tener que conservar la leche durante periodos más prolongados se debería considerar la suplementación de vitamina C.
6. Se propone utilizar la vitamina C como un marcador muy sensible de la estabilidad de la leche humana.
7. La estabilidad de los AGPI-CLs de la leche humana observada tanto durante su pasteurización como durante su conservación en frío podría ser debida a la elevada capacidad antioxidante de la leche.
8. Se ha desarrollado y validado un método por cromatografía de gases de espacio en cabeza para la determinación de los siguientes compuestos volátiles en los preparados para lactantes: propanal, pentanal y hexanal. El método presenta óptimos niveles de precisión, linealidad, exactitud y sensibilidad.
9. La vida útil de los preparados lácteos, determinada en función del nivel de hidroperóxidos, de compuestos volátiles y de ácidos grasos poliinsaturados y en función de los ensayos organolépticos (dúo-trío y comparación por parejas), depende claramente de su contenido en ácidos grasos poliinsaturados, y del tiempo y temperatura de conservación.

10. La conversión del ácido α -linolénico a DHA en las ratas embarazadas es mayor que aquella en las hembras vírgenes, y ésta más elevada que aquella conversión presente en los machos. Además la cantidad de ácido α -linolénico en el tejido adiposo fue inferior en las hembras vírgenes y en las embarazadas comparado con los machos, sugiriendo que dicho ácido graso podría ser utilizado para generar DHA.
11. La suplementación de la dieta de las mujeres embarazadas con ácido α -linolénico podría ser una buena fuente de DHA para el feto, ya que las mujeres embarazadas tienen incrementada la conversión del ácido α -linolénico a DHA.

10. BIBLIOGRAFÍA

- AAP, Work Group on Breastfeeding. (1997). Lactancia materna y utilización de la leche humana. *Pediatrics* (ed. Esp) 44:442-447.
- Aeschbacher HU, Brown RG. (1972). Automated Vitamin C Analysis. *Clinical Chemistry*. 18:965-967.
- Aggett PI, Haschke F, Heine W, Hernell O, Koletzko B, Launiala K *et al.* (1991). Comment on the content and composition of lipids in infant formulas. ESPGAN Committee on Nutrition. *Acta Paediatr. Scand.* 80: 8–9 pp. 887–896.
- Aggett PJ. (2001) Fórmulas para la lactancia artificial. En: Tratado de nutrición pediátrica. Ed. R. Tojo. Barcelona. Doyma S.L.
- Agostoni C, Riva C, Bellú R, Trojan S, Luotti D, Giovannini M (1994). Effects of diet on the lipid and fatty acid status of full-term infants at 4 months. *J. Am. Coll. Nutr.* 13:658-664.
- Agostoni C, Trojan S, Bellú R, Riva E, Giovannini M (1995). Neurodevelopmental quotient of healthy term infants and feeding practice : the role of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pediatr. Res.* 38:262-266.
- Agostoni C, Trojan S, Bellú R, Riva E, Bruzzese MG, Giovannini M (1997). Developmental quotient at 24 months and fatty acid composition of diet in early infancy: a follow up study. *Arch. Dis. Child.* 76:421-424.
- Agostoni C *et al.* (2001) Long-chain polyunsaturated fatty acid concentrations in human hindmilk are constant throughout twelve months of lactation. In: D.S. Newburg, Editor, Bioactive components of human milk, International Society for Research on Human Milk and Lactation Interna, Kluwer Academic Publishers, New York.
- Agostoni C (2005). LC-PUFA content in human milk: Is it always optimal? *Acta Paediatrica*. 94:1532-1537.
- Ahmed L, Nazrul Islam SK, Khan MNI, Nahid SN (2004a) Vitamin C Content in Human Milk (Colostrum, Transitional and Mature) and Serum of a Sample of Bangladeshi Mothers. *Mal J Nutr.* 10(1):1-4.
- Ahmed L, Nazrul Islam SK, KhanMNI, Huque S, Ahsan M (2004b). Antioxidant Micronutrient Profile (Vitamin E, C, A, Copper, Zinc, Iron) of Colostrum: Association with Maternal Characteristics. *Journal of Tropical Pediatrics* 50(6):357-8.
- Aké M, Contento AM, Mandrou B, Blanchin MD, Fabre H (1998). Experimental and statistical approach for validating an HPLC assay for the determination of vitamin A in flour and milk powder for children. *Chromatographia*. 47:716-720.
- Al Senaidy AM (1996). Plasma alpha- and gamma-tocopherol have different pattern during normal human pregnancy. *Mol. Cell. Biochem.* 154:71-75.
- Al MD, Van Houwelingen AC, Hornstra G. (1997). Relation between birth order and the maternal and neonatal docosahexaenoic acid status. *Eur J Clin Nutr.* 51:548-53.
- Alaejos MS, Romero CD (1995). Selenium in human lactation. *Nutr. Rev.* 53, 159-166.
- Albalá-Hurtado S, Novella-Rodríguez S, Veciana-Nogués MT, Mariné-Font A (1997). Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* .778:243-246.
- Amate L, Ramirez M, Gil A (1999). Positional analysis of triglycerides and phospholipids rich in long-chain polyunsaturated fatty acids. *Lipids*. 34(8):865-871.
- Amate L, Gil A, Ramirez M (2001a). Feeding infant piglets formula with long-chain polyunsaturated fatty acids as triacylglycerols or phospholipids influences the distribution of these fatty acids in plasma lipoprotein fractions. *J. Nutr.* 131:1250-1255.
- Amate L, Gil A, Ramirez M (2001b). Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids from different sources affect fat and fatty acid excretions in rats. *J. Nutr.* 131: 3216-3221.
- American Academy of Pediatrics, Committee on Drugs (1994). The transfer of drugs and other chemicals into human milk. *Pediatrics*. 93:137-150.
- American Academy of Pediatrics, Committee on Mother's Milk (1943). Operation of mothers milk bureaus. *J. Pediatr.* 23:112-128.
- American Academy of Pediatrics (1976). *Pediatrics*. 57:278-285.
- American Academy of Pediatrics, Committee on Pediatric Aids Human milk, breastfeeding, and transmission of human immunodeficiency virus in the United States (1995). *Pediatrics*. 96:977-979.

- American Society of Nutritional Sciences. (1998). Life Sciences Research Office (LSRO) Report: assessment of nutrient requirements for infant formulas. *J Nutr.* 128:2059S-2078S.
- American Association of Blood Banks, Standards for blood banks and transfusion services, American Association of Blood Banks, Arlington (VA) (1997).
- Ancos B, González EV, Cano MP (2000). Ellagic Acid, Vitamin C, and Total Phenolic Contents and Radical Scavenging, Capacity Affected by Freezing and Frozen Storage in Raspberry Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 48:4565-4570.
- Andreson A, Arnold LD (1993). Use of donor breastmilk in the nutrition management of chronic renal failure: three case histories. *J. Hum Lact.* 9:263-264.
- AOAC International (2002). Official Methods of Analysis, 17th ed. Arlington, VA: AOAC International.
- Arnold LDW, Larson E (1993). Immunologic benefits of breast milk in relation to human milk banking. *Am J Infect. Control.* 21:235-242.
- Arnold LDW (1995). Use of donor human milk in the management of failure to thrive: case histories. *J Hum Lact.* 11:137-140.
- Arnold LDW (1999): Donor Milk Banking in Scandinavia. *J. Hum. Lact.* 15(1):55-59.
- Arnold LDW (2002). The Cost-effectiveness of Using Banked Donor Milk in the Neonatal Intensive Care Unit: Prevention of Necrotizing Enterocolitis. *J Hum Lact.* 18(2):172-177.
- Arya SP, Mahajan M, Jain P (2000). Non-spectrophotometric methods for the determination of vitamin C. Review. *Analytica Chimica Acta.* 417:1-14.
- Auestad N, Montalto MB, Hall RT, Fitzgerald KM, Wheeler RE, Connor WE *et al.* (1997) Visual acuity, erythrocyte fatty acid composition, and growth in term infants fed formulas with long chain polyunsaturated fatty acids for one year. *Pediatr Res.* 41:1-10.
- Auestad N, Halter R, Hall RT, *et al* (2001). Growth and development in term infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a double-masked, randomized, parallel, prospective, multivariate study. *Pediatrics.* 108:372-381
- Badrakhan CD, Petrat F, Holzhauser M, Fuchs A, Lomonosova EE, Groot H, Kirsch M (2004). The methanol method for the quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 58:207-218.
- Baillie RA, Takada R, Nakamura M, Clarke SD (1999). Coordinate induction of peroxysomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 60:351-356.
- Bakker EC, Ghys AJ, Kester AD, Vles JS, Dubas JS, Blanco CE, Horsntra G (2003). Long-chain polyunsaturated fatty acids at birth and cognitive function at 7 y of age. *Europ J Clin Nutr.* 57: 89-95.
- Ballabriga A, Carrascosa A (2001). Alimentación complementaria y periodo del destete. En: Nutrición en la infancia y adolescencia. 2.^a ed. Madrid: Ergón. p. 155-202.
- Barry-Lawrence P (1994). Breast milk. Best source of nutrition for term and preterm infants. *Pediatr. Clin. North Am.* 41:925-941.
- Baumer JH (2004). Guidelines for the establishment and operation of human milk banks in the UK. *Arch. Dis. Child. Ed. Pract.* 89:27-28.
- Baydas G, Karatas F, Gursu MF, *et al.* (2002). Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Arch Med Res.* 33:276-80.
- Benzie IFF (1996). Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Internat. J. Food Sci. Nutr.* 47, 233-261.
- Berger TM, Frei B, Rifai N, Avery ME, Suh J, Yoder BA y Coalson JJ (1998). Early high dose antioxidant vitamins do not prevent bronchopulmonary dysplasia in premature baboons exposed to prolonged hyperoxia: a pilot study. *Pediatr. Res.* 43, 719-726.
- Biancuzzo, M. (1999). Breastfeeding the newborn_clinical strategies for nurses. St Louis, Missouri: Mosby, Inc. 894-895.
- Birch EE, Hoffman DR, Uauy R, Birch DG, Prestidge C (1998). Visual acuity and the essentiality of docosahexaenoic acid and arachidonic acid in the diet of term infants. *Pediatr Res.* 44:201-209.
- Birch EE, Garfield S, Hoffman DR, Uauy R, Birch DG (2000). A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Dev Med Chil Neurol.* 42:174-181.
- Birch EE, Homan DR, Castaneda YS, Fawcett SL, Uauy RD (2002). A randomized controlled trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula in term infants after weaning at 6 wk of age. *Am J Clin Nutr.* 75:570-80.

- Bodner C, Godden D, Brown K, Little J, Ross S, Seaton A on behalf of Aberden WHEASE Study Group (1999). Antioxidant intake and adult-onset wheeze: a case-control study. *Eur Respir. J.* 13:22-30.
- Ball GFM (1988). Extraction of the fat-soluble vitamins. In: Fat-soluble Vitamin Assays in Food Analysis: A Comprehensive Review. London: Elsevier Applied Science, Chap 4.
- Bondía-Martínez E, López-Sabater MC, Castellote-Bargalló AI, Rodríguez-Palmero M, González-Corbella MJ, Rivero-Urgell M y col. (1998). Fatty acid composition of plasma and erythrocytes in term infants fed human milk and formulae with and without docosahexaenoic and arachidonic acids from egg yolk lecithin. *Ear Human Dev.* 53:109S-119S.
- Bowman BA, Russell RM (2003). *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 8ª edición. Washington, DC.
- Barness LA. (1987). History of infant feeding practices. *Am J. Clin Nutr.* 46:168-170.
- Baumer JH. (2004). Guidelines for the establishment and operation of human milk banks in the UK. *Arch. Dis. Child. Ed. Pract.* 89, 27-28.
- Bensinger TA, Zuck TF, Tolbert B, McLaughlin S, Peck CC, Knight M (1978). An enzymatic method for measurement of ascorbate-2-phosphate. *Biochem Med.* 19(1):118-26.
- Benzie IFF (1996). Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Internat. J. Food Sci. Nutr.* 47:233-261.
- Berger TM, Frei B, Rifai N, Avery ME, Suh J, Yoder BA y Coalson JJ (1998). Early high dose antioxidant vitamins do not prevent bronchopulmonary dysplasia in premature baboons exposed to prolonged hyperoxia: a pilot study. *Pediatr. Res.* 43, 719-726.
- Bitman J, Wood DL, Mehta NR, Hamosh P, Hamosh M. (1983). Lipolysis of triglycerides of human milk during storage at low temperatures: a note of caution. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2:521-524.
- Bjöksten B, Burman LG, De Chateau P, Fredrikzon B, Gothefors L, Hernell O (1980). Collecting and banking human milk: to heat or not to heat? *Br Med J.* 281:765-769.
- Black M. (2003). A comparison of the first and second edition of Bayley scales of infant development in a high risk urban sample. Recuperado el 04/04/05, de: www.sciencedirect.com
- Blank C, Neuman MA, Makrides M, Gibson RA. (2002). Optimizing DHA Levels in Piglets by Lowering the linoleic Acid to α -Linolenic acid Acid Ratio. *J Lipid Res.* 43:1537-1543.
- Boersma ER, Offringa PI, Muskiet FAJ, Chase WM (1991). Vitamin E, lipid fractions, and fatty acid composition of colostrum, transitional milk, and mature milk: an international comparative study. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:1179-1204.
- Bondía-Martínez E, López-Sabater MC, Castellote-Bargalló, Rodríguez-Palmero M, González-Corbella MJ, Rivero-Urgell M, Campoy-Folgozo C, Bayés-García R. (1998). Fatty acid composition of plasma and erythrocytes in term infants fed human milk and formulas with and without docosahexaenoic and arachidonic acids from egg yolk lecithin. *Early Hum. Dev.* 53:S109-S119.
- Boswell K, Koskelo EK, Carl L, Glaza S, Hensen DJ, Williams KD, Kyle D. (1996). Preclinical evaluation of single-cell oils that are highly enriched with arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *Food Chem. Toxicol.* 34:585-593.
- Brenner RR, Peluffo RO (1969). Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* 176:471-9.
- Brion LP, Bell EF, Raghuvver (2003). Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. The Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 4, Art. No: CD003665.
- Brown MF (1994). Modification of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer. *Chem. Phys. Lipids.* 73:159-180.
- Buescher SE, McIlhean SM (1992). Colostral antioxidants: separation and characterization of two activities in human colostrum, *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 14:47-56.
- Burdge GC, Postle AD. (1994). Hepatic phospholipid molecular species in the guinea pig. Adaptations to pregnancy. *Lipids.* 29:259-64.
- Burdge GC, Hunt AN, Postle AD. (1994). Mechanisms of hepatic phosphatidylcholine synthesis in adult rat: effects of pregnancy. *Biochem. J.* 303:941-947.
- Burdge GC, Wright P, Jones AE, Wootton SA. (2000). A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid phase extraction. *Br J Nutr.* 84:781-787.
- Burdge GC, Jones AE, Wootton SA. (2002) Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of α -linolenic acid metabolism in young men. *Br J Nutr.* 88:355-363.

- Burdge GC, Wootton SA. (2002) Conversion of α -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr.* 88:411-420.
- Burdge GC (2004). Review. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 7(2):137-144.
- Burr GO, Burr MM (1929). A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from diet. *J. Biol. Chem.* 82:345.
- Burton GW, Ingold K (1989). Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann. N.Y. Acad Sci.* 570:7-22.
- Bush RA, Malnoe A, Reme CE, Williams TP (1994). Dietary deficiency of n-3 fatty acids alters rhodopsin content and function in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35:91-100.
- Buss IH, McGill F, Darlow BA, Winterbourn CC (2001). Vitamin C is reduced in human milk after storage. *Acta Paediatr.* 90 (2001) 813-15.
- Cario WR (1990). The use of vitamin E in childhood. *Kinderarztl Prax* 58(10):511-7.
- Carlson S, Rhodes P, Ferguson M (1986). Docosahexaenoic acid status of preterm infants at birth and following feeding with human milk or formula. *Am J Clin Nutr* 44: 798-804.
- Carlson SE, Salem N Jr (1991). Essentiality of omega-3 fatty acids in growth and development of infants. En: Health effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids in seafoods. Simopoulos AP, Kifer RR, Barlow SM (eds) *World Rev Nutr Diet.* Basel, Karger 66:74-86.
- Carlson SE, Cooke RJ, Werkmann SH, Tolley EA (1992). First year growth of preterm infants fed standard compared to marine oil n-3 supplemented formulas. *Lipids.* 27:901-907.
- Carlson SE, Werkmann SH, Peeples JM, Cooke RJ, Tolley EA (1993a). Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. *Proc Natl Ac Sci USA.* 90:1073-7.
- Carlson SE, Werkmann SH, Rhodes PG, Tolley EA (1993b). Visual-acuity development in healthy preterm infants: effect of marine-oil-supplementation. *Am J Clin Nutr.* 58:35-42.
- Carlson SE, Ford AJ, Werkmann SH, Peeples JH, Koo WW (1996). Visual acuity and fatty acid status of term infants fed human milk and formulas with and without docosahexaenoate and arachidonate from egg yolk lecithin. *Pediatr Res.* 39: 882-8.
- Carlson SE, Neuringer M (1999). Polyunsaturated fatty acids status and neurodevelopment: a summary and critical analysis of the literature. *Lipids.* 34: 171-178.
- Carlson SE (2001). Docosahexaenoic acid and arachidonic acid in infant development. *Semin. Neonatol.* 6, 437-449.
- Carnielli CP, Wattimena JDL, Luijendijk IHT, Boerlage A, Dagenhart HJ, Sauer PJJ. (1996). The very-low-birth-weight premature infant is capable of synthesizing arachidonic and docosahexaenoic acid from linoleic and linolenic acid. *Pediatric Research.* 40:169-174.
- Carrié I, Clément M, de Javel D, Francès H, Bourre JM (2000a). Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice: effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *J Lipid Res.* 41:465-472.
- Carrié I, Guesnet P, Bourre JM, Francès H (2000b). Diets containing long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids affect behaviour differently during development than ageing in mice. *Brit J Nutr.* 83:439-447.
- Carrié I, Clément M, de Javel D, Francès H, Bourre JM (2000c). Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *J. Lipid Res.* 41:473-480.
- Centers for Disease Control and Prevention Recommendations for assisting in the prevention of perinatal transmission of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus and acquired immunodeficiency syndrome. (1985). *MMWR.* 34:721-732.
- Champoux M, Hibblen J, Shannon C, Majchrzak S, Supmi S, Salem N, Higley J (2002). Fatty acid formula supplementation and neuromotor development in Rhesus monkey neonates. *Pediatr Res.* 51: 273-281.
- Chapin HD (1923). The operation of breast milk dairy. *JAMA.* 81:200-202.
- Chappell JE, Francis T, Clandinin MT (1985). Vitamin A and E content of human milk at early stages of lactation. *Early Hum. Dev.* 11:157-167.
- Chappell JE, Francis T, Clandinin MT (1986). Simultaneous high performance liquid chromatography analysis of retinol ester and tocopherol isomers in human milk. *Nutr. Res.* 6:849-852.
- Chatterton RT, Hill PD, Aldag JC, Hodges KR, Belknap SM, Zinzman MJ (2000). Relation of plasma oxytocin and prolactin concentrations to milk production in mothers of preterm infants: influence of stress. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(10):3661-3668.

- Chen LH (1996). Plasma vitamins A and E and red blood cell fatty acid profile in newborns and their mothers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50:556-559.
- Chen RF (1967). Fluorescence of dansyl amino acids in organic solvents and protein solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* 120:609-620.
- Chirouze V, Lapillone A, Putet G, Salle BL (1994). Red blood cell fatty acid composition in low-birth-weight infants fed either human milk or formula during the first months of life. *Acta Paediatr.* 405:70-77.
- Chow C, editor (2000). Fatty acids in foods and their health implications. 2nd edition. New York: Marcel Dekker Inc.
- Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, Southwell-Keely PT, Duncan MW, Ames BN (1997). Gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(7):3217-3222.
- Chua S, Arulkumaran S, Lim I (1994). Influence of breastfeeding and nipple stimulation on postpartum uterine activity. *Br J Obstet Gynaecol.* 101:804-805.
- Clandinin MT, Chappell JE, Leong S, Swyer PR, Chance GW (1980). Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implication for fatty acid requirements. *Early Hum Dev.* 4:121-9.
- Clandinin MY (1999). Brain development and assessing the supply of polyunsaturated fatty acids. *Lipids.* 34:131-137.
- Clark RM, Hundrieser KH, Ross S, Brown PB. (1984). Effect of temperature and length of storage on serum-stimulated and serum-independent lipolytic activities in human milk. *J Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 3(4):567-570.
- Clarke SD, Jump DB (1994). Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Annu Rev Nutr.* 14: 83-98.
- Clarke SD (2000). Polyunsaturated fatty regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br J Nutr.* 83: S59-S66.
- Cleland LG, Gibson RA, Pedler J, James MJ. (2005). Paradoxical Effect of n-3-Containing Vegetable Oils on Long-Chain n-3 Fatty Acids in Rat Heart. *Lipids.* 40(10):995-998.
- Clement M y Bourre JM (1993). Alteration of brain and liver microsomal polyunsaturated fatty acids following dietary vitamin E deficiency. *Neurosci. Lett.* 164:163-168.
- Cluskey SMC, Connolly JF, Devery R, O'Brien B, Harrington D, Stanton C. (1997). Lipid and Cholesterol Oxidation in Whole Milk Powder during Processing and Storage. *Journal of Food Scienc.*, 62(2):331-337.
- Cochi SL, Fleming DW, Hightower AW (1986). Primary invasive Haemophilus influenzae type b disease: a population-based assessment of risk factors. *J Pediatr.* 108:887-896.
- Cockburn F (2003). Role of infant dietary long-chain polyunsaturated fatty acids, soluble vitamins, cholesterol and lecithin on psychomotor development. *Acta Paediatr Suppl.* 442:19-23.
- Colombo J (2001). Recent advances in infant cognition: implications for long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation studies. *Lipids.* 36:919-926.
- Colombo J, Kannass KN, Shaddy DJ, et al. (2004). Maternal DHA and the development of attention in infancy and toddlerhood. *Child Dev.* 75: 1254-1267.
- Commission of the European Communities (1991). Directive on infant formulae and follow on formulae. *Off. J. Eur. Commun.* L175, 35-49.
- Commission of the European Communities (1996). Amending directive on infant formulae and follow on formulae. *Off. J. Eur. Commun.* L049, 12-16.
- Commission of the European Communities (1999). Amending directive on infant formulae and follow on formulae. *Off. J. Eur. Commun.* L139, 29-31.
- Commission of the European Communities (2003). Amending directive on infant formulae and follow on formulae. *Off. J. Eur. Commun.* L041, 37-40.
- Connor, William E., et al (1996). Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. *Lipids.* 31:S183-S87.
- Couet C, Delarue J, Fitz P, Antoine JM, Lamisse F (1997). Effect of dietary fish oil on the body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int J Obes.* 21: 637-643.
- Covert RF, Barman N, Domanico RS (1995). Prior enteral nutrition with human milk protects against intestinal perforation in infants who develop necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res.* 37:305A.

- Craciunescu C, Albright C, Mar MH, Song J, Zeisel S (2003). Choline availability during embryonic development alters progenitor cell mitosis in developing mouse hippocampus. *J Nutr.* 133: 3614-3618.
- Crawford M, Ghebremeskel K, Phylactos A (1995). The biochemistry of unsaturated fatty acids and development of preterm infants. *Br J. Clin. Pract.* 49:3-6.
- Crawford M, Bloom M, Broadhurst CL (1999). Evidence of the unique function of docosahexaenoic acid during the evolution of the modern hominid brain. *Lipids.* 34: S39-S47.
- Crawford M (2000). Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants. *Am J Clin Nutr.* 71:275S-284S.
- Criswick M, Gladman G, Sinha S, Toner N, Davies J. (1990). Vitamin E supplementation and periventricular hemorrhage in the newborn. *Am J Clin. Nutr.* 53(1):370s-372s.
- Croset M, Brossard N, Polette A, Lagarde M (2000). Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem J.* 345:61-67.
- Cumming RG, Klineberg RJ (1993). Breastfeeding and other reproductive factors and the risk of hip fractures in elderly woman. *Int J Epidemiol.* 22:684-691.
- Cuthbertson WFJ (1999). Evolution of infant nutrition. *Br. J. Nutr.* 81:358-371.
- Da Costa RSS, Tavares de Carmo MG, Saunders C, de Jesús EFO, Lopes RT, Simabuco SM (2003). Characterization of iron, copper, and zinc levels in the colostrum of mothers of term and pre-term infants before and after pasteurization. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 54:111-117.
- De Gomez Dumm IN, Brenner RR. (1975). Oxidative desaturation of alpha-linolenic, linoleic, and stearic acids by human liver microsomes. *Lipids.* 10:315-17.
- De la Presa S, López MC, Rivero M. (1995). Shelf life prediction of an infant formula using an accelerated stability tests (rancimat). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 2879-2882.
- Decsi T, Kelemen B, Minda H, Burus I, Kohn G (2000). Effect of type of early infant feeding on fatty acid composition of plasma lipid classes in full term infants during the second 6 months of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 30:547-51.
- Decsi T, Koletzko B (1995). Growth, fatty acid composition of plasma lipid classes, and plasma retinol and alpha-tocopherol concentrations in full-term infants fed formula enriched with omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Acta Paediatr.* 84(7): 725-732.
- Deodhar L, Joshi S (1991). Microbiological study of breast milk with special reference to its storage in milk banks. *J Postgrad Med.* 37:14-16.
- DeLucchi C, Pita ML, Faus MJ, Periago JL, Gil A (1988). Influences of diet and postnatal age on the lipid composition of red blood cell membrane in newborn infants. *Ann Nutr Metab* 32:231-9.
- Desai ID, Martinez FE, Dos Santos JE, Dura de oliveira JE (1984). Transient lipoprotein deficiency at birth: a cause of low levels of vitamin E in the newborn. *Acta Vitaminol. Enzymol.* 6, 71-86.
- Devereux G, Seaton A. (2005). Diet as a risk factor for atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 115:1109-1117.
- Dewey KG, Heinig MJ, Nommsen LA (1993). Maternal weight-loss patterns during prolonged lactation. *Am J Clin Nutr.* 58:162-166.
- Dewey KG, Heinig MJ, Nommsen-Rivers LA (1995). Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants. *J Pediatr.* 126:696-702.
- Dhariwal KR, Washko PW, Levine M (1990). Determination of Dehydroascorbic Acid Using High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Electrochemical Detection. *Anal. Biochem.* 189:18-23.
- Dionisi F, Prodoliet J, Tagliaferri E (1995) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1505.
- Directiva 1991/321 de la Comisión de 14/05/1991 relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación.
- Directiva 1996/4/CE de la Comisión Europea, por la que se modifica la Directiva 91/321/CEE relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación.
- Directiva 1999/50/CE de la Comisión Europea de 25/05/1999 por la que se modifica la Directiva 91/321/CEE relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación
- Directiva 2003/14/CE de la Comisión Europea de 10/02/2003 por la que se modifica la Directiva 91/321/CEE relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación

- Doménech E, Díaz-Gómez NM (2001). Nutrición del recién nacido a término durante su estancia hospitalaria. En Tojo R, ed. Tratado de nutrición pediátrica. Ediciones Doyma SL, Barcelona. pp 359-375.
- Dotson KD, Jerrell JP, Picciano MF, Perkins EG (1992). High-performance liquid chromatography of human milk triacylglycerols and gas chromatography of component fatty acids. *Lipids*. 27, 933-939.
- Duncan B, Ey J, Holberg CJ. (1993) Exclusive breast-feeding for at least 4 months protects against otitis media. *Pediatrics*. 91:867-872.
- Dupuy P, Saurniere JF, Vis HL, Leclaire M, Lombardo D (1991). Change in bile SALT dependent lipase in human breast milk during extended lactation. *Lipids*. 26:134-138.
- Edmond J, Higa TA, Korsak RA et al (1996). The source of fatty acids in developing brain. *J Neurochem*. 66 (suppl 1): S94B.
- El-Mohandes A, et al (1993b). Bacterial contaminants of collected and frozen human milk used in an intensive care nursery. *Am J Infect Cont*. 21: 226-230.
- Emadi-Konjin P, Verjee Z, Levin AV, Adeli K (2005). Measurement of intracellular vitamin C levels in human lymphocytes by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC). *Clinical Biochemistry* 38:450-456.
- J. Erwin (1999). Mother's milk promoting breastfeeding in Texas.
- Eitenmiller R, Lee J, Marcel Dekker (Editors) (2004). Vitamin E-Food Chemistry, Composition, and Analysis, New York, NY.
- Emmett P, Rogers IS (1997). Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. *Early Hum Dev*. 49:S7-S28.
- ESPGAN Committee on Nutrition (1977). Guidelines on infant nutrition. I. Recommendations for the composition of an adapted formula. *Acta Paediatr Scand Suppl*. 262: 1-20.
- ESPGAN Committee on Nutrition (1982). Guidelines on infant nutrition. III. Recommendations for Infant Feeding. *Acta Paediatr Scand Suppl*. 302: 1-27.
- ESPGAN Committee on Nutrition (1991). Guidelines on infant nutrition. Committee report: Aggett PJ, Haschke F, Heine W, Hernell O, Koletzko B, Launiala K, Rey J, Rubino A, Schöch G, Senterre J, Tormo R. Comment on the content and composition of lipids in infant formulas. *Acta Paediatr Scand*. 80:887-896.
- M.J. Esteve, R. Farré, A. Frigola, J.C. López, J.M. Romera, M. Ramírez, A. Gil. (1995) Comparison of voltammetric and high performance liquid chromatographic methods for ascorbic acid determination in infant formulas. *Food Chem*. 52:99-102
- Esteve MJ, Farré R, Frigola A, García-Cantabella JM (1997). Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acids in blood plasma and serum by liquid chromatography. *J Chromatogr. B*. 688:345-349.
- Evans TJ, Ryley HC, Neale LM, Dodge JA, Lewarne VM. (1978) Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk. *Arch Dis Child*. 53:239-241.
- T.J. Evans *et al.* (1978) Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk, *Arch Dis Child* 53 pp. 239-241.
- FAO/WHO. (1976). Codex Alimentarius Commission. Recommended international standards for foods for infants and children. Rome, Italy.
- FAO/WHO. (1994). Report of a Joint Expert Consultation. Expert Committee. Fats and oils in Human Nutrition. *Food and Nutrition Paper*. No. 57, 49-55. FAO, Rome, Italy.
- Farkas T, Kitajka K, Fodor E, Csengeri I, Lahdes E, Yeo Y, Krasznai Z, Halver J (2000). Docosahexaenoic acid-containing phospholipid molecular species in brains of vertebrates. *PNAS* 97: 6362-6366.
- Farquharson J, Cockburn F, Patrick WA, Jamieson EC, Logan RW. (1992) Infant cerebral cortex phospholipid fatty-acid composition and diet. *Lancet*. 340: 810-813.
- Farquharson J, Jamieson EC, Abbasi KA, Patrick WJA, Logan RW, Cockburn F. (1995). Effect of diet on the fatty acid composition of the major phospholipids of infant cerebral cortex. *Arch Dis Child*. 72:198-203.
- Ferdinandusse S, Denis S, Mooijer PAW, Zhang Z, Reddy JK, Spector AA, et al (2001). Identification of the peroxisomal β -oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res*. 42:1987-1995.
- Feller SE, Gawrisch K, MacKerell AD. (2002). Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. *J. Am. Chem. Soc.* 124:318-326.

- File S, Zagrossi H, Viana M, Graeff G. (1996). Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology (Berl)* 111:491-494.
- Fennema OR (2000). *Química de los alimentos*. 2ª edición. Zaragoza, España.
- Fernholz E (1938) On the constitution of alpha-tocopherol. *J Am. Chem. Soc.* 60, 700-705.
- Fidler N, Sauerwald TU, Koletzko B, Demmelmair H (1998). Effects of human milk pasteurization and sterilization on available fat content and fatty acid composition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 27(3):317-22.
- Filder Natasa et al. (2000). Docosaehaenoic acid transfer into human milk after dietary supplementation: a randomized clinical trial. *J Lipid Res.* 41:1376-83.
- Fidler N, Sauerwald TU, Demmelmair H, Koletzko B. (2001) Demmelmair H, Koletzko B. Fat content and fatty acid composition of fresh, pasteurized, or sterilized human milk. *Adv Exp Med Biol.* 501:485-495.
- Fogarty A, Lewis DS, Weiss S, Britton J (2000). Dietary vitamin E, IgE concentrations and atopy. *Lancet.* 356:1573-1574.
- Folch JL, Lees M, Sloane-Stanley GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry.* 226:497-509.
- Fomon SJ. Protein. In: Fomon SJ, ed. *Infant Nutrition*. St Louis: Mosby; 1993. p.121-46.
- Fomon SJ, Ziegler EE. (1994). Vitamina D. En: Fomon SJ, editor. *Nutrición del lactante*. Madrid: Mosby-Doyma. p. 317-31.
- Fomon SJ (1995). *Nutrición del lactante*. Mosby-Doyma, Barcelona.
- Fomon SJ. (2001). Infant feeding in the 20th century: Formula and beikost. *J Nutr.* 131:409S-420S.
- Fontannaz P, Kilinç T, Heudi O (2006) HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chem.* 94:626-631.
- J.E. Ford, B.A. Law and V.M. Marshall *et al.* (1977). Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents, *J Pediatr.* 90: 29–35.
- Forysth JS (1998). Lipids and infant formulas. *Nutr. Res. Rev.* 11:255-278.
- Fraga CG, Tappel AL, Leibovitz BE, Kuypers F, Chiu D, Iacono JM, Kelley DS (1990). Lability of red blood cell membranes to lipid peroxidation: application to humans fed polyunsaturated lipids. *Lipids* 25:111-114.
- Frank AL, Taber LH, Glezen WP. (1982). Breast-feeding and respiratory virus infection. *Pediatrics.* 70:239-245.
- Fredrikzon B, Hernell O, Blackberg L. (1982). Lingual lipase: its role in lipid digestion in infants with low birthweight and/or pancreatic insufficiency. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 296:75-80.
- Freed LM, Neville MC, Hamosh P, Hamosh M (1986). Diurnal within-feed variations in lipase activity and triglyceride content of human milk. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 5:938-942.
- Freed LM, Berkow SE, Hamosh P, York CM, Mehta NR, Hamosh M (1989). Lipase in human milk: effect of gestational age and length of lactation on enzyme activity. *J. Am. Coll. Nutr.* 8:143-150.
- Friend BA, Shahani KM, Long CA, Vaughn LA. (1983). The effect of processing and storage on key enzymes, B vitamins, and lipids of mature human milk. I. Evaluation of fresh samples and effects of freezing and frozen storage. *Pediatr. Res.* 17(1):61-64.
- Friis H, Andersen HK (1982). Rate of inactivation of cytomegalovirus in raw banked milk during storage at -20 degrees C and pasteurisation. *Br Med J (Clin Res Ed).* 285:1604-1605.
- Fristma GA (1983): Vitamin E and autoxidation. *Am. J. Med. Tech.* 49:453-456.
- Fukusawa K, Ikebata W, Sohmi K (1993). Location, antioxidant and recycling dynamics of alpha-tocopherol in liposome membranes. *J Nutr Sci Vitaminol.* 39:9S-22S.
- Gawrisch K, Eldho N, Holte L. (2003). The structure of DHA in phospholipid membranes. *Lipids.* 38:445-452.
- George J, Woods M, Clayton DF. (1995). Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra fish. *Neuron.* 15:361-372.
- Geraghty SR et al. (2005). The Development of a Research Human Milk Bank. *J Hum Lact.* 21(1):59-66.
- Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K. (2002). Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 103:136-139.

- Gerstein HC. (1994). Cow's milk exposure and type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 17:13-19.
- Gerster H. (1998). Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int J Vitam Nutr Res*. 68(3):159-73.
- Giammarioli S, Lammardo AM, Sanzini B, Bellomonte G. (1997). Preliminary. Study on lipid oxidation in infant formulas during storage. *Riv. Sci. Aliment*. 2:80-88.
- Gibson RA, Makrides M. (1999). Polyunsaturated fatty acids and infant visual development: a critical appraisal of randomized clinical trials. *Lipids*. 34:179-84.
- Gil A, Suarez A, Ramirez-Tortosa C (1998). Role of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids on tissue and lipoprotein composition and susceptibility to peroxidation. *Recent Res Devel in Lipids Res*. 2:333-368.
- Giltay EJ, Gooren LJ, Toorians AW, Katan MB, Zock PL. (2004a). Docosahexaenoic acid concentrations are higher in women than in men because of estrogenic effects. *Am J Clin Nutr*. 80:1167-1174.
- E. Gimeno, A.I. Castellote, R.M. Lamuela-Raventós, M.C. de la Torre, M.C. López-Sabater (2000). Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 881:251-254.
- Giusto NM, Pasquare SJ, Salvador GA, Castagnet PI, Roque ME, Ilincheta de Boschero MG. (2000). Lipid metabolism in vertebrate retinal rod outer segments. *Prog Lipid Res*. 39:315-391.
- Góes HCA, Torres AG, Donangelo CM, Trugo NMF. (2002). Nutrient Composition of Banked Human Milk in Brazil and Influence of Processing on Zinc Distribution in Milk Fractions. *Nutrition*. 18:590-594.
- Goldblum RM, Dill CW, Albrecht TM, Alford ES, Garza C, Goldman AS. (1984). Rapid high-temperature treatment of human milk. *J. Pediatr*. 104:380-385.
- Golden J. (2001). A social history of wet nursing in America: from breast to bottle, Ohio State University Press, Columbus.
- Gomis DB, Fernandez MP, Gutierrez Alvarez MD (2000). Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 891:109-114.
- González-Corbella MJ, Tortras-Biosca M, Castellote-Bargalló AI, López-Sabater MC (1999). Retinol and α -tocopherol in infant formulas produced in the EEC. *Food Chem*. 66:221-226.
- Graham WD, Annette D. (1992). Determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in potatoes (*Solanum tuberosum*) and strawberries using ion exclusion chromatography *J Chromatogr*. 594:187-194.
- Grammatikos PV, Subbaiah TA, Miller WM. (1994). n3 and n6 fatty acid processing and growth effects in neoplastic and non-cancerous human mammary epithelial cell lines. *Br. J. Cancer*. 70:219-227.
- Gray RH, Campbell OM, Apelo R. (1990). Risk of ovulation during lactation. *Lancet*. 335:25-29.
- Griffiths G, Morse M. (2006). Clinical Applications of C₁₈ and C₂₀ Chain Length Polyunsaturated Fatty Acids and Their Biotechnological Production in Plants. Review. *JAACS*. 83(3):171-185.
- Grobden DZ, Schrijver J, Berg H, Berger HM. (1987). Human milk vitamin content after pasteurisation, storage or tube feeding. *Arch Dis Child*. 62:161-165.
- Grummer-Strawn LM, Mei Z. (2004). Does breastfeeding protect against pediatric overweight? Analysis of longitudinal data from the Centers for Disease Control and Prevention Pediatric Nutrition Surveillance System. *Pediatrics*. 113:81-86.
- Haga P, Lunde G (1978). Selenium And vitamin E in cord blood from preterm and full term infants. *Acta Paediatr. Scand*. 67:735-739.
- Haga P, EK J, Kran S (1982). Plasma tocopherol levels and vitamin E/ β -lipoprotein relationships during pregnancy and in cord blood. *Am. J. Clin. Nutr*. 36:1200-1204.
- Halken S, Host A, Hansen LG. (1992). Effect of an allergy prevention programme on incidence of atopic symptoms in infancy. *Ann Allergy*. 47:545-553.
- Hamosh M, Scanlon JW, Ganot D, Likel M, Scanlon KB, Hamosh P (1981). Fat digestion in the newborn: characterization of lipase in gastric aspirates and term infants. *J Clin Invest*. 67:838-846.

- Hamosh M (1995). Lipid metabolism in pediatric nutrition. *Pediatr. Clin. North Am.* 12, 839-859.
- Hamosh M, Ellis LA, Pollock DR, Henderson TR, Hamosh P (1996). Breastfeeding and the working mother: effect of time and temperature of short-term storage on proteolysis, lipolysis, and bacterial growth in milk. *Pediatrics.* 97(4): 492-498.
- Hamosh M, Henderson TR, Ellis LA, Mao JI, Hamosh P. (1997). Digestive enzyme in human milk: stability at suboptimal storage temperatures. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 24: 38-43.
- Hamosh M. (1998). Protective function of proteins and lipids in human milk. *Biol Neonate.* 74:163-176.
- Hanna N, Ahmed K, Anwar M, Petrova A, Hiatt M, Hegyi T. (2004) Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch Dis Child Neonatal Ed.* 89:F518-F520.
- Hanson LA, Carlson B, Ahlstedts S, Svanborg C y Kaijser B (1978): los factores e defensa inmunitaria de la leche de mujer. *Anales Nestlé.* 48, 40-68.
- Harzer G, Haug M, Dieterich I, Gentner PR, (1983). Changing patterns of human milk lipids in the course of the lactation and during the day. *Am. J. Clin. Nutr.* 37(4):612-621.
- Hayes KC, Pronczuk A, Lindsey S, Diersen-Schade (1991). Dietary saturated fatty acids (12:0, 14:0, 16:0) differ in their impact on plasma cholesterol and lipoproteins in nonhuman primates. *Am. J. Clin. Nutr.* 43:491-498.
- Helland IB, Saugstad OD, Smith L, Saarem K, Solvoll K, Ganes T *et al* (2001). Similar effects on infants of n-3 and n-6 fatty acids supplementation to pregnant and lactating women. *Pediatrics.* 108:E82-E91.
- Helland IB, Smith L, Saarem K. (2003). Maternal supplementation with very long-chain fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 y of age. *Pediatrics.* 111:e39-e44.
- T.R. Henderson, T.N. Fay and M. Hamosh (1998). Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. *J Pediatr.* 132: 876-878.
- Hernell O, Bläckberg L (1994). Human milk bile salt-stimulated lipase: functional and molecular aspects. *J. Pediatr.* 125:S56-S61.
- Herrera E. (2000). Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr.* 54 Suppl 1:S47-S51.
- Heudi O, Trisconi MJ, Blake CJ. (2004). Simultaneous quantification of Vitamins A, D₃ and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr. A.* 1022:115-123.
- Hewavitharana AK, Van Brakel AS (1998). A rapid saponification procedure for the simultaneous HPLC determination of the natural levels of vitamin A, E and β -carotene in milk. *Milchwissenschaft.* 53:11-15.
- Hijazi N, Abalkhail B, Seaton A. (2000). Diet and childhood asthma in a society in transition: a study in urban and rural Saudi Arabia. *Thorax.* 55:775-779.
- Hoffman DR, Uauy R. (1992). Essentiality of dietary omega 3 fatty acids for premature infants: plasma and red blood cell fatty acid composition. *Lipids.* 27:886-895
- Holditch-Davis D, Barlett TR, Blickman AL, Miles MS. (2003). Posttraumatic stress symptoms in mothers of premature infants. *JOGNN.* 32(2):161-171.
- Hoppu D, Rinnie M, Salo-Väänänen P, Lampi A-M, Piironen V, Isolauri E. (2005). Vitamin C in breast milk may reduce the risk of atopy in the infant. *Eur J Clin Nutr.* 59:123-128.
- Horby Jorgensen M, Holmer G, Lund P, Hernell O, Michaelsen KF. (1998). Effect of formula supplemented with docosahexaenoic acid and gamma-linolenic acid on fatty acid status and visual acuity in term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 26:412-421.
- Hornstra G. (2000). Essential Fatty Acids in Mothers and Their Neonates. *Am J clin Nutr.* 71:126S-129S.
- Hulbert AJ. 2003. Life, death and membrane bilayers. *J. Exp. Biol.* 206:2303-2311.
- Human Milk Banking Association of North America (HMBANA) general information Available at (<http://www.Hmbana.org/general-info.htm>)
- Human Milk Banking Association of North America. Guidelines for establishment and operation of a donor human milk bank. Sandwich, MA. HMBANA, 1996.
- Human Milk Banking Association of North America. (2000). In: Tully MR. Guidelines for establishment and operation of a donor human milk bank. 9th ed. Raleigh, NC. HMBANA.
- Hmbana.org. (homepage on the Internet). (2005). Human Milk Banking Association of North America (HMBANA). Online. Available: <http://www.hmbana.org>

- Human Milk Banking Association of North America. (2006). In: Jones F, Tully MR. Best Practice for Expressing, Storing and Handling Human Milk in Hospitals, Home and Child Care Setting. 2nd Edition.
- Hytten FE, Leitch I. (1971). The Physiology of Human Pregnancy. Oxford; Blackwell Scientific.
- Ide T, Kobayashi H, Ashakumary L, Rouyer IA, Takahashi Y, Aoyama T, Hashimoto T, Mizugaki M. (2000). Comparative effect of perilla and fish oils on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 1485: 23-35.
- Igarashi O. (1993). Nutritional Requirement and Oral Safety. En: M Mino, H Nakamura, At diplock, HJ kayden, eds. Vitam. E-Its Usefulness in Health and in Curing Diseases, Jpn. Sci. soc. Press and karger: Tokyo, Japan and Basel. pp. 131-142.
- Igumbor EO.; Mukura RD.; Makandirama, B.; Chihota, V. (2000). Storage of breast milk: effect of temperatura and storage duration on microbial growth. *Cent. Afr. Med.* 46, 247-251.
- Indyk HE. (1988). Simplified saponification procedure for the routine determination of total vitamin E in dairy products, foods and tissues by high-performance liquid chromatography. *Analyst*. 113:1217-1221.
- Innis SM, N. Auestad N, Siegman JS. (1996). Blood lipid docosahexaenoic and arachidonic acid in term gestation infants fed formulas with high docosahexaenoic acid, low eicosapentaenoic acid fish oil. *Lipids*. 31:617-625.
- Innis SM, Hansen JW. (1996). Plasma fatty acid responses, metabolic effects, and safety of microalgal and fungal oils rich in arachidonic and docosahexaenoic acids in healthy adults. *Am. J. Clin.Nutr.* 64:159-167.
- Innis SM. (2003). Perineal Biochemistry and Physiology of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *J Pediatr*. 143:S1-S8.
- Innis SM, Elias SL. (2003). Intakes of Essential n-6 and n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Among Pregnant Canadian Women. *Am J Clin Nutr*. 77:473-478.
- ISSFAL Board of Directors. (1994). Recommendations for essential fatty acid requirement for infant formulae. *ISSFAL Newsletter*. 1:4-5.
- Ikeda I, Cha JY, Yanagita T, Nakatani N, Oogami K, Imaizumi K, Yazawa K. (1998). Effect of dietary alpha linolenic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 62:675-680.
- Israel-Ballard, K., C. Chantry, K. Dewey, B. Lonnerdal, H. Sheppard, R. Donovan, J. Carlson, A. Sage, and B. Abrams. 2005. Viral, Nutritional, and Bacterial Safety of Flash-Heated and Pretoria-Pasteurized Breast Milk to Prevent Mother-to-Child Transmission of HIV in Resource-Poor Countries: A Pilot Study. *JAIDS*. 40(2):175-181.
- Istre GR, Conner JS, Broome CV. (1985). Risk factors for primary invasive Haemophilus influenzae disease: increased risk from day care attendance and school-aged household members. *J Pediatr*. 106:190-195.
- Jensen RG. (1995). *Handbook of milk composition*, Academic Press, San Diego.
- Jensen RG. (1995a) Introduction. In *Handbook of milk composition*, ed. RG Jensen. pp.1-3. California: Academic Press.
- Jensen RG. (1999). Lipids in Human Milk. *Lipids*. 34(12):1243-1271.
- Jensen CL, Maude M, Anderson RE, Heird WC. (2000). Effect of docosahexaenoic acid supplementation of lactating women on the fatty acid composition of breast milk lipids and maternal and infant plasma phospholipids. *Am J Clin Nutr*. 71:292S-299S
- Jensen CL, Heird WC. (2002). Lipids with an emphasis on long-chain polyunsaturated fatty acids. *Clin. Perinatol*. 29:261-281, vi.
- Jensen CL, Voigt RG, Prager TC, Zou YL, Fraley JK, Rozelle JC, et al. (2005). Effects of maternal docosahexaenoic acid intake on visual function and neurodevelopment in breastfed term infants. *Am J Clin Nutr*. 82:125-32.
- Jiang Q, Christen S, Shigenaga MK, Ames BN. (2001). Gamma-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am J Clin Nutr*. 74(6):714-722.
- Jiménez R (2001). Lactancia materna. En Tojo R, ed. *Tratado de nutrición pediátrica*. Barcelona ediciones Doyma SL. pp 377-386.
- Johnson L, Bower FW, Abbasi S, Herman N, Weston M, Sacks L, Porat R, Sthal G, Peckham G, Delivoria-Papadopoulos M. Quinn G, Schaffer G (1985). Relationship of prolonged pharmacologic serum level of vitamin E to incidence of sepsis and necrotizing enterocolitis in infants with 1,500 gram or less. *Pediatrics*. 75, 619-638.

- Joint FAO/WHO. (1989). Food Standard Program Recommended International Standards; London.
- Jones F. (2003). The history of North American donor milk banking: one hundred years of progress, *J Hum Lact.* 19:313–318.
- Jones K. (1928). The mothers milk bureau of Detroit. *Public Health Nurs.* 142-3.
- Jorgensen MH, Hernell O, Hughes EL, Michaelsen KF. (2001). Is there a relation between docosahexaenoic acid concentration in mothers' milk and visual development in term infants?. *J Pediatr Gastroenterol Nut.* 32:293–296.
- Jumpsen J, Lien E, Goh Y, Clandinin T. (1997). Small changes of dietary dietary (n-6) and (n-3) /fatty acid content ratio alter phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine fatty acid composition during development of neuronal and glial cells in rats. *J Nutr.* 127:724-731.
- Kall MA, Andersen C. (1999). Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *J Chromatogr. B* 730:101-111.
- Kappus H, Diplock AT (1992). Tolerance and toxicity of vitamin E: a toxicological position report. *Free Radic. Biol. Med* 13:55-57.
- Kaempf DE, Ogihara T, Miki M, Mino M (1994b). Vitamin E nutritional status in the neonate. Evaluation of x-tocopherol blood cells and buccal mucosal cells. *Pediatr. Res.* 36, A20.
- Kayden HJ, Traber MG (1989). Neuropathies in adults with or without fat malabsorption. *Ann. NY Acad. Sci.* 570:170-5.
- Kaufman AS, Kaufman NL. Kaufman Assessment Battery for Children. Circle Pines, MN: American Guidance Service; 1983.
- Kennedy KI, Visness CM. (1992). Contraceptive efficacy of lactational amenorrhoea. *Lancet.* 339:227-230.
- Kim HY, Akbar M, Lau A, Edsall L. (2000). Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid. *J Biol Chem.* 45:35215-35223.
- Kitajka K, Puskás L, Zvara A, Hackler L, Barceló-Coblijn G, Yeo Y, Farkas T. (2002). The role on n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *PNAS.* 99:2619-2624.
- Knight EM, Spurlock BG, Edwards CH, Jonson AA, Oyemade UJ, Cole OJ, West H, Mannig M, James H, Larrea H, Westney OE, Jones S, Westney LS (1994). Biochemical profile of African American women during three trimesters of pregnancy and at delivery. *J Nutr.* 124:943S-953S.
- Knoop U, Schutt-Gerowitt H, Matheis G. (1985). Bacterial growth in breast milk under various storage conditions (Bakterienwachstum bei unterschiedlicher Lagerung von Muttermilch). *Monatschr Kinderheilkd* 133:483-486.
- Koenig A, Diniz EMA, Barbosa SFC, Costa Vaz FA (2005). Immunologic Factors in Human Milk: The Effects of Gestational Age and Pasteurization. *J Hum Lact.* 21(4):439-443.
- Kohn G, Sawatzki G, Van Biervliet JP, Rosseneu M. (1990). Dietary influence on the time course of the essential fatty acid status of term infants after birth. Recent Advances in Infant Feeding. *Symposium Leidschendam.*
- Kohn G, Sawatzki G, Van Biervliet JP, Rosseneu M. (1994). Diet and the essential fatty acid status of term infants. *Acta Paediatr.* 402:60-74.
- Koletzko B, Mrotzek M, Eng B, Bremer HJ. (1988). Fatty acid composition of mature human milk in Germany. *Am J Clin Nutr.* 47:954-959.
- Koletzko B, Schmidt E, Bremer HJ, Haug M, Harzer G. (1989). Effect of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids on the essential fatty acid status of premature infants. *Eur J Pediatr.* 148: 669-675.
- Koletzko S, Sherman P, Corey M. (1989b). Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood. *Br Med J.* 298:1617-1618.
- Koletzko B, Thiel I, Abiodun PO. (1991). Fatty acid composition of mature human milk in Nigeria. *Z. Ernahrungswiss.* 30(4):289–297.
- Koletzko B, Braun M. (1991). Arachidonic acid and early human growth: Is there a relation? *Ann Nutr Metab.* 35:128-131.
- Koletzko B. (1992). Fats for brains. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46(1):S51–S62.
- Koletzko B, Thiel I, Abiodun PO. (1992). The fatty acid composition of human milk in Europe and Africa. *J. Pediatr.* 120(4)Pt. 2:62–70.

- B. Koletzko, S. Edenhofer, G. Lipowsky and D. Reinhardt. (1995). Effects of a low birthweight infant formula containing human milk levels of docosahexaenoic and arachidonic acids. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 21(2):200–208.
- Koletzko B, Rodriguez-Palmero, M (1999). Polyunsaturated fatty acid in human milk and their role in early infant development. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* 4(3):269-284.
- Koletzko B, Rodriguez-Palmero, M, Demmelmair H, Fidler N, Jensen R y Sauerwald T (2001): Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum. Devl.* 65:S3-S18.
- Koskelo EK, Boswell k, Carl L, Lanoue S, Kelly C, Kyle D (1997). High levels of dietary arachidonic acid triglyceride exhibit no subchronic toxicity in rats. *Lipids.* 32:397-405.
- Krinsky NI (2003). Human requirements for fat-soluble vitamins, and other things concerning these nutrients. *Molecular Aspects of Medicine.* 24:317-324.
- La Leche League International.(1998). Storing human milk. Brochure n° 4692. Schaumburg IL: La Leche League International.
- Labbock MH, Colie C. (1992). Puerperium and breast-feeding. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 4:818-825.
- LACTA. Proyecto LACTA. PRLACTA. (<http://www.prlacta.org/articulo.php?id=86>).
- Lagarde M, Bernoud N, Thiès F, Brossard N, Lemaitre-Delaunay D, Crocet M, Lecerf J. (2001). Lysophosphatidylcholine as a carrier of docosahexaenoic acid to target tissues. *World Rev Nutr Diet.* 88: 173-177.
- Lapillone A, Picaud JC, Chirouze V, Goudable J, Reygrobellet B, Claris O, Salle BL (2000). The use of low-EPA fish oil for long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of pre-term infants. *Pediatr. Res.* 48:835-841.
- Lapillone A, Carlson S. (2001). Polyunsaturated fatty acids and infant growth. *Lipids.* 36: 901-911.
- Lauritzen L, Hansen HS, Jurgensen MH, Michaelsen KF. (2001). The essentiality of long-chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res.* 40:1-94.
- Law M, Wijewardene K, Wald NJ (1990). Is routine vitamin E administration justified in very low-birthweight infants?. *Dev. Med. Child. Neurol.* 32:442-450.
- Lawrence RA. (1989). Breast-feeding: a guide for the medical profession. Pages 476–487. Mosby CV. St. Louis (MO).
- Lawrence, R. A.; Lawrence, R. M. (1999). Breastfeeding-a guide for the medical profession. 5th ed. St Louis, Missouri: Mosby Inc. 894-895.
- Lawrence RA. (1999). Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk, *Acta Paediatr Suppl.* 88:14–18.
- Lawrence RA. (2001). Milk banking: the influence of storage procedures and subsequent processing on immunological components of human milk. *Adv. Nutr. Res.* 10:389-404.
- Leger CL, Dumontier C, Fouret G, Boulot P, Descomps B (1998). A short-term supplementation of pregnant women before delivery does not improve significantly the vitamin E status of neonates-low efficiency of the vitamin E placental transfer. *Int J Vitam. Nutr. Res.* 68:293-9.
- Lee W, Roberts SM, Labre RF. (1997). Ascorbic acid determination with an automated enzymatic procedure. *Clinical Chemistry.* 43(1)154-157.
- Lee SK, Kader AA. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Technol.* 20:207-220.
- Lepri L, Del Bubba M, Maggini R, Paolo Donzelli G, Galvan P. (1997). Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. *J Chromatogr. B.* 704:1–10.
- Lester P, Stefan UW and Gerald R. (2001). Molecular Aspects of α -Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signalling, *J Nutr.* 131:369S-373S.
- Levin B, MacKay HM, Neill CA, Oberholzer VG, Whitehead Tp (1959). Weight gain, serum protein levels and health of breast fed and artificially fed infants. Medical research Council Special Report Series N°296.
- Levitt C (2001). Approaches to breastfeeding. The role of hospitals, professionals and governments in promoting breastfeeding. En: Preedy V, Grimble G y Watson D, Nutrition in the infant, problems and practical procedures. Grenenwich Medical Media LTD. Pp. 399-407.
- Li D, Saldeen T, Mehta JL. (1999). Gamma-tocopherol decreases ox-LDL-mediated activation of nuclear factor-kappaB and apoptosis in human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 259(1):157-161.

- M. Liebhaber *et al.* (1977). Alterations of lymphocytes and of antibody content of human milk after processing. *J Pediatr.* 91:897–900.
- Lim SY, Suzuki H. (1999). Intakes of dietary docosahexaenoic acid ethyl ester and egg phosphatidylcholine improve maze-learning ability in young and old mice. *J Nutr.* 130:1629–1632.
- Lindeman JHN, Van Zoeren-Grobbe D, Schrijver J, Speek Aj, Poorthuis y Berger HM (1989). The total free radical trapping ability of cord blood plasma in preterm and term babies. *Pediatr. Res.* 26:20-24.
- Liu TZ, Chim N, Kiser MD, Bigler WN. (1982). Specific spectrophotometry of ascorbic acid in serum or plasma by use of ascorbate oxidase. *Clinical Chemistry.* 28:2225-2228.
- Lönnerdal B. (1986). Effects of maternal dietary intake on human milk composition. *J Nutr.* 116:499-513.
- Litman BJ, Mitchell DC. (1996). A role for phospholipids polyunsaturation in modulating membrane protein function. *Lipids.* 31:193-197.
- López-López A, López-Sabater MC, Campoy-Folgozo C, Rivero-Urgell, Castellote-Bargalló AI. 2002. Fatty acid and sn-2 fatty acid composition in human milk from Granada (Spain) and in infant formulas. *Eur J Clin Nutr.* 56:1-13.
- López-Luna P, Muñoz T, Herrera E. (1986). Body fat in pregnant rats at mid- and late-gestation. *Life Sci.* 39:1389-93.
- López-Luna P, Maier I, Herrera E. (1991). Carcass and tissue fat content in the pregnant rat. *Biol Neonate.* 60:29-38.
- Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet.* (1990). 336:1519-1523.
- Lucas A, Brooke OG, Morley R. (1990). Early diet of preterm infants and development of allergic or atopic disease: randomised prospective study. *Br Med J.* 300:837-840.
- Lucas A, Morley R, Cole TJ, Lister G. (1992). Leeson- Payne C. Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. *Lancet.* 339:261-64.
- Lucas A, Stafford M, Morley R, et al. Efficacy and safety of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of infant-formula milk: a randomised trial. *Lancet.* 1999; 354 :1948 – 1954
- Lykkesfeldt J, Loft S, Poulsen HE. (1995). Determination of Ascorbic acid and Dehydroascorbic Acid in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Detection-Are They Reliable Biomarkers of Oxidative stress?. *Anal. Biochem.* 229:329-335.
- Macias C, Schweigert FJ. (2001). Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann. Nutr. Metab.* 45:82-85.
- Maganto MC. (1995). Instrumentos aplicados para la evaluación y el diagnóstico en psicopatología infantil. En: Rodríguez Sacristán J ed. Psicopatología del niño y del adolescente. Sevilla: Universidad de Sevilla. 191-282.
- Mahalanabis D, Basak M, Paul D, Gupta S, Shaikh S, Wahed MA, Khaled MA (2006). Antioxidant vitamins C and E as adjunct therapy of severe acute lower-respiratory infection in infants and young children: a randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 60:673-680.
- Makrides M, Simmer K, Goggin M, Gibson RA. (1993). Erythrocyte docosahexaenoic acid correlates with the visual response of healthy term infants. *Pediatr Res.* 33:425-7.
- Makrides M, Neuman MA, Byard RW. (1994). Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. *Am J Clin Nutr.* 60:180-94.
- Makrides M, Simmer K, Neumann M, Gibson RA. (1995). Changes in the polyunsaturated fatty acids of breast milk from mothers of full-term infants over 30 wk of lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* 61(6):1231–1233.
- Makrides M, Neumann MA, Simmer K, Gibson RA. (1995b). Erythrocyte fatty acids of term infants fed either breast milk, standard formula, or formula supplemented with long-chain polyunsaturates. *Lipids.* 30:941–948.
- Makrides M, Neuman M, Simmer K, Pater J, Gibson RA. (1995c). Are Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids Essential Nutrients in Infancy? *Lancet.* 345:1463-1468.
- Makrides M, Neuman MA, Jeffrey B, Lien EL, Gibson RA. (2000). A randomized trial of different ratios of linoleic to α -linolenic acid in the diet of term infants: effects on visual function and growth. *Am J Clin Nutr.* 71:120-129.

- Makrides M, Neumann MA, Simmer K, Gibson RA. (200b). A critical appraisal of the role of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids on neural indices of term infants: a randomized, controlled trial. *Pediatrics*. 105:32–38.
- Makrides M, Gibson RA. (2000). Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Requirements During Pregnancy and Lactation. *Am J. Clin. Nutr.* 71:307S-311S.
- Margolis SA, Schapira RM (1997). Liquid chromatographic measurement of L-ascorbic acid and D-ascorbic acid in biological samples. *J. Chromatogr. B.* 690:25-33.
- Martín JC, Bougnoux P, Antoine JM, Lanson M, Couet C (1993). Triacylglycerol structure of human colostrum and mature milk. *Lipids*. 28:637-643.
- Martín Martínez B. (2005). Estudio comparativo de la leche de mujer con las leches artificiales. *An Pediat.* 3(1): 43 - 53.
- Martínez M. (1992b). Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J. Pediatr.* 120:S129–38.
- Martínez FE, Goncalves AL, Jorge SM, Desai ID (1981b). Vitamin E in placental blood and its interrelationship to maternal and newborn levels of vitamin E. *J. Pediatr.* 99:298-300.
- Mataix Verdú J, Ochoa Herrera J (2002). Nutrición y alimentación humana. Tomo I. Nutrientes y alimentos. Mataix Verdú J. Ergon. pp.184-196.
- May JT. (1994). Antimicrobial factors and microbial contaminants in human milk: recent studies. *J Paediatr Child Health*. 30:470-475.
- May JT (2005). Human milk—tables of the antimicrobial factors and microbiological contaminants relevant to human milk banking. LaTrobe University Department of Microbiology Available at (www.latrobe.edu.au/microbiology/milk).
- Mayer EJ, Hamman RF, Gay EC. (1988) Reduced risk of IDDM among breast-fed children. *Diabetes*. 37:1625-1632.
- McGuire W, Anthony MY. (2003). Donor human milk versus formula for preventing necrotizing enterocolitis in preterm infants: systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 88:F11-F14.
- McPherson RJ, Wagner CL. (2001). The effect of pasteurization on transforming growth factor alpha and transforming growth factor beta 2 concentrations in human milk, *Adv Exp Med Biol.* 501:559–566.
- Melton LJ, Bryant SC, Wahner HW. (1993). Influence of breastfeeding and other reproductive factors on bone mass later in life. *Osteoporos Int.* 3:76-83.
- Mino M (1992). Vitamin E status in children: Health and diseases. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* N° especial, 64-70.
- Mino M (1993). Vitamin A and E deficiency in children, including the marginal deficiency. *Nippon Rinsho* 51:972-976.
- Miyake M, Miki M, Yasuda H, Ogihara T, Mino M (1991). Vitamin E and the peroxidizability of erythrocyte membranes in neonates. *Free Rad. Comms.* 15:41-50.
- Miquel, E.; Alegría, A.; Barberá, R.; Farré, R.; Clemente, G. (2004). Stability of tocopherols in adapted milk-based infant formulas during storage. *Int Dairy J.* 14:1003-1011.
- Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareno E, Bosh-Morell F, Romero FJ, et al. (2004). Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. *Biofactors*. 20(3):129-137.
- Moffatt, P. A.; Lammi-Keefe, C. J.; Ferris, A. M.; Jensen, R. G. (1987). Alpha and gamma tocopherols in pooled mature human milk after storage. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 6:225–227.
- Montagne P, Cuilliere ML, Molé C, Béné MC, Faure G. (1999). Immunological and nutritional composition of human milk in relation to prematurity and mothers' parity during the first 2 weeks of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 29:75-80.
- Montgomery C, Soeake BK, Cameron A, Sattar N, Weaver LT (2003). Maternal docosahexaenoic acid supplementation and fetal accretion. *Brit J Nutr.* 90:135-145.
- Moore SA, Yoder E, Murphy S. (1991). Astrocytes non neurons produce docosahexaenoic acid and arachidonic acid. *J Neurochem.* 56:518-524.
- Morán J (1992). Lactancia maternal en España. Situación actual. *An. Esp. Pediatr.* 36:45-50.
- Morgan C, Stammers J, Colley J, Spencer SA, Hull D (1998). Fatty acid balance studies in preterm infants fed formulamilk containing long-chain polyunsaturated fatty acids (LCP) II. *Acta Paediatr.* 87:318-324.
- Moriguchi T, Sheaff R, Salem N. (2000). Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J Neurochemistry.* 75:2563-2573.

- Kall MA, Andersen C (1999). Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *J. Chromatogr. B.* 730:101-111.
- Melchert HU, Pabel E (2000). Quantitative determination of α -, β -, γ - and δ -tocopherols in human serum by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry as trimethylsilyl derivatives with a two-step sample preparation. *J Chromatogr. A.* 896:209-215.
- Montsuchi P, Corradi M, Ciabattini G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ (1999). Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 160:216-220.
- Moya M, Juste M, Cortés E, Carratalá F. (2000). Fatty acid composition of mature breast milk according to the mothers diet during pregnancy. En *Short and Long Term Effects of Breast Feeding on Child Health.* Ed por B. Koleszko. Kluwer R. Academic Plenum. New York . Pp. 405.
- Morris RG. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11:47-60.
- Muller DPR, Lloyd JK y Wolff OH (1983). Vitamin E and neurological function. *Lancet.* 29:225-227.
- Naidu KA. (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. Review. *J. Nutr.* 2:7.
- Nakashima Y, Yuasa S, Hukamizu Y, Okuyama H, Ohhara T, Kameyama T, Nabeshima T. (1993). Effect of high linoleate and a high alpha-linolenate diet on general behaviour and drug sensitivity in mice. *J Lipid Res.* 34: 239-247.
- Neuringer M, Connor WE, Van Petten, Barsrad L. (1984). Dietary omega-3 fatty acid deficiency and visual loss in infant rhesus monkeys. *J Clin Invest.* 73:272-276.
- Neville CM (1995a). Sampling and storage of human milk. En: Jensen RG, ed. *Handbook of milk composition.* San Diego (CA) Academic Press, 64-79.
- Newman J. (1995). How breast milk protects newborns. *Sci Am.* 273:76-79.
- J. H. Nielsen, G. Hald, L. Kjeldsen, H.J. Andersen, H. Ostdal. (2001). Oxidation of Ascorbate in Raw Milk Induced by Enzymes and Transition Metals. *J. Agric. Food Chem.* 49:2998-3003.
- Niu S-L, Mitchell DC, Lim S-Y, Wen Z-M, Kim H-Y, et al. (2004). Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to *n-3* fatty acid deficiency. *J. Biol. Chem.* 279:31098-31104.
- Nogales A. (1989). *Vademecum de dietética infantil.* Ed CEA. Madrid.
- Norcia AM, Tyler CW. (1985). Infant VEP acuity measurements: analysis of individual differences and measurement error. *Electroencephalography Clin Neurophysiol.* 61:359-369.
- Northrop-Cleves C. (2001). Formula feeds: attributes and disadvantages En: Preddy V, Grimble G y Watson D. *Nutrition in the infant, problems and and Practical Procedures.* Greenwich Medical Media LTD. Pp.409-425.
- Notas Técnicas de Prevención, NTP-664: Lactancia materna y vuelta al trabajo. Solé Gómez, M D NTP-e Serie 19. 2005.
- [Novak FR](#), [Almeida JA](#), [Warnken MB](#), [Ferreira-Carvalho BT](#), [Hagler AN](#). (2000). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human milk. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95(1):29-33.
- Ñíguez JC, Garcia Marcos LV (1987): Seguimiento longitudinal de albúmina, IgA, IgG, IgM determinadas mediante Nefelometría laser en leche maternal. Premios nutrición Infantil. 535-581.
- Nwankwo MU, Offor E, Okolo AA, Omene JA. (1988). Bacterial growth in expressed breast-milk. *Ann Trop Pediatr.* 8(2):92-95.
- O'Connor D, Hall R, Adamkin D, Auestad N, Castillo M, Connor WE, Connor SL, Fitzgerald K, Groh-Wargo S, Hartmann EE. (2001). Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: A prospective randomised control trial. *Pediatrics.* 108:359-371.
- O'Gara C, Canahuati J, Martin AM. (1994). Every mother is a working mother: breastfeeding and women's work. *Int J Gynaecol Obstet.* 47(Suppl):S33-S38.
- Ogundele MO. Cytotoxicity by stored human breast milk: possible contribution of complement system. *Cell Biol Int.* 1999. 23(8):585-588.
- Ogundele MO. (2000). Techniques for the storage of human breast milk: implications for anti-microbial functions and safety of stored milk. *Eur J Pediatr.* 159:793-797.

- Ogundele MO. (2002). Effects of storage on the physicochemical and antibacterial properties of human milk. *Br J Biomed Sci.* 59:205-211.
- Olowe SA, Ahmed I, Lawal SF, Ransome-Kuti S. (1987). Bacteriological quality of raw human milk: effect of storage in a refrigerator. *Ann Trop Pediatr.* 7:233-237.
- Olsen SF, Secher NJ. (2002). Low consumption of seafood in early pregnancy as a risk factor for preterm delivery: prospective cohort study. *BMJ.* 324 (23):1-5.
- Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Jiang M, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M (2001). Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci.* 69:223-228.
- Orloff SL, Wallingford JC, McDougal JS. (1993). Inactivation of human immunodeficiency virus type I in human milk: effects of intrinsic factors in human milk and of pasteurization. *J Hum Lact.* 9:13-17.
- Ortiz de Apocada Ruiz, MA (2005). Vitaminas hidrosolubles vol 1. Dirigido por: Deulofen R, Vilaseca MA, Cruz Pastor M. SEQC: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Pp:95-111.
- Ostdal H, Andersen HJ, Nielsen JH. (2000). Antioxidative Activity of Urate in Bovine Milk. *J. Agric. Food Chem.* 48:5588-5592.
- Ostrea EM, Balun JE, Winkler R, *et al.* (1986). Influence of breast-feeding on the restoration of the low serum concentration of vitamin E and beta-carotene in the newborn infant. *Am J Obstet Gynecol.* 154:1014-1017.
- Otto SJ, van Houwelingen AC, Manninen A, Godfrey K, Lopez-Jaramillo P, Hornstra G. (1997). Maternal and neonatal essential fatty acid status in phospholipids: an international comparative study. *Eur J Clin Nutr.* 51:232-42.
- Otto SJ, van Houwelingen AC, Badart-Smook A, Hornstra G. (1999). The postpartum docosahexaenoic acid status of lactating and nonlactating mothers. *Lipids.* 34(suppl):S227.
- Ottosson UB, Lagrelius A, Rosing U, Von Schoultz B. (1984). Relative fatty acid composition of lecithin during postmenopausal replacement therapy – a comparison between ethynyl estradiol and estradiol valerate. *Gynecology and Obstetric Investigation.* 18:296-302
- Packer L (1991). Protective role of vitamin e in biological systems. *Am J. Clin Nutr.* 53:105S.
- Packer L (1993). The vitamin E antioxidant cycle in health and disease. En: NewYork developments in lipid-protein interactions and receptors function. *NATO ASI Ser.Ser A* 246:297-308.
- Paradise JL, Elster BA, Tan L (1994). Evidence in infants with cleft palate that breast milk protects against otitis media. *Pediatrics.* 94:853-860.
- Pardou A, Serruys E, Mascart-Lemone F, Dramaix M, Vis HL. (1994). Human milk banking; influence of storage processes and of bacterial contamination on some milk constituents. *Biol. Neonate.* 65(5):302-309.
- Pawlosky R, Hibbeln J, Lin Y, Salem N. (2003). n-3 fatty acid metabolism in women. *Br J Nutr.* 90:993-994.
- Pierce EA, Mukai S. (1994). Controversies in the management of retinopathy of prematurity. *Internat. Ophthalmol. Clin.* 34:121-148.
- Pinheiro FS, Jorge SM, Martínez FE (1991). Ineffectiveness of vitamin E supplementation on growth and anaemia of prematurity. *J. Trop. Paediatr.* 37:268.
- Pita ML, Girón MD, Pérez-Ayala M, DeLucchi C, Martínez-Valverde A, Gil A. (1989). Effects of postnatal age and diet on plasma lipid fractions in preterm infants. *Clin Physiol Biochem.* 7:238-248.
- Pittard WB, 3rd, Anderson DM, Cerutti ER, Boxerbaum B. (1985). Bacteriostatic qualities of human milk. *J. Pediatr.* 107(2):240-243.
- Pittschiele K (1993). Vitamin E and liver damage in MZ heterozygous infants with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Acta Paediatr.* 82:228-32.
- Popkin BM, Adair L, Akin JS. (1990). Breast-feeding and diarrheal morbidity. *Pediatrics.* 86:874-882.
- Postle AD, Al MDM, Burdge GC, Hornstra G. (1995). The composition of individual molecular species of plasma phosphatidylcholine in human pregnancy. *Early Hum Dev.* 43:47-58.
- Poston L, Brille AL, Seed PT, Kelly FJ, Shennan AH (2006). Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 367:1145-1154.
- Radetsky P. (1999). Got cancer killers? Discover, pp. 68-75.

- Raelot T, Groscolas R, Langin D, Ferré P. (1997). Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *J Lipid Res.* 38:1963-1972.
- Rapoport SI. 2001. In vivo fatty acid incorporation into brain phospholipids in relation to plasma availability, signal transduction and membrane remodeling. *J. Mol. Neurosci.* 16:243-61.
- Real Decreto 2685/1976. Publicado el 16 de octubre de 1976 en el BOE núm. 284, 23543-23549.
- Real Decreto 1408/1992. Publicado el 20 de noviembre de 1992 en el BOE núm. 11, 793-801.
- Real Decreto 72/1998, 23 de enero. Publicado el 4 de febrero de 1998 en el BOE núm. 30, 3772-3780.
- Real Decreto 1446/2000, 31 de julio. Publicado el 1 de agosto de 2000 en el BOE núm. 183, 27563-27564.
- Real Decreto 500/2004, 1 de abril. Publicado el 2 de abril de 2004 en el BOE núm. 80, 14050-14051.
- Resto M, O'Connor D, Leef K, Funanage V, Spear M, Locke R. (2001). Leptin Levels in Preterm Human Breast Milk and Infant Formula. *Pediatrics.* 108(1):15-18.
- Ribeiro KDS, Melo ILP, Pristo AZO, Dimenstein R. (2005). The effect of processing on the vitamin A content of human milk. *J Pediatr (Rio J).* 81:61-4.
- Rigas A, Rigas B, Glassman M. (1993). Breast-feeding and maternal smoking in the etiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in childhood. *Ann Epidemiol.* 3:387-392.
- Ripalda MJ, Rudolph N, Wong SL (1989). Development pattern of antioxidant defense mechanisms in human erythrocytes. *Pediatr Res.* 26:366-369.
- N. Rodrigo, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré. (2002). High-Performance liquid chromatographic determination of tocopherols in infant formulas. *J. Chromatogr. A.* 947:97-102.
- Rohr FJ, Levy HL, Shih VE. (1985). Inborn errors of metabolism. In: Walker WA, Watkins JB, eds. *Nutrition in Pediatrics.* Boston, MA: Little, Brown. 412.
- Rodríguez M, Calderón L, Cabrera L, Ibarra N, Moya P, Faas AE (2005). Escala Bayley (Análisis de Consistencia Interna de la Escala Bayley del Desarrollo Infantil para la Ciudad de Córdoba (Primer año de Vida). Laboratorio de Evaluación Psicológica y Educativa. ISSN n°1515-1867. pp 55-69.
- Rojas R, Martínez J, Flores I, Hoffman D, Uauy R. (2003). Gene expression analysis in human fetal retinal explants treated with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44: 3170-3177.
- Rolland-Cachera MF, Deheeger M, Akrouf M, Bellisle F. (1995). Influence of macronutrients on adiposity development: a follow up study of nutrition and growth from 10 mothers to 8 years of age. *Int J Obes.* 19:573-8.
- Rosenbaum AL, Phelps DL, Isenberg SJ, Leake RD, Dorey F. (1985). Retinal hemorrhage in retinopathy of prematurity associated with tocopherol treatment. *Ophthalmology.* 92:1012-1014.
- Rosenblatt KA, Thomas DB. (1993). WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. *Int J Epidemiol.* 22:192-197.
- Royal College of Pediatrics and Child Health and United Kingdom Association for Milk Banking, Guidelines for the Establishment and Operation of Human Milk Banks in the UK. (1999). 2nd ed. London: Royal College of Pediatrics and Child Health.
- Rupérez FJ, Barbas C, Castro M, Martínez S, Herrera E. (1998). Simplified method for vitamin E determination in rat adipose tissue and mammary glands by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 823(1-2):483-487.
- Russell LF. (2004). Handbook of Food Analysis. Second Edition, revised and expanded. Physical Characterization and Nutrient Analysis. Edited by Nollet ML. pp:487-569.
- Saarinen UM. (1982). Prolonged breast feeding as prophylaxis for recurrent otitis media. *Acta Paediatr Scand.* 71:567-571.
- Saarinen UM, Kajosaari M. (1995). Breastfeeding as prophylaxis against atopic disease: prospective follow-up study until 17 years old. *Lancet.* 346:1065-1069.
- Sala A, Campoy C, Castellote AI, Garrido FJ, Rivero M, Rodríguez M, López-Sabater (2006). Influence of dietary source of docosahexaenoic and arachidonic acids on their incorporation into membrane phospholipids of erythrocytes in term infants. *Prostaglandins, Leukotriens & Essential Fatty Acids.* 74: 143-148.

- Saldhana RL, Cepeda EE y Poland RL (1982). The effect of vitamin E prophylaxis on the incidence and severity of bronchopulmonary dysplasia. *J. Pediatr.* 101:81-93.
- Salem N, Wegher B, Mena P, Uauy R. (1996). Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 93:49-54.
- Salem N, Litman B, Kim HY, Gawrisch K. (2001). Mechanism of the action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids.* 36:945-959.
- Sánchez-Moreno C, Plaza L, Ancos B, Cano MP. (2003). Vitamin C, Provitamin A Carotenoids, and Other Carotenoids in High-Pressurized Orange Juice during refrigerated Storage. *J. Agric. Food Chem.* 51:647-653.
- Sanchez-Perez A, Delgado-Zamarreño MM, Bustamente-Rangel M, Hernández-Méndez J. (2000). Automated analysis of vitamin E isomers in vegetable oils by continuous membrane extraction and liquid chromatography-electrochemical detection. *J. Chromatogr. A.* 881(1-2):229-241.
- Sastry PS. (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res.* 24:169-76.
- Sauerwald TU, Hachey DL, Jensen CL, Chen H, Anderson RE, Heird WC. Intermediates in endogenous synthesis of C22:6 ω 3 and C20:4 ω 6 by term and preterm infants. *Pediatric Research* 1997; 41, 183-187.
- Schanler RJ (2001). The use of human milk for premature infant. *Pediatr. Clin. North Am.* 48(1):207-219.
- Schroten H, Hanisch FG, Plogmann R, Hacker J, Uhlenbruck G, Nobis-Bosch R, Wahn V. (1992). Inhibition of adhesion of S-fimbriated Escherichia coli to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the non-immunoglobulin fraction. *Infect Immun.* 60:2839-2899.
- Sevanian, A. (2001). Antioxidantes en la arterioesclerosis- Universidad de Southern California- Abril.
- Sheaff RC, Zhang Q, Goodman KJ, Giussani DA, Nathanielsz PW, Brenna JT. (1996). Linoleate, α -linoleate and docosahexaenoate recycling into saturated and monounsaturated fatty acids is a major pathway in pregnant or lactating adults and fetal or infants Rhesus monkeys. *Journal of Lipid Research.* 37:2675-2686.
- Shehadeh N, Aslih N, CIAV S, Werman MJ, Sheinman R, Shamir R. (2006). Human milk beyond one year post-partum: lower content of protein, calcium, and saturated very long-chain fatty acids. *J Pediatr.* 148:122-124.
- Sies H, Murphy ME, Di Mascio P, Stahl W. (1992). Tocopherols, carotenoids and the glutathione system. En: Ong ASH y Packer L, eds. *Lipid-Soluble Antioxidants*: Birkhaeuser: Basel. Pp.160-5.
- Simmer K. (2000). Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* (2); CD000375.
- Skoczinski AM, Norcia AM. (1999). Development of VEP Vernier acuity and grating acuity in human infants. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40: 2411-2417.
- Smith EN, Koopmann M, Boersma ER, Muskiet FAJ. (2000). Effect of supplementation of arachidonic acid (AA) or a combination of AA plus docosahexaenoic acid on breastmilk fatty acid composition. *Prost Leukotrienes Essent Fatty Acids.* 62:335-340.
- Smutsa C, Borod E, Peeples J, Carlson S. (2003) High-DHA eggs: feasibility as a means to enhance circulating DHA in mother and infant. *Lipids.* 38:407-414.
- Sokol RJ. (1988). Vitamin E deficiency and neurologic disease. *Annu. Rev. Nutr.* 8:351-373.
- Sollid LM. (2002). Breast milk against coeliac disease. *Gut.* 51:767-768.
- Sommerburg O, Meissner K, Nelle M, et al. (2000). Carotenoid supply in breast-fed and formula-fed neonates. *Eur J Pediatr.* 159:86-90.
- Soutar A, Seaton A, Brown K (1997). Bronchial reactivity and dietary antioxidants. *Thorax.* 52:166-170.
- Speer ME, Blifeld C, Rudolph AJ, Chadda P, Holbein MEB, Hittner HM. (1984). Intraventricular hemorrhage and vitamin E in very low birth weight infant: Evidence for efficacy of early intramuscular administration. *Pediatrics.* 74:1107-1112.
- Sprecher H, Luthria DL, Mohamed BS, Baykousheva SP. (1995). Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res.* 36:2471-2477.
- Sprecher H. (2000). Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1486, 219-231.

- Springer S. (2000). News about human milk banking in Germany. En: Koletzko B. Short and long effects of breast feeding on child health. Kluwer Academic Plenum Publishers. Pp. 441-442.
- Stapelfeldt H, Nielsen BR, Skibsted LH. (1997). Effect of Heat Treatment, Water Activity and Storage Temperature on the Oxidative Stability of Whole Milk Powder. *Intern. Dairy J.* 7:331-339.
- Steffensen CL, Andersen HJ, Nielsen JH. (2002). Aldehyde-Induced Xanthine Oxidase Activity in Raw Milk. *J. Agric. Food Chem.* 50:7392-7395.
- Stein H, Cohen D, Herman AA, et al. (1986). Pooled pasteurized breast milk and untreated own mother's milk in the feeding of very low birth weight babies: a randomized controlled trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 5:242-247.
- Su HM, Bernardo L, Mirmiran M, Ma XH, Corso TN, Nathanielsz PW, Brenna JT. (1999a). Bioequivalence of dietary alpha-linolenic and docosahexaenoic acids as sources of docosahexaenoate accretion in brain and associated organs of neonatal baboons. *Pediatric Research.* 45, 87-93.
- Su HM, Bernardo L, Mirmiran M, Ma XH, Nathanielsz PW, Brenna JT. (1999b). Dietary 18:3 n-3 and 22:6n-3 as sources of 22:6n-3 accretion in neonatal baboon brain and associated organs. *Lipids.* 34, S347-S350.
- Svennerholm L. (1968). Distribution of fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J Lipid Res.* 9:570-579.
- Swanson JE, Kinsella JE (1986). Dietary normal n-3 polyunsaturated fatty acids. Modification of rat cardiac lipids and fatty acid composition. *J Nutr.* 116:514-523.
- Silfverstolpe G, Johnson P, Samsice G, Svanborg A, Gustafson A (1981) Effects induced by two different estrogens on serum individual phospholipids and serum lecithin fatty acid composition. *Hormone and Metabolic Research.* 13:141-145.
- Szajewska H, Horvath A, Koletzko B. (2006). Effect of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of women with low-risk pregnancies on pregnancy outcomes and growth measures at birth: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 83:1337-1344.
- Takala AK, Eskola J, Palmgren J. (1989). Risk factors of invasive Haemophilus influenzae type b disease among children in Finland. *J Pediatr.* 115:694-701.
- Talbot FA. (1928). An organization for supplying human milk. *N Engl J Med.* 610-611, 640-641.
- Tam O, Innis SM. (2006). Dietary Polyunsaturated Fatty Acids in Gestation Alter Fetal Cortical Phospholipids, Fatty Acids and Phosphatidylserine Synthesis. *Dev Neurosci.* 28:222-229.
- Tanaka H, Mino M, Takeuchi T (1988). A nutritional evaluation of vitamin E status in very low birth weight infants with respect to changes in plasma and red blood cell tocopherol levels. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 34, 293-307.
- Tan B, Brzuskiwicz L (1988). Separation tocopherol and tocotrienol isomers using normal- and reverse-phase chromatography. *Anal Biochem.* 180:368-373.
- Tanner JT, Barnett SA, Mountford MK (1993). Analysis of milk-based infant formula. Phase V. Vitamins A and E, folic acid, and pantothenic acid: Food and Drug Administration-Infant formula Council: collaborative study. *JAOAC Intl.* 76:399-413.
- Teague WE, Fuller NL, Rand RP, Gawrisch K. (2002). Polyunsaturated lipids in membrane fusion events. *Cell Mol. Biol. Lett.* 7:262-264.
- Teller Acuity Card Handbook. (1989). Vistech Consultants. Dayton Ohio 1989.
- Thibeault DW (2000). The precarious antioxidant defenses of the preterm infant. *Am. J. Perinatol.* 17:167-81.
- Thiès F, Delachambre M, Bentajac M, Lagarde M, Lecerf J. (1992). Unsaturated fatty acids esterified in 2-acyl-1-lysophosphatidylcholine bound to albumin are more efficiently taken up by the young rat brain than the unesterified form. *J Neurochem.* 59:1110-1116.
- Thiès F, Pillon C, Molière P, Lagarde M, Lecerf J. (1994). Preferential incorporation of sn-2 lyso PC DHA over unesterified DHA in the young rat brain. *Am J Physiol.* 267: R1273-R1279.
- Thompson JN, Hatina G (1979). Determination of tocopherols and tocotrienols in foods and tissues by HPLC. *J. Liq. Chrom.* 2:327-344.

- Thompson J, Smith S. (1985). Biosynthesis of fatty acids by lactating human breast epithelial cells: an evaluation of the contribution to the overall composition of human milk fat. *Pediatr. Res.* 19(1):139–143.
- Traber MG, Elsner A, Brigelius-Flohe R. (1998). Synthetic as compared with natural vitamin E is preferentially excreted as alpha-CEHC in human urine: studies using deuterated alpha-tocopheryl acetates. *FEBS Lett.* 437(1-2):145-148.
- Traber MG. (1999). Vitamin E. In: Shils M, Olson JA, Shike M, Ross AC, eds. *Nutrition in Health and Disease*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 347-362.
- Trenerry VC (2001). The application of capillary electrophoresis to the analysis of vitamins in food and beverages. *Electrophoresis* 22:1466-1476.
- S. Tuan, T. F. Lee, C. C. Chou, Q. K. Wei (1989). Determination of vitamin E homologues in infant formulas by HPLC using fluorometric detection. *J. Micronutr. Anal.* 6:35-45.
- Tudela JA, Espin JC, Gil MI. (2002). Vitamin C retention in fresh-cut potatoes. *Postharvest Biology and Technology.* 26:75-84.
- Tully MR. (2000). A year of remarkable growth for donor milk banking in North America. *J Hum Lact.* 16:235-236.
- Tully DB, F. Jones F, Tully MR. (2001). Donor milk: what's in it and what's not? *J Hum Lact.* 17:152–155.
- Turner C, Persson M, Mathiasson L, Adlercreutz P, King JW (2001). Lipase-catalyzed reactions in organic and supercritical solvents: application to fat-soluble vitamin determination in milk powder and infant formula. *Enzyme Microb Technol.* 29:111-121.
- Uauy RD, Birch DG, Birch EE, Tyson JE, Hoffman DR. (1990). Effect of dietary omega-3 fatty acids on retinal function of very-low-birth-weight neonates. *Pediatr Res.* 28:485-492
- Uauy R, Hoffman DR, Birch EE, Birch DG, Jameson DM, Tyson J. (1994). Safety and efficacy of omega-3 fatty acids in the nutrition of very low weight infants-soy oil and marine oil supplementation of formulae. *J Pediatrics.* 124:612-20.
- Uauy R, Mena P, Wegher B, Nieto S, Salem N. (2000). Long-chain polyunsaturated fatty acid formation in neonates: effect of gestational age and intrauterine growth. *Pediatr. Res.* 47:127-135.
- Uauy R, Hoffman DR. (2000a). Essential fat requirements of preterm infants. *Am J Clin Nutr.* 71(Supl):245S-50S.
- Uauy R, Hoffman DR, MENA P, Llanos A, Birch EE (2003). Term infant studies of DHA and ARA supplementation on neurodevelopment: results of randomized controlled trials. *J Pediatr.* 143:S17-S25.
- Ulberth F, Roubicek D. (1995). Monitoring of Oxidative Deterioration of Milk Powder by Headspace Gas Chromatography. *International Dairy Journal.* 5 (6):523-531.
- United Nations Children's Fund (UNICEF), Facts for Life, New York, (2002) available at: <http://www.unicef.org/ffl/text.htm>
- Urano S, Kitahara M, Yuko K, Hasegawa Y, Mitsuyoshi m (1990). Membrane stabilizing effect of vitamin E: existence of a hydrogen bond between alpha-tocopherol and phospholipids in bilayer liposomes. *J. Nutr. Sci Vitaminol.* 36 : 513-519.
- Updegrave K. (2005). Human Milk Banking in the United States. *Newborn and Infant Nursing Reviews.* 5(1):27-33.
- Valdés Rodríguez JL, Cué Brugueras M. (2000). El estrés oxidativo y los antioxidantes - Infomed-Cuba.
- Valentine RC, Valentine DL. (2004). Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. *Prog. Lipid Res.* 43:383–402.
- Valenzuela A, Nieto S. (1994). Biotechnology of lipids: the use of lipases for the structural modification of fats and oils. *Grasas & Aceites.* 45:337-43.
- Valenzuela A, Nieto S. (2001). Acido docosahexaenoico (DHA) en el desarrollo fetal y en la nutrición materno-infantil. *Rev Med Chil.* 129:1203-1211.
- Valenzuela A, Sanhueza J, Nieto S. (2002). El uso de lípidos estructurados en la nutrición: una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de productos innovadores. *Rev Chil Nutr.* 29:106-114.
- Valenzuela A, Nieto S. (2003a). Acidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Rev Chil Ped.* 74:149-157.
- Valenzuela A, Nieto S, Sanhueza J, Zañartu P. (2003b). Supplementation of female rats with alpha linolenic acid (LNA) or docosahexaenoic acid (DHA) produces similar accretion of DHA in the brain of newborn pups, allowing a better discriminatory score at the Skinner test

- box for the DHA supplemented animals. (Abstract). 25th World Congress and Exhibition of the International Society for Fat Research. Bordeaux, Francia, 12-15 octubre.
- Valenzuela A, Sanhueza J, Nieto S. (2003c). Tissue accretion of docosahexaenoic acid (DHA) after supplementation with different sources of DHA: triglycerides, phospholipids, monoacylglyceride and ethyl ester (Abstract). 25th World Congress and Exhibition of the International Society for Fat Research. Bordeaux, Francia, 12-15 octubre.
 - Valenzuela A, Sanhueza J, Nieto S. (2003d). ¿cuál es el mejor aceite? *Aceites & Grasas*. XIII: 379-383.
 - Valenzuela A, von Bernhardt R, Valenzuela V, Ramírez G, Alarcón R, Sanhueza J, Nieto S. (2004). Supplementation of female rats with alpha linolenic acid or docosahexaenoic acid leads to the same omega-6/omega-3 LC-PUFA accretion in mother tissues and in fetal newborn brains. *Ann Nutr Metab*. 48: 28-35.
 - Valenzuela A, Nieto S, Sanhueza J, Núñez MJ, Ferrer C. (2005). Tissue accretion and milk content of docosahexaenoic acid (DHA) in female rats after supplementation with different DHA sources. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 49:325-332.
 - Vallejo-Cordoba, B., and S. Nakai. (1994). Keeping quality assessment of pasteurized milk by multivariate analysis of dynamic headspace gas chromatographic data. 1. Shelf life prediction by principal component regression. *J. Agric. Food Chem*. 42:989-993.
 - Van Acker SABE, Koymans LMH, Bast A (1993). Molecular pharmacology of vitamin E: Structural aspects of antioxidant activity. *Free Rad. Biol. Med*. 15:311-328.
 - Van Biervliet JP, Rosseneu M, Caster H, Vinaimont N, Kohn G, Sawatzki G. (1990). Long-chain polyenoic acid supplementation to infant formula: Evolution of lipoprotein metabolism during the first three months. *Recent Advances in Infants Feeding- Symposium Leidschendam*.
 - Van Zoeren-Grobben DJ, Schrijver GJ, Van den Berg J, Berger HM. (1987). Human milk vitamin content after pasteurisation, storage, or tube feeding. *Arch Dis Child*. 62:161-165.
 - Van Zoeren-Grobben DJ, Moison RM, Ester WM, Berger HM. (1993). Lipid peroxidation in human milk and infant formula: effect of storage, tube feeding and exposure to phototherapy. *Acta Paediatr*. 82:645-649.
 - Van Zoeren-grobben DJ, Jacobs NJ, Houdkamp E, Lindeman JHN, Drejer DF, Berfer HM (1998). Vitamin E status in preterm infants: assessment by plasma and erythrocyte vitamin E-lipid ratios and hemolysis tests. *J Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 26:73-79.
 - Villar J, Cogswell M, Kestler E, Castillo P, Menendez R, Repke JT. (1992). Effect of fat and fat-free mass deposition during pregnancy on birth weight. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 167: 1344-52.
 - Virtanen SM, Rasanen L, Aro A. (1991). Infant feeding in Finnish children <7 yr of age with newly diagnosed IDDM. *Diabetes Care*. 14:415-417.
 - Voss A, Reinhart M, Sankarappa S, Sprecher H. (1991). The metabolism of 4,7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *Journal of Biological Chemistry*. 266:19995-20000.
 - Wainwright PE. (1992). Do essential fatty acids play a role in brain and behavioural development? *Neurosci Behav Rev*. 16:193-205.
 - Wainwright PE. (2000). Nutrition and behaviour: the role of n-3 fatty acids in cognitive function. *Brit J Nutr*. 83:337-339.
 - Wang CS (1981). Kinetic properties of human bile salt-stimulated lipase: studies using long chain triacylglycerols as substrate. *J. Lip. Res*. 26:824-830.
 - Welsh JK, Arsenakis M, Coelen RJ, May JT. (1979). Effect of antiviral lipids, heat, and freezing on the activity of viruses in human milk. *J Infect Dis*. 140:322-328.
 - Werkman SH, Carlson SE. (1996). A randomized trial of visual attention of preterm infants fed docosahexaenoic acid until nine months. *Lipids*. 31:91-97.
 - Widdowson EM. (1988). Upper limits of intakes of total fat and PUFA in infant formulas. *J Nutr*. S1:1814-1817.
 - Wight N. (2001). Commentary: donor human milk for preterm infants. *J Perinatol*. 21:249-254.
 - Wight N. (2005). Donor milk: down but not out (letter). *Pediatrics*. 116(6):1610-1611.
 - Willatts P, Forsyth JS, DiModugno M, Varma S, Colvin M. (1998). Effect of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant formula on problem solving at 10 months of age. *Lancet*. 352: 688-691.

- Williams C, Birch EE, Emmett PM, Northstone K (2001). Stereoacuity at age 3.5 y in children born full-term is associated with prenatal and postnatal dietary factors: a report from a population-based cohort study. *Am J Clin Nutr.* 73:316-322.
- Williard DE, Harmon S, Preuss M, Kaduce T, Moore S, Spector A. (2001). Production and release of docosahexaenoic acid by differentiated rat brain astrocytes. *World Rev Nutr Diet.* 88:168-172.
- Wilson MH. (1990). Feeding the healthy child. In: Oski FA, DeAngelis CD, Feigin RD, et al., eds. Principles and Practice of Pediatrics. Philadelphia, PA: JB Lippincott. 533-545.
- Wilson-Clay B. (2006). The milk of human kindness: the story of the mothers Milk Bank at Austin. *International breastfeeding Journal.* 1-6. Available from: <http://www.internationalbreastfeedingjournal.com/content/1/1/6>
- Wills ME, Han VE, Harris DA, Baum JD. (1982). Short-time low-temperature pasteurisation of human milk. *Early Hum Dev.* 7:71-80.
- Wimalasiri P, Wills RBH. (1983). Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fruit and vegetables by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 256:368-371.
- Winston
- Wolf G (1998). Transport of retinoids by the interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Nutr. Rev.* 56, 156-158.
- Wright AI, Holberg CJ, Martinez FD. (1989). Breast feeding and lower respiratory tract illness in the first year of life. *Br Med J.* 299:945-949.
- Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM. (1995). Relationship of infant feeding to recurrent wheezing at age 6 years. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 149:758-763.
- Wright AL, Schanler RJ. (2001). The resurgence of breastfeeding at the end of the second millennium. *J Nutr.* 131:421S-425S.
- Yamato K, Taguchi H, Yoshimoto S, et al. (1986). Inactivation of lymphocyte-transforming activity of human T-cell leukaemia virus type I by heat. *Jpn J Cancer Res.* 77:13-15.
- Ye L, Eitenmiller R (2004). Handbook of Food Analysis. Second Edition, revised and expanded. Physical Characterization and Nutrient Analysis. Edited by Nollet ML. pp:431-485.
- Yeh YY, Yeh SM, Lien EL. (1998). Modification of milk formula to enhance accretion of long-chain n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids in artificially reared infant rats. *Lipids.* 33:513-520.
- Yonekubo A, Honda S, Okano M, Yamamoto Y. (1993). Effects of dietary safflower oil and soybean oil on the milk composition of the maternal rat, and tissue fatty acid composition and learning ability of postnatal rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 57:253-259.
- Zamarreño MMD, Perez A, Perez M, Mendez J (1992). High performance liquid chromatography with electrochemical detection for the simultaneous determination of vitamin A, D3, and E in milk. *J Chromatogr.* 623:69-74.
- Zamarreño MMD, Perez A, Perez M, Mendez J (1995). Directly coupled sample treatment-high-performance liquid chromatography for on-line automatic determination of liposoluble vitamins in milk. *J Chromatogr.A.* 694:399-406.
- Zamarreño MMD, Perez A, Perez M, Moror MAF, Mendez J. (1995). Determination of vitamins A, E and K₁ in milk by high-performance liquid chromatography with dual amperometric detection. *Analyst.* 120:2489-2492.
- Zeisel S. (2000). Choline: an essential nutrients for humans. *Nutrition.* 16:669-671.
- Zoeren-Grobbe D, Moison RM, Ester WM, et al. (1993). Lipid peroxidation in human milk and infant formula: effect of storage, tube feeding and exposure to phototherapy. *Acta Paediatr.* 82:645-649.
- Zúñiga ME, Lokesh BR, Kinsella JE (1989). Disparate effect of dietary fatty acids on activity of 5' nucleotidase of rat liver plasma membrane. *J. Nutr.* 119:152-160.