

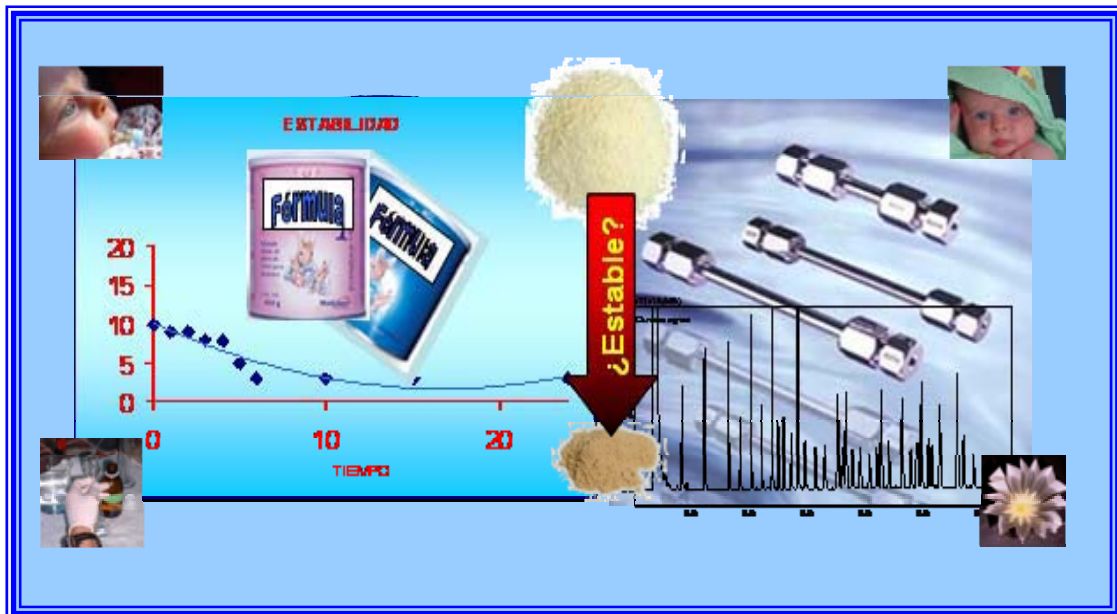
**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**FACULTAT DE FARMÀCIA**

**DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA**

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

**Jorge Luis Chávez-Servín, 2007**



## VIII. ANEXOS



## VIII. ANEXO A)

**A) Publicación: Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas.** Romeu-Nadal, M., Chávez-Servín, J. L., Castellote, A. I., Rivero, M., & López-Sabater, M. C. (2006). *Food Chemistry*, 100(2), 756-763.





## Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas

M. Romeu-Nadal<sup>a</sup>, J.L. Chávez-Servín<sup>a</sup>, A.I. Castellote<sup>a</sup>,  
M. Rivero<sup>b</sup>, M.C. López-Sabater<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *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*

<sup>b</sup> *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](mailto: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 <sup>a</sup>		
	NSF <sup>b</sup>	SFA <sup>c</sup>	SFB <sup>d</sup>
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. <sup>e</sup>	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. <sup>e</sup>	n.d. <sup>e</sup>	0.02 $\pm$ 0.00
C20:5 $n - 3$ (EPA)	n.d. <sup>e</sup>	0.20 $\pm$ 0.01	5.47 $\pm$ 0.05
C22:2 $n - 6$	n.d. <sup>e</sup>	0.01 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00
C22:4 $n - 6$	n.d. <sup>e</sup>	0.04 $\pm$ 0.00	1.64 $\pm$ 0.03
C22:5 $n - 3$	n.d. <sup>e</sup>	0.06 $\pm$ 0.00	1.48 $\pm$ 0.06
C22:6 $n - 3$ (DHA)	n.d. <sup>e</sup>	0.57 $\pm$ 0.01	20.9 $\pm$ 0.35
PUFA <sup>f</sup>	17.9	18.8	34.54
SFA <sup>g</sup>	41.7	41.7	44.4
SFA/PUFA	2.33	2.22	1.29
$n - 3$ LC-PUFA <sup>h</sup>	n.d. <sup>e</sup>	0.83	27.8
$n - 6$ LC-PUFA <sup>i</sup>	0.34	0.47	3.51
$n - 3$ PUFA <sup>j</sup>	1.06	1.86	28.21
$n - 6$ PUFA <sup>k</sup>	16.8	16.9	6.33

<sup>a</sup> SD, standard deviation.

<sup>b</sup> NSF, non-supplemented formula.

<sup>c</sup> SFA, supplemented formula A.

<sup>d</sup> SFB, supplemented formula B.

<sup>e</sup> n.d., not detected.

<sup>f</sup> PUFA, polyunsaturated fatty acids.

<sup>g</sup> SFA, saturated fatty acids.

<sup>h</sup>  $n - 3$  LC-PUFA,  $n - 3$  long-chain polyunsaturated fatty acids.

<sup>i</sup>  $n - 6$  LC-PUFA,  $n - 6$  long-chain polyunsaturated fatty acids.

<sup>j</sup>  $n - 3$  PUFA,  $n - 3$  polyunsaturated fatty acids.

<sup>k</sup>  $n - 6$  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<sup>®</sup> 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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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 BF<sub>3</sub> 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<sup>®</sup> 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. O<sub>2</sub>/kg (Rosell (1989)). The limiting peroxide value specified by Joint FAO/WHO, 1989 standards for refined oil is 10 mequiv. O<sub>2</sub>/kg. This study showed values of 0.52, 0.85 and 0.98 mequiv. O<sub>2</sub>/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. O<sub>2</sub>/kg, respectively), and declined thereafter. The accelerated rate of

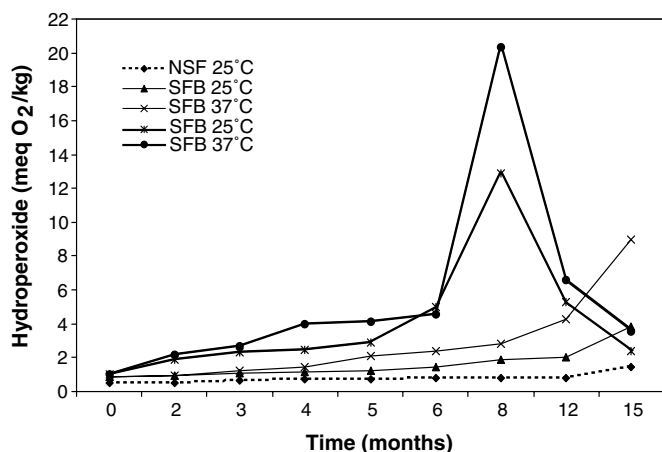


Fig. 1. Evolution of hydroperoxides in non-supplemented formula (NSF) stored at 25 °C, supplemented formula A (SFA) at 25 and 37 °C and supplemented formula B (SFB) at 25 and 37 °C. Means of  $n = 3$  analyses.

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 (Abdalta & 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,

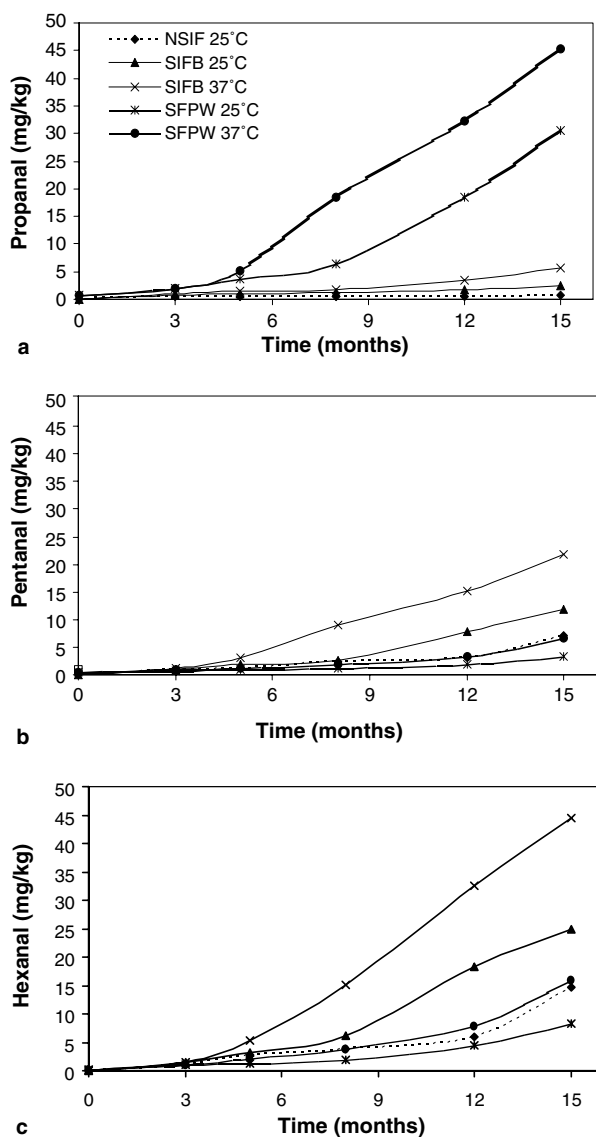


Fig. 2. Evolution of propanal (a), pentanal (b) and hexanal (c) in non-supplemented formula (NSF) stored at 25 °C, supplemented formula A (SFA) at 25 and 37 °C, and supplemented formula B (SFB) at 25 and 37 °C.

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

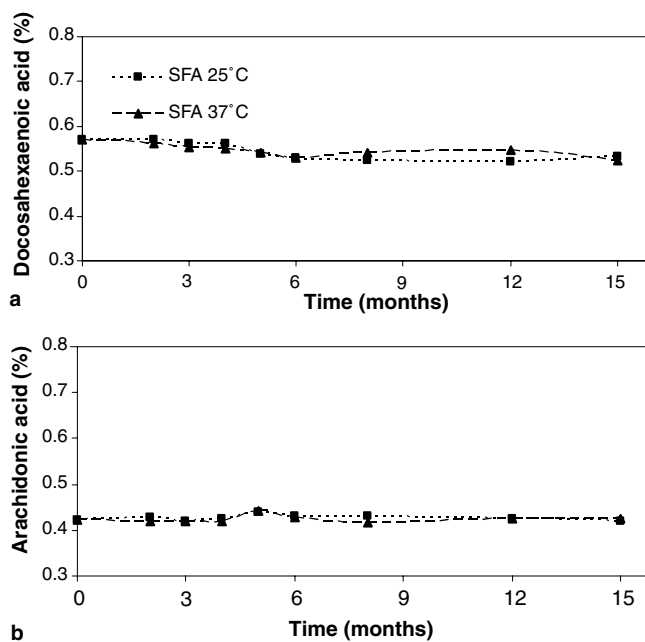


Fig. 3. Evolution of docosahexaenoic acid (a) and arachidonic acid (b) for the supplemented formula A (SFA) at 25 and 37 °C.

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.

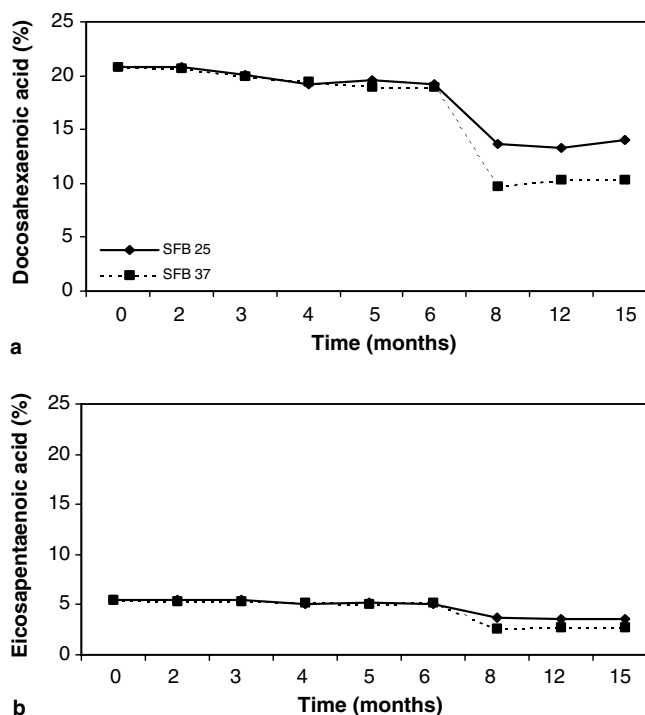


Fig. 4. Evolution of docosahexaenoic acid (a) and eicosapentaenoic acid (b) for the supplemented formula B (SFB) at 25 and 37 °C.

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 <sup>a</sup>		SFB <sup>b</sup>	
	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

<sup>a</sup> SFA, supplemented formula A.

<sup>b</sup> 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.
- Fenaille, 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., & López-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.

## **VIII. ANEXO B)**

**B) DIRECTIVA 2006/141/CE DE LA COMISIÓN de 22 de diciembre de 2006 relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE**



## I

(Actos cuya publicación es una condición para su aplicabilidad)

**DIRECTIVA 2006/141/CE DE LA COMISIÓN****de 22 de diciembre de 2006****relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE****(Texto pertinente a efectos del EEE)**

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 89/398/CEE del Consejo, de 3 de mayo de 1989, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los productos alimenticios destinados a una alimentación especial <sup>(1)</sup>, y, en particular, su artículo 4, apartado 1,

Previa consulta a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (la Autoridad),

Considerando lo siguiente:

(1) La Directiva 89/398/CEE se aplica a los productos alimenticios destinados a una alimentación especial. Las disposiciones específicas aplicables a determinados grupos de alimentos destinados a una alimentación especial se establecen en Directivas específicas.

(2) La Directiva 91/321/CEE de la Comisión, de 14 de mayo de 1991, relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación <sup>(2)</sup>, es una Directiva específica adoptada en virtud de la Directiva 89/398/CEE. Dicha Directiva ha sido objeto de varias modificaciones sustanciales <sup>(3)</sup>. Dado que deben introducirse otras modificaciones, procede refundirla en aras de la claridad.

(3) Teniendo en cuenta los debates en foros internacionales, en particular, el *Codex Alimentarius*, sobre el momento oportuno para la introducción de alimentos complemen-

tarios en la dieta de los lactantes, procede modificar las definiciones en vigor de preparados para lactantes y preparados de continuación y algunas disposiciones sobre el etiquetado de preparados de continuación de la Directiva 91/321/CEE.

(4) Los preparados para lactantes son los únicos productos alimenticios elaborados que satisfacen plenamente las necesidades nutritivas de los lactantes durante los primeros meses de vida hasta la introducción de una alimentación complementaria adecuada. Para proteger la salud de estos lactantes, es necesario garantizar que los preparados para lactantes sean los únicos productos comercializados como idóneos para ser administrados durante ese período.

(5) La composición básica de los preparados para lactantes y preparados de continuación debe satisfacer las necesidades nutritivas de los lactantes sanos, tal y como han sido determinadas con arreglo a datos científicos generalmente aceptados.

(6) Los requisitos sobre la composición esencial de los preparados para lactantes y preparados de continuación deben incluir disposiciones detalladas sobre el contenido proteínico. A pesar de que tradicionalmente se han utilizado diferentes factores de conversión apropiados para el cálculo del contenido proteínico a partir del contenido de nitrógeno de diferentes fuentes de proteínas, recientes directrices científicas indican que, para el objetivo específico de calcular el contenido proteínico de los preparados para lactantes y los preparados de continuación es conveniente utilizar un solo factor de conversión adaptado a estos productos. Dado que los preparados para lactantes y los preparados de continuación son productos sofisticados elaborados especialmente para una finalidad determinada, deben establecerse requisitos esenciales adicionales sobre las proteínas, lo que incluye los niveles de proteínas mínimo y máximo y los niveles mínimos de algunos aminoácidos. Los requisitos sobre proteínas especificados en la presente Directiva se refieren al producto final en sí, preparado y listo para el consumo.

<sup>(1)</sup> DO L 186 de 30.6.1989, p. 27. Directiva modificada en último lugar por el Reglamento (CE) n° 1882/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo (DO L 284 de 31.10.2003, p. 1).

<sup>(2)</sup> DO L 175 de 4.7.1991, p. 35. Directiva modificada en último lugar por el Acta de adhesión de 2003.

<sup>(3)</sup> Véase el anexo X, parte A.



- (7) De acuerdo con esos datos, puede definirse actualmente la composición básica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación fabricados a partir de proteínas contenidas en la leche de vaca y en la soja o mezcladas, así como de los preparados para lactantes basados en hidrolizados de proteínas. No puede decirse lo mismo de los preparados basados total o parcialmente en otras fuentes proteicas. Si es necesario, deben adoptarse en el futuro normas específicas para tales productos.
- (8) Es importante que los ingredientes utilizados en la fabricación de preparados para lactantes y preparados de continuación convengan para la alimentación especial de los lactantes y que su adecuación haya sido demostrada, en su caso, mediante estudios apropiados. Grupos de expertos científicos, tales como el Comité científico de la alimentación humana, el Comité británico sobre los aspectos médicos de la política de alimentación y nutrición y la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátricas han publicado directrices sobre la elaboración y la realización de estudios apropiados. Dichas directrices deben tomarse en consideración al introducir los ingredientes en los preparados para lactantes y los preparados de continuación.
- (9) Algunas sustancias que pueden utilizarse en la fabricación de preparados para lactantes y preparados de continuación pueden utilizarse también como aditivos en los productos alimenticios. En ese contexto, se han adoptado o deben adoptarse criterios de pureza a nivel comunitario de conformidad con la Directiva 89/107/CEE del Consejo, de 21 de diciembre de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los aditivos alimentarios autorizados en los productos alimenticios destinados al consumo humano<sup>(1)</sup>. Los citados criterios de pureza deben aplicarse a las sustancias en cuestión cualquiera que sea la finalidad de su uso en los productos alimenticios.
- (10) Hasta que concluya la adopción de los criterios de pureza de las sustancias para las que aún no se hayan adoptado tales criterios a nivel comunitario, y con el fin de garantizar un nivel elevado de protección de la salud pública, deben aplicarse criterios de pureza generalmente aceptables que recomienden organizaciones u organismos internacionales tales como el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios o la Farmacopea Europea. Amén de ello, los Estados miembros deben poder mantener normas nacionales que establezcan criterios de pureza más estrictos.
- (11) Dada la naturaleza particular de los preparados para lactantes, deben establecerse medios adicionales a los que tienen habitualmente a disposición los organismos de control para facilitar un control eficaz de tales productos.
- (12) Los preparados para lactantes basados en hidrolizados de proteínas son distintos de los productos dietéticos semielementales con un elevado contenido de hidrolizados utilizados en el tratamiento dietético de estados médicos diagnosticados no incluidos en el ámbito de la presente Directiva.
- (13) La presente Directiva refleja el estado actual de los conocimientos sobre los productos que regula. Por lo tanto, cualquier modificación con objeto de admitir las innovaciones basadas en el progreso científico y técnico debe adoptarse con arreglo al procedimiento contemplado en el artículo 13, apartado 2, de la Directiva 89/398/CEE.
- (14) Los niveles máximos de residuos de plaguicidas establecidos en la legislación comunitaria, en particular, en la Directiva 76/895/CEE del Consejo, de 23 de noviembre de 1976, relativa a la fijación de los contenidos máximos de residuos de plaguicidas en las frutas y hortalizas<sup>(2)</sup>, en la Directiva 86/362/CEE del Consejo, de 24 de julio de 1986, relativa a la fijación de contenidos máximos para los residuos de plaguicidas sobre y en los cereales<sup>(3)</sup>, en la Directiva 86/363/CEE del Consejo, de 24 de julio de 1986, relativa a la fijación de contenidos máximos para los residuos de plaguicidas sobre y en los productos alimenticios de origen animal<sup>(4)</sup>, y en la Directiva 90/642/CEE del Consejo, de 27 de noviembre de 1990, relativa a la fijación de los contenidos máximos de residuos de plaguicidas en determinados productos de origen vegetal, incluidas las frutas y hortalizas<sup>(5)</sup>, se aplican sin perjuicio de las disposiciones específicas establecidas en la presente Directiva.
- (15) Teniendo en cuenta las obligaciones internacionales de la Comunidad, en los casos en que las pruebas científicas pertinentes son insuficientes, el principio de cautela contemplado en el artículo 7 del Reglamento (CE) n° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria<sup>(6)</sup>, permite a la Comunidad adoptar provisionalmente medidas atendiendo a la información disponible, a la espera de una evaluación suplementaria del riesgo y de una revisión de la medida transcurrido un período de tiempo razonable.

(2) DO L 340 de 9.12.1976, p. 26. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/92/CE (DO L 311 de 10.11.2006, p. 31).

(3) DO L 221 de 7.8.1986, p. 37. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/92/CE.

(4) DO L 221 de 7.8.1986, p. 43. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/62/CE de la Comisión (DO L 206 de 27.7.2006, p. 27).

(5) DO L 350 de 14.12.1990, p. 71. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/92/CE.

(6) DO L 31 de 1.2.2002, p. 1. Reglamento modificado en último lugar por el Reglamento (CE) n° 575/2006 de la Comisión (DO L 100 de 8.4.2006, p. 3).

(1) DO L 40 de 11.2.1989, p. 27. Directiva modificada en último lugar por el Reglamento (CE) n° 1882/2003.

- (16) Según los dictámenes del Comité científico de la alimentación humana de 19 de septiembre de 1997 y de 4 de junio de 1998, en el momento presente es dudoso que los actuales valores de la ingesta diaria admisible (IDA) de plaguicidas y residuos de plaguicidas sean adecuados para la protección de la salud de los lactantes y los niños de corta edad. Por lo tanto, en el caso de productos alimenticios destinados a una alimentación especial de los lactantes y niños de corta edad, procede establecer un límite común muy bajo para todos los plaguicidas. Este límite común muy bajo debe fijarse en 0,01 mg/kg, lo que normalmente equivale en la práctica al nivel detectable mínimo.
- (17) Debe exigirse una limitación estricta de los residuos de plaguicidas. Seleccionando cuidadosamente las materias primas y teniendo en cuenta que los preparados para lactantes y los preparados de continuación son sometidos a un tratamiento exhaustivo durante el proceso de elaboración, es factible fabricar productos con un nivel muy bajo de residuos de plaguicidas. No obstante, en el caso de un pequeño número de plaguicidas, o de metabolitos de plaguicidas, incluso un límite máximo de residuos de 0,01 mg/kg puede dar lugar a que, en las condiciones más desfavorables de absorción, los lactantes y niños de corta edad rebasen la IDA. Este es el caso de los plaguicidas o metabolitos de plaguicidas cuya IDA es inferior a 0,0005 mg/kg de peso corporal.
- (18) La presente Directiva debe establecer el principio de la prohibición de la utilización de dichos plaguicidas en los productos agrícolas destinados a la elaboración de preparados para lactantes y preparados de continuación. No obstante, esta prohibición no garantiza necesariamente que los productos estén libres de dichos plaguicidas, ya que algunos plaguicidas contaminan el medio ambiente y sus residuos pueden encontrarse en los productos.
- (19) La mayoría de los plaguicidas cuya IDA es inferior a 0,0005 mg/kg de peso corporal se encuentran ya prohibidos en la Comunidad. Los plaguicidas prohibidos no deben poder ser detectados en preparados para lactantes y preparados de continuación por los métodos analíticos más avanzados. No obstante, algunos plaguicidas se degradan lentamente y siguen contaminando el medio ambiente. Pueden estar presentes en preparados para lactantes y preparados de continuación aun cuando no se hayan utilizado. Para fines de control, debe adoptarse un enfoque armonizado.
- (20) A la espera de las decisiones de la Comisión sobre si cumplen las condiciones de seguridad del artículo 5 de la Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios<sup>(1)</sup>, se debe permitir que se sigan utilizando plaguicidas autorizados en tanto en cuanto sus residuos no superen los niveles máximos establecidos en la presente Directiva. Los niveles máximos de residuos se deben fijar de modo que, en el peor de los casos, los lactantes y los niños de corta edad no rebasen la correspondiente IDA.
- (21) Los anexos sobre plaguicidas de la presente Directiva deben modificarse tras completarse el programa de revisión que se está llevando a cabo con arreglo a la Directiva 91/414/CEE.
- (22) En virtud del artículo 7, apartado 1, de la Directiva 89/398/CEE, los productos a que se refiere la presente Directiva están sujetos a las normas generales establecidas en la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de marzo de 2000, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios<sup>(2)</sup>. La presente Directiva establece y desarrolla las adiciones y las excepciones que conviene introducir en dichas normas generales con el fin de favorecer y proteger la lactancia materna.
- (23) En particular, la naturaleza y el destino de los productos regulados por la presente Directiva requieren un etiquetado sobre las propiedades nutritivas que indique el valor energético y los principales elementos nutritivos. Por otra parte, el modo de empleo debe especificarse de conformidad con el artículo 3, apartado 1, punto 9, y con el artículo 11, apartado 2, de la Directiva 2000/13/CE, para evitar que se utilicen de manera inadecuada que perjudique la salud de los lactantes.
- (24) Dada la naturaleza de los preparados para lactantes y preparados de continuación, es necesario precisar las modalidades de declaración del valor nutritivo en el etiquetado, a fin de evitar que surjan problemas debidos a la aplicación de otras disposiciones comunitarias pertinentes.
- (25) El Reglamento (CE) n° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, sobre las alegaciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos<sup>(3)</sup>, establece las normas y las condiciones de uso de las alegaciones nutricionales y propiedades saludables relativas a los alimentos. No obstante, su artículo 1, apartado 5, dispone que el Reglamento se aplicará sin perjuicio, en particular, de la Directiva 89/398/CEE y de las Directivas adoptadas sobre alimentos destinados a una alimentación especial.
- (26) Procede establecer en la presente Directiva las condiciones de uso de las alegaciones nutricionales y de propiedades saludables relativas a preparados para lactantes. A este respecto, con el fin de proporcionar información objetiva y científicamente comprobada, es necesario definir las condiciones de autorización de las alegaciones nutricionales y de propiedades saludables y establecer una lista de las alegaciones autorizadas. De conformidad con el artículo 4, apartado 1, párrafo tercero, de la Directiva 89/398/CEE, dicha lista de alegaciones nutricionales y de propiedades saludables debe modificarse, en su caso, previa consulta de la Autoridad.

(1) DO L 230 de 19.8.1991, p. 1. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/85/CE (DO L 293 de 24.10.2006, p. 3).

(2) DO L 109 de 6.5.2000, p. 29. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2003/89/CE (DO L 308 de 25.11.2003, p. 15).

(3) DO L 404 de 30.12.2006, p. 9.

- (27) Con el fin de proteger mejor la salud de los lactantes, las normas de composición, etiquetado y propaganda establecidas en la presente Directiva deben ajustarse a los principios y objetivos del *Código internacional de comercialización de sustitutivos de la leche materna*, adoptado por la trigésimocuarta Asamblea Mundial de la Salud, teniendo presente las situaciones particulares de hecho y de derecho existentes en la Comunidad.
- (28) Dado el importante papel que desempeña la información en la elección de la alimentación infantil por parte de las mujeres embarazadas y las madres de los niños, es necesario que los Estados miembros adopten las medidas necesarias para que esa información garantice el uso adecuado de dichos productos y no perjudique la promoción de la lactancia materna.
- (29) La presente Directiva no se refiere a las condiciones de venta de las publicaciones especializadas relativas al cuidado de los niños ni de las publicaciones científicas.
- (30) La Directiva 1999/21/CE de la Comisión, de 25 de marzo de 1999, sobre alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales <sup>(1)</sup>, establece requisitos de composición y etiquetado de los alimentos dietéticos para usos médicos especiales. El anexo de dicha Directiva establece los contenidos de minerales en los alimentos nutricionalmente completos destinados a los lactantes. Existen nuevas recomendaciones científicas sobre el nivel mínimo de manganeso en los alimentos destinados a los lactantes. Procede, pues, modificar los niveles de manganeso en alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales para lactantes que figuran en el citado anexo. Por lo tanto, la Directiva 1999/21/CE debe modificarse en consecuencia.
- (31) Dada la naturaleza específica de los alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales para lactantes y la necesidad de evaluar la nueva formulación de tales productos, sus fabricantes necesitan un período más amplio para adaptarlos a la composición básica derivada de los nuevos requisitos establecidos en la presente Directiva.
- (32) La obligación de transponer la presente Directiva a los Derechos nacionales debe limitarse a aquellas disposiciones que suponen un cambio sustancial con respecto a la Directiva anterior. La obligación de transponer las disposiciones inalteradas se deriva de la Directiva anterior.
- (33) La presente Directiva no debe afectar a las obligaciones de los Estados miembros relativas a los plazos de transposición de las Directivas indicados en el anexo X, parte B.
- (34) Las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

#### Artículo 1

La presente Directiva es una «Directiva específica», tal y como se define en el artículo 4, apartado 1, de la Directiva 89/398/CEE, que establece los requisitos de composición y etiquetado de los preparados para lactantes y los preparados de continuación destinados a los niños sanos de la Comunidad.

También permite a los Estados miembros la aplicación de los principios y objetivos del Código internacional de comercialización de sustitutivos de la leche materna relativos a la comercialización, la información y las responsabilidades de las autoridades sanitarias.

#### Artículo 2

A efectos de la presente Directiva, se aplicarán las definiciones de «alegación», «alegación nutricional», «alegación de propiedades saludables» y «alegación de reducción de riesgo de enfermedad» que se establecen en el artículo 2, apartado 2, puntos 1, 4, 5 y 6, del Reglamento (CE) n° 1924/2006.

Se aplicarán además las definiciones siguientes:

- a) «lactantes»: los niños que tengan menos de doce meses;
- b) «niños de corta edad»: los niños entre uno y tres años de edad;
- c) «preparados para lactantes»: los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes durante los primeros meses de vida que satisfagan por sí mismos las necesidades nutritivas de estos lactantes hasta la introducción de una alimentación complementaria apropiada;

<sup>(1)</sup> DO L 91 de 7.4.1999, p. 29. Directiva modificada por el Acta de adhesión de 2003.

d) «preparados de continuación»: los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes cuando se introduzca una alimentación complementaria apropiada que constituyan el principal elemento líquido de una dieta progresivamente diversificada de estos lactantes;

e) «residuo de plaguicida»: el residuo contenido en los preparados para lactantes y en los preparados de continuación procedente de un producto fitosanitario, definido en el artículo 2, apartado 1, de la Directiva 91/414/CEE, incluidos sus metabolitos y productos resultantes de su degradación o reacción.

#### Artículo 3

Solo podrán comercializarse en la Comunidad los preparados para lactantes y los preparados de continuación que sean conformes a lo dispuesto en la presente Directiva.

Ningún otro producto que no sea un preparado para lactantes podrá comercializarse ni presentarse como adecuado para satisfacer por sí mismo las necesidades nutritivas de los lactantes normales sanos durante los primeros meses de vida hasta la introducción de una alimentación complementaria apropiada.

#### Artículo 4

Los preparados para lactantes y los preparados de continuación no contendrán ninguna sustancia en cantidad tal que ponga en peligro la salud de los lactantes y los niños de corta edad.

#### Artículo 5

Los preparados para lactantes se elaborarán, según el caso, a partir de las fuentes proteínicas definidas en el punto 2 del anexo I y de otros ingredientes alimenticios cuya adecuación para la alimentación especial de los lactantes desde el nacimiento haya sido determinada mediante datos científicos generalmente aceptados.

Dicha adecuación se demostrará mediante el análisis sistemático de los datos disponibles sobre los beneficios esperados y las consideraciones de seguridad y, en su caso, mediante estudios pertinentes, realizados según instrucciones especializadas generalmente aceptadas sobre la elaboración y realización de este tipo de estudios.

#### Artículo 6

Los preparados de continuación se elaborarán, según el caso, a partir de las fuentes proteínicas definidas en el punto 2 del anexo II y de otros ingredientes alimenticios cuya adecuación para la alimentación especial de los lactantes de más de seis meses de edad haya sido determinada mediante datos científicos generalmente aceptados.

Dicha adecuación se demostrará mediante el análisis sistemático de los datos disponibles sobre los beneficios esperados y las

consideraciones de seguridad y, en su caso, mediante estudios pertinentes, realizados según instrucciones especializadas generalmente aceptadas sobre la elaboración y realización de este tipo de estudios.

#### Artículo 7

1. Los preparados para lactantes cumplirán los criterios de composición establecidos en el anexo I, teniendo en cuenta las especificaciones del anexo V.

En el caso de los preparados para lactantes fabricados a partir de las proteínas de leche de vaca definidas en el punto 2.1 del anexo I con un contenido proteínico comprendido entre el mínimo y 0,5 g/100 kJ (2 g/100 kcal), la adecuación del preparado para la alimentación especial de los lactantes se demostrará mediante estudios pertinentes, realizados según instrucciones especializadas generalmente admitidas sobre la elaboración y realización de este tipo de estudios.

En el caso de los preparados para lactantes fabricados a partir de hidrolizados de proteínas definidas en el punto 2.2 del anexo I con un contenido proteínico comprendido entre el mínimo y 0,56 g/100 kJ (2,25 g/100 kcal), la adecuación del preparado para la alimentación especial de los lactantes se demostrará mediante estudios pertinentes, realizados según instrucciones especializadas generalmente admitidas sobre la elaboración y realización de este tipo de estudios, y será conforme a las especificaciones pertinentes establecidas en el anexo VI.

2. Los preparados de continuación cumplirán los criterios de composición establecidos en el anexo II, teniendo en cuenta las especificaciones del anexo V.

3. Los preparados para lactantes y los preparados de continuación solo deberán requerir, en su caso, la adición de agua.

4. Deberán respetarse las prohibiciones y limitaciones sobre el empleo de ingredientes alimenticios en los preparados para lactantes y los preparados de continuación, establecidas en los anexos I y II.

#### Artículo 8

1. Solo las sustancias enumeradas en el anexo III podrán utilizarse en la elaboración de preparados para lactantes y preparados de continuación con el fin de satisfacer las necesidades de:

- a) sustancias minerales;
- b) vitaminas;
- c) aminoácidos y otros compuestos nitrogenados;
- d) otras sustancias con fines nutritivos especiales.

2. La fabricación de productos alimenticios para fines distintos de los previstos en la presente Directiva estará sujeta a los criterios de pureza de las sustancias que establece la legislación comunitaria sobre el uso de las sustancias enumeradas en el anexo III.

3. En los casos de sustancias para las que la legislación comunitaria no prevea ningún criterio de pureza, se aplicarán los criterios de pureza generalmente aceptables que recomienden los organismos internacionales hasta que se adopten criterios a nivel comunitario.

No obstante, podrán seguir aplicándose las normas nacionales que establezcan criterios de pureza más estrictos que los recomendados por los organismos internacionales.

#### Artículo 9

1. Para facilitar un control oficial eficaz de los preparados para lactantes, cuando una empresa alimentaria comercialice un preparado para lactante lo notificará a las autoridades competentes de los Estados miembros donde se comercialice enviándoles un modelo de la etiqueta del producto.

2. Las autoridades competentes a efectos del presente artículo son las contempladas en el artículo 9, apartado 4, de la Directiva 89/398/CEE.

#### Artículo 10

1. Los preparados para lactantes y los preparados de continuación no contendrán residuos de plaguicidas en niveles superiores a los 0,01 mg/kg de producto listo para el consumo o reconstituido conforme a las instrucciones del fabricante.

Los métodos analíticos de determinación de los niveles de residuos de plaguicidas serán métodos normalizados generalmente aceptados.

2. Los plaguicidas incluidos en el anexo VIII no se utilizarán en los productos agrícolas destinados a la elaboración de preparados para lactantes y preparados de continuación.

No obstante, para fines de control:

- a) se considerará que no se han utilizado los plaguicidas enumerados en el cuadro 1 del anexo VIII si sus residuos no superan el nivel de 0,003 mg/kg. Este nivel, que se considera el umbral de cuantificación de los métodos analíticos, se revisará periódicamente a la luz de los avances técnicos;
- b) se considerará que no se han utilizado los plaguicidas enumerados en el cuadro 2 del anexo VIII si sus residuos no

superan el nivel de 0,003 mg/kg; este nivel se revisará periódicamente a la luz de los datos sobre contaminación ambiental.

3. No obstante lo dispuesto en el apartado 1, en lo que respecta a los plaguicidas enumerados en el anexo IX serán aplicables los límites máximos para residuos especificados en el mismo.

4. Los niveles mencionados en los apartados 2 y 3 se aplicarán a los productos listos para el consumo o reconstituidos conforme a las instrucciones del fabricante.

#### Artículo 11

Excepto en el caso previsto en el artículo 12, los preparados para lactantes y los preparados de continuación se venderán con las denominaciones respectivas siguientes:

- *en búlgaro*: «храни за кърмачета» y «преходни храни»,
- *en castellano*: «Preparado para lactantes» y «Preparado de continuación»,
- *en checo*: «počáteční kojenecká výživa» y «pokračovací kojenecká výživa»,
- *en danés*: «Modermælkserstatning» y «Tilskudsblending»,
- *en alemán*: «Säuglingsanfangsnahrung» y «Folgenahrung»,
- *en estonio*: «imiku piimasegu» y «jätkupiimasegu»,
- *en griego*: «Παρασκεύασμα για βρέφη» y «Παρασκεύασμα δεύτερης βρεφικής ηλικίας»,
- *en inglés*: «infant formula» y «follow-on formula»,
- *en francés*: «Préparation pour nourrissons» y «Préparation de suite»,
- *en italiano*: «Alimento per lattanti» y «Alimento di proseguimento»,
- *en letón*: «Mākslīgais maisījums zīdaiņiem» un «Mākslīgais papildu ēdināšanas maisījums zīdaiņiem»,
- *en lituano*: «mišinys kūdikiams iki papildomo maitinimo įvedimo» y «mišinys kūdikiams, įvedus papildomą maitinimą»,
- *en húngaro*: «anyatej-helyettesítő tápszer» y «anyatej-kiegészítő tápszer»,

- *en maltés*: «formula tat-trabi» y «formula tal-prosegwiment»,
- *en neerlandés*: «Volledige zuigelingenvoeding» y «Opvolgzuigelingenvoeding»,
- *en polaco*: «preparat do początkowe żywienia niemowląt» y «preparat do dalszego żywienia niemowląt»,
- *en portugués*: «Fórmula para lactentes» y «Fórmula de transição»,
- *en rumano*: «preparate pentru sugari» y «pentru copii de vârstă mică»,
- *en eslovaco*: «počiatočná dojčenská výživa» y «následná dojčenská výživa»,
- *en esloveno*: «začetna formula za dojenčke» y «nadaljevalna formula za dojenčke»,
- *en finés*: «Äidinmaidonkorvike» y «Vieroitusvalmiste»,
- *en sueco*: «Modersmjölk ersättning» y «Tillskottsnäring».
- *en francés*: «Lait pour nourrissons» y «Lait de suite»,
- *en italiano*: «Latte per lattanti» y «Latte di proseguimento»,
- *en letón*: «Mākslīgais piena maisījums zīdaiņiem» y «Mākslīgais papildu ēdināšanas piena maisījums zīdaiņiem»,
- *en lituano*: «pieno mišinys kūdikiams iki papildomo maitinimo įvedimo» y «pieno mišinys kūdikiams įvedus papildomą maitinimą»,
- *en húngaro*: «tejalapú anyatej-helyettesítő tápszer» y «tejalapú anyatej-kiegészítő tápszer»,
- *en maltés*: «halib tat-trabi» y «halib tal-prosegwiment»,
- *en neerlandés*: «Volledige zuigelingenvoeding op basis van melk» o «Zuigelingenmelk» y «Opvolgmelk»,
- *en polaco*: «mleko początkowe» y «mleko następne»,
- *en portugués*: «Leite para lactentes» y «Leite de transição»,

#### Artículo 12

Las denominaciones respectivas con que se venderán los preparados para lactantes y los preparados de continuación elaborados totalmente a partir de las proteínas procedentes de la leche de vaca serán las siguientes:

- *en búlgaro*: «млека за кърмачета» y «преходни млека»,
- *en castellano*: «Leche para lactantes» y «Leche de continuación»,
- *en checo*: «počáteční mléčná kojenecká výživa» y «pokračovací mléčná kojenecká výživa»,
- *en danés*: «Modermælkserstatning udelukkende baseret på mælk» y «Tilskudsblending udelukkende baseret på mælk»,
- *en alemán*: «Säuglingsmilchnahrung» y «Folgemilch»,
- *en estonio*: «Piimal põhinev imiku piimasegu» y «Piimal põhinev jätkupiimasegu»,
- *en griego*: «Γάλα για βρέφη» y «Γάλα δεύτερης βρεφικής ηλικίας»,
- *en inglés*: «Infant milk» y «follow-on milk»,
- *en rumano*: «lapte pentru sugari» y «lapte pentru copii de vârstă mică»,
- *en eslovaco*: «počiatočná dojčenská mliečna výživa» y «následná dojčenská mliečna výživa»,
- *en esloveno*: «začetno mleko za dojenčke» y «nadaljevalno mleko za dojenčke»,
- *en finés*: «Maitopohjainen äidinmaidonkorvike» y «Maitopohjainen vieroitusvalmiste»,
- *en sueco*: «Modersmjölk ersättning uteslutande baserad på mjölk» y «Tillskottsnäring uteslutande baserad på mjölk».

#### Artículo 13

1. En el etiquetado, además de las menciones previstas en el artículo 3, apartado 1, de la Directiva 2000/13/CE, deberán figurar los datos obligatorios siguientes:

- a) en el caso de preparados para lactantes, una indicación precisando que el producto es adecuado para la alimentación especial de lactantes desde el nacimiento, cuando no sean amamantados;

- b) en el caso de preparados de continuación, una indicación precisando que el producto es adecuado únicamente para la alimentación especial de niños mayores de seis meses, que solo debe ser parte de una dieta diversificada, que no debe utilizarse como sustitutivo de la leche materna durante los primeros seis meses de vida y que la decisión de iniciar la alimentación complementaria, incluida cualquier excepción respecto a los seis meses de edad, debe adoptarse únicamente siguiendo el consejo de personas independientes cualificadas en medicina, nutrición o farmacia o de otros profesionales encargados de la asistencia materna e infantil, basándose en las necesidades específicas de crecimiento y desarrollo del lactante en cuestión;
- c) en el caso de preparados para lactantes y preparados de continuación, el valor energético disponible, expresado en kJ y kcal, y el contenido en proteínas, hidratos de carbono y lípidos, expresados en forma numérica, por cada 100 ml del producto listo para el consumo;
- d) en el caso de preparados para lactantes y preparados de continuación, la cantidad media de cada sustancia mineral y de cada vitamina mencionadas en los anexos I y II, respectivamente, y, cuando proceda, de colina, inositol y carnitina, expresada en forma numérica por cada 100 ml del producto listo para el consumo;
- e) en el caso de preparados para lactantes y preparados de continuación, las instrucciones relativas a la preparación, el almacenamiento y la eliminación adecuados del producto y una advertencia sobre los riesgos para la salud que resultan de una preparación y un almacenamiento inadecuados.

2. En el etiquetado podrán figurar los siguientes datos:

- a) en el caso de los preparados para lactantes y los preparados de continuación, la cantidad media de los nutrientes mencionados en el anexo III si tal indicación no está regulada por lo dispuesto en el apartado 1, letra d), del presente artículo, expresada en forma numérica por cada 100 ml del producto listo para el consumo;
- b) en el caso de los preparados de continuación, además de la información numérica, información sobre las vitaminas y minerales incluidos en el anexo VII, expresados como porcentaje de los valores de referencia allí indicados, por cada 100 ml del producto listo para el consumo.

3. El etiquetado de los preparados para lactantes y los preparados de continuación deberá estar diseñado de forma que proporcione la información necesaria sobre el uso adecuado de los productos y no disuada de la lactancia materna.

Se prohibirá la utilización de los términos «humanizado», «maternizado», «adaptado» u otros similares.

4. El etiquetado de los preparados para lactantes deberá llevar también la siguiente indicación obligatoria precedida de las palabras «Aviso importante» u otras equivalentes:

- a) una indicación relativa a la superioridad de la lactancia materna;
- b) una indicación en la que se recomienda que el producto ha de utilizarse únicamente por consejo de personas independientes cualificadas en medicina, nutrición o farmacia o de otros profesionales encargados de la asistencia materna e infantil.

5. No se incluirán en el etiquetado de los preparados para lactantes imágenes de niños ni otras ilustraciones o textos que puedan idealizar el uso del producto. Sin embargo, la etiqueta podrá llevar representaciones gráficas que permitan una fácil identificación del producto e ilustren el método de preparación.

6. El etiquetado de los preparados para lactantes solo podrá llevar alegaciones nutricionales y de propiedades saludables en los casos enumerados en el anexo IV y con arreglo a las condiciones allí establecidas.

7. Los preparados para lactantes y los preparados de continuación se etiquetarán de tal manera que los consumidores puedan hacer una clara distinción entre ambos productos y que se evite cualquier riesgo de confusión entre preparados para lactantes y preparados de continuación.

8. Los requisitos, prohibiciones y restricciones contemplados en los apartados 3 a 7 serán aplicables también a:

- a) la presentación de los productos de que se trate, en particular, su forma, apariencia y envase, el material de envase utilizado, la forma en que están dispuestos y el medio en el que se exponen;
- b) la publicidad.

#### Artículo 14

1. La publicidad de los preparados para lactantes se limitará a las publicaciones especializadas en la asistencia infantil y a las publicaciones científicas. Los Estados miembros podrán además restringir o prohibir tal publicidad. Los anuncios de preparados para lactantes se ajustarán a las condiciones establecidas en el artículo 13, apartados 3 a 7, y artículo 13, apartado 8, letra b), y contendrán únicamente información de carácter científico y objetivo. Tal información no deberá insinuar ni hacer creer que la alimentación con biberón es equivalente o superior a la lactancia materna.

2. Estarán prohibidos la publicidad en los lugares de venta, la distribución de muestras o el recurso a cualquier otro medio de propaganda dirigido a fomentar las ventas de los preparados para lactantes directamente al consumidor en los establecimientos minoristas como, por ejemplo, exhibiciones especiales, cupones de descuento, primas, ventas especiales, ventas de promoción y ventas acopladas.

3. Los fabricantes o distribuidores de preparados para lactantes no podrán proporcionar al público en general ni a las mujeres embarazadas, madres o miembros de sus familias, productos gratis o a bajo precio, muestras ni ningún otro obsequio de promoción, ya sea directa o indirectamente a través de los servicios sanitarios o del personal sanitario.

#### Artículo 15

1. Los Estados miembros velarán por que se suministre información objetiva y coherente sobre la alimentación de lactantes y niños de corta edad destinada a las familias y personas relacionadas con la nutrición de lactantes y niños de corta edad, en materia de planificación, suministro, concepción y difusión de información, así como de control.

2. Los Estados miembros velarán por que el material informativo y educativo, ya sea escrito o audiovisual, relativo a la alimentación de lactantes y destinado a las mujeres embarazadas y a las madres de lactantes y de niños de corta edad, incluya informaciones claras sobre todos los puntos siguientes:

- a) ventajas y superioridad de la lactancia materna;
- b) nutrición materna y forma de prepararse a la lactancia y prosecución de la misma;
- c) posible efecto negativo sobre la lactancia materna de la alimentación parcial con biberón;
- d) dificultad de rectificar la decisión de no amamantar;
- e) en su caso, el empleo adecuado de los preparados para lactantes.

Cuando dichos materiales contengan informaciones sobre el empleo de preparados para lactantes, incluirán las consecuencias sociales y financieras de su empleo, los riesgos para la salud derivados de alimentos inadecuados o de métodos de alimentación y, en particular, los riesgos para la salud derivados del inadecuado empleo de los preparados para lactantes. Tales materiales no utilizarán ninguna imagen que pueda idealizar el empleo de los preparados para lactantes.

3. Los Estados miembros velarán por que las donaciones de equipos o material informativo o educativo por parte de fabricantes o distribuidores solo se efectúen a instancia y previa

aprobación escrita de la autoridad nacional competente, o con arreglo a las orientaciones señaladas, a tal fin, por los poderes públicos. Tales equipos o materiales podrán llevar el nombre o el distintivo de la empresa donante, pero no deberán hacer referencia a ninguna marca específica de preparado para lactantes y se distribuirán únicamente a través de los servicios sanitarios.

4. Los Estados miembros velarán por que las donaciones o las ventas a bajo precio de partidas de preparados para lactantes a instituciones u organizaciones, para su utilización en las instituciones o para su distribución fuera de ellas, solo se destine o distribuya a lactantes que han de ser alimentados con preparados para lactantes y únicamente durante el período que dichos lactantes requieran.

#### Artículo 16

En el anexo de la Directiva 1999/21/CE, la fila relativa al manganeso de la segunda parte del cuadro 1, sobre minerales, se sustituye por el texto siguiente:

«Manganeso (µg)	0,25	25	1	100».
-----------------	------	----	---	-------

#### Artículo 17

Los nuevos requisitos establecidos en el artículo 7, apartados 1 y 2, de la presente Directiva no se aplicarán obligatoriamente a los alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales elaborados específicamente para lactantes, tal como se contemplan en el punto 4 del anexo de la Directiva 1999/21/CE, hasta el 1 de enero de 2012.

#### Artículo 18

1. Los Estados miembros adoptarán y publicarán, a más tardar, el 31 de diciembre de 2007, las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a lo establecido en los artículos 2 y 3, 5 a 17 y en los anexos I a VII. Comunicarán inmediatamente a la Comisión el texto de dichas disposiciones, así como una tabla de correspondencias entre las mismas y la presente Directiva.

Aplicarán dichas disposiciones de tal forma que:

- permitan el comercio de productos que sean conformes a la presente Directiva a más tardar el 1 de enero de 2008,
- sin perjuicio de lo dispuesto en el artículo 17, se prohíba, con efectos a partir del 31 de diciembre de 2009, el comercio de productos que no sean conformes a la presente Directiva.



Cuando los Estados miembros adopten dichas disposiciones, estas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. También incluirán una declaración según la cual las referencias en las leyes, reglamentos y disposiciones administrativas a la Directiva derogada deberán entenderse hechas a la presente Directiva. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia y la manera en que se formule dicha declaración.

2. Los Estados miembros comunicarán a la Comisión el texto de las disposiciones básicas de Derecho interno que adopten en el ámbito regulado por la presente Directiva.

#### *Artículo 19*

La Directiva 91/321/CEE, a tenor de su modificación por las Directivas indicadas en el anexo X, parte A, queda derogada con efectos a partir del 1 de enero de 2008, sin perjuicio de las obligaciones de los Estados miembros en cuanto a los plazos de transposición de las Directivas al Derecho nacional de acuerdo con lo establecido en el anexo X, parte B.

Las referencias a la Directiva derogada se entenderán hechas a la presente Directiva y se leerán con arreglo a la tabla de correspondencias que figura en el anexo XI.

#### *Artículo 20*

La presente Directiva entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

#### *Artículo 21*

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 22 de diciembre de 2006.

*Por la Comisión*  
Markos KYPRIANOU  
*Miembro de la Comisión*

## ANEXO I

**COMPOSICIÓN BÁSICA DE LOS PREPARADOS PARA LACTANTES CUANDO SE RECONSTITUYEN DE ACUERDO CON LAS INSTRUCCIONES DEL FABRICANTE**

Los valores establecidos en el presente anexo se refieren al producto final listo para el consumo, comercializado tal cual o reconstituido según las instrucciones del fabricante.

## 1. ENERGÍA

Mínimo	Máximo
250 kJ/100 ml (60 kcal/100 ml)	295 kJ/100 ml (70 kcal/100 ml)

## 2. PROTEÍNAS

(Contenido en proteínas = contenido en nitrógeno × 6,25)

## 2.1. Preparados para lactantes elaborados a partir de las proteínas obtenidas de la leche de vaca

Mínimo <sup>(1)</sup>	Máximo
0,45 g/100 kJ (1,8 g/100 kcal)	0,7 g/100 kJ (3 g/100 kcal)

<sup>(1)</sup> Los preparados para lactantes elaborados a partir de proteínas obtenidas de la leche de vaca con un contenido proteínico comprendido entre el mínimo y 0,5 g/100 kJ (2 g/100 kcal) serán conformes a lo dispuesto en el artículo 7, apartado 1.

Para un valor energético equivalente, los preparados para lactantes deberán contener una cantidad disponible de cada uno de los aminoácidos indispensables y condicionalmente indispensables igual por lo menos a la contenida en la proteína de referencia (leche materna, tal y como se define en el anexo V). No obstante, a efectos de cálculo, podrán sumarse las concentraciones de metionina y de cistina si la relación metionina:cistina no es superior a 2, así como las concentraciones de fenilalanina y tirosina, si la relación tirosina:fenilalanina no es superior a 2. La relación metionina:cistina puede ser superior a 2, pero no superior a 3, a condición de que se haya demostrado la adecuación del preparado para la alimentación especial de los lactantes mediante estudios pertinentes, realizados según instrucciones especializadas generalmente admitidas sobre la elaboración y realización de este tipo de estudios.

## 2.2. Preparados para lactantes elaborados a partir de hidrolizados de proteínas

Mínimo <sup>(1)</sup>	Máximo
0,45 g/100 kJ (1,8 g/100 kcal)	0,7 g/100 kJ (3 g/100 kcal)

<sup>(1)</sup> Los preparados para lactantes elaborados a partir de hidrolizados de proteínas con un contenido proteínico comprendido entre el mínimo y 0,56 g/100 kJ (2,25 g/100 kcal) serán conformes a lo dispuesto en el artículo 7, apartado 1.

Para un valor energético equivalente, los preparados deberán contener una cantidad disponible de cada uno de los aminoácidos indispensables y condicionalmente indispensables igual por lo menos a la contenida en la proteína de referencia (leche materna, tal y como se define en el anexo V). No obstante, a efectos de cálculo, podrán sumarse las concentraciones de metionina y de cistina si la relación metionina:cistina no es superior a 2, así como las concentraciones de fenilalanina y tirosina, si la relación tirosina:fenilalanina no es superior a 2. La relación metionina:cistina puede ser superior a 2, pero no superior a 3, a condición de que se haya demostrado la adecuación del preparado para la alimentación especial de los lactantes mediante estudios pertinentes, realizados según instrucciones especializadas generalmente admitidas sobre la elaboración y realización de este tipo de estudios.

El contenido en L-carnitina deberá ser por lo menos igual a 0,3 mg/100 kJ (1,2 mg/100 kcal).

2.3. **Preparados para lactantes elaborados a partir de aislados de proteínas de soja únicamente o de una mezcla con proteínas de la leche de vaca**

Mínimo	Máximo
0,56 g/100 kJ (2,25 g/100 kcal)	0,7 g/100 kJ (3 g/100 kcal)

Se utilizarán únicamente aislados de proteínas de soja en la elaboración de estos preparados para lactantes.

Para un valor energético equivalente, el preparado para lactantes contendrá una cantidad disponible de cada aminoácido indispensable y condicionalmente indispensable equivalente por lo menos a la contenida en la proteína de referencia (leche materna, tal y como se define en el anexo V). No obstante, a efectos de cálculo, podrán sumarse las concentraciones de metionina y de cistina si la relación metionina:cistina no es superior a 2, así como las concentraciones de fenilalanina y tirosina, si la relación tirosina:fenilalanina no es superior a 2. La relación metionina:cistina puede ser superior a 2, pero no superior a 3, a condición de que se haya demostrado la adecuación del preparado para la alimentación especial de los lactantes mediante estudios pertinentes, realizados según instrucciones especializadas generalmente admitidas sobre la elaboración y realización de este tipo de estudios.

El contenido en L-carnitina será por lo menos equivalente a 0,3 mg/100 kJ (1,2 mg/100 kcal).

2.4. En todos los casos, solo podrán añadirse aminoácidos a los preparados para lactantes para mejorar el valor nutritivo de las proteínas y, únicamente, en la proporción necesaria para ese fin.

3. TAURINA

Si se añade taurina a preparados para lactantes, la cantidad añadida no superará 2,9 mg/100 kJ (12 mg/100 kcal).

4. COLINA

Mínimo	Máximo
1,7 mg/100 kJ (7 mg/100 kcal)	12 mg/100 kJ (50 mg/100 kcal)

5. LÍPIDOS

Mínimo	Máximo
1,05 g/100 kJ (4,4 g/100 kcal)	1,4 g/100 kJ (6,0 g/100 kcal)

5.1. Queda prohibida la utilización de las siguientes sustancias:

— aceite de sésamo,

— aceite de algodón.

5.2. **Ácido láurico y ácido mirístico**

Mínimo	Máximo
—	por separado o en conjunto: 20 % del contenido total en materia grasa

5.3. El contenido en ácidos grasos trans no será superior al 3 % del contenido total en materia grasa.

5.4. El contenido en ácido erúico no será superior al 1 % del contenido total en materia grasa.

5.5. **Ácido linoleico (en forma de glicéridos = linoleatos)**

Mínimo	Máximo
70 mg/100 kJ (300 mg/100 kcal)	285 mg/100 kJ (1 200 mg/100 kcal)

5.6. El contenido en ácido alfa-linolénico no será inferior a 12 mg/100 kJ (50 mg/100 kcal).

La proporción entre los ácidos linoleico y alfa-linolénico no será inferior a 5 ni superior a 15.

5.7. Podrán añadirse ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (20 y 22 átomos de carbono) (PCL). En tal caso, su contenido no será superior a:

— 1 % del contenido total en materia grasa para los PCL n-3, ni

— 2 % del contenido total en materia grasa para los PCL n-6 [1 % del contenido total en materia grasa para el ácido araquidónico (20:4 n-6)].

El contenido en ácido eicosapentanoico (20:5 n-3) no será superior al contenido en ácido docosahexanoico (22:6 n-3).

El contenido en ácido docosahexanoico (22:6 n-3) no excederá del de los PCL n-6.

6. FOSFOLÍPIDOS

La cantidad de fosfolípidos en los preparados para lactantes no excederá de 2 g/l.

7. INOSITOL

Mínimo	Máximo
1 mg/100 kJ (4 mg/100 kcal)	10 mg/100 kJ (40 mg/100 kcal)

8. CARBOHIDRATOS

Mínimo	Máximo
2,2 g/100 kJ (9 g/100 kcal)	3,4 g/100 kJ (14 g/100 kcal)

8.1. Solo podrán utilizarse los carbohidratos siguientes:

- lactosa,
- maltosa,
- sacarosa,
- glucosa,
- malto-dextrina,

- jarabe de glucosa o jarabe de glucosa deshidratado,
  - almidón pretostado
  - almidón gelatinizado
- } originariamente sin gluten

### 8.2. Lactosa

Mínimo	Máximo
1,1 g/100 kJ (4,5 g/100 kcal)	— —

Esta disposición no será aplicable a los preparados para lactantes en los que los aislados de proteínas de soja supongan más del 50 % del total del contenido en proteínas.

### 8.3. Sacarosa

Solo se podrá añadir sacarosa a los preparados para lactantes fabricados a partir de hidrolizados de proteínas. Si se añade, su contenido no excederá del 20 % del contenido total de carbohidratos.

### 8.4. Glucosa

Solo se podrá añadir glucosa a los preparados para lactantes fabricados a partir de hidrolizados de proteínas. Si se añade, su contenido no excederá de 0,5 g/100vkJ (2 g/100 kcal).

### 8.5. Almidón pretostado o almidón gelatinizado

Mínimo	Máximo
—	2 g/100 ml y 30 % del contenido total de carbohidratos

## 9. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS Y GALACTOOLIGOSACÁRIDOS

Podrán añadirse fructooligosacáridos y galactooligosacáridos a los preparados para lactantes. En ese caso, su contenido no será superior a 0,8 g/100 ml según una combinación de 90 % de oligogalactosil lactosa y 10 % de oligofructosil sacarosa de elevado peso molecular.

Podrán utilizarse diferentes combinaciones y niveles máximos de fructooligosacáridos y galactooligosacáridos, de conformidad con el artículo 5.

## 10. SUSTANCIAS MINERALES

### 10.1. Preparados para lactantes elaborados a partir de las proteínas obtenidas de la leche de vaca o de hidrolizados de proteínas

	Por 100 kJ		Por 100 kcal	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Sodio (mg)	5	14	20	60
Potasio (mg)	15	38	60	160
Cloro (mg)	12	38	50	160
Calcio (mg)	12	33	50	140
Fósforo (mg)	6	22	25	90
Magnesio (mg)	1,2	3,6	5	15
Hierro (mg)	0,07	0,3	0,3	1,3
Cinc (mg)	0,12	0,36	0,5	1,5
Cobre (µg)	8,4	25	35	100

	Por 100 kJ		Por 100 kcal	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Yodo ( $\mu\text{g}$ )	2,5	12	10	50
Selenio ( $\mu\text{g}$ )	0,25	2,2	1	9
Manganeso ( $\mu\text{g}$ )	0,25	25	1	100
Flúor ( $\mu\text{g}$ )	—	25	—	100

La relación calcio:fósforo no será inferior a 1 ni superior a 2.

#### 10.2. Preparados para lactantes elaborados a partir de aislados de proteínas de soja solos o mezclados con las proteínas de la leche de vaca

Serán aplicables todos los requisitos del punto 10.1, excepto para el hierro y el fósforo, en cuyos casos se aplicarán los siguientes:

	Por 100 kJ		Por 100 kcal	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Hierro (mg)	0,12	0,5	0,45	2
Fósforo (mg)	7,5	25	30	100

#### 11. VITAMINAS

	Por 100 kJ		Por 100 kcal	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Vitamina A ( $\mu\text{g-RE}$ ) <sup>(1)</sup>	14	43	60	180
Vitamina D ( $\mu\text{g}$ ) <sup>(2)</sup>	0,25	0,65	1	2,5
Tiamina ( $\mu\text{g}$ )	14	72	60	300
Riboflavina ( $\mu\text{g}$ )	19	95	80	400
Niacina ( $\mu\text{g}$ ) <sup>(3)</sup>	72	375	300	1 500
Ácido pantoténico ( $\mu\text{g}$ )	95	475	400	2 000
Vitamina B <sub>6</sub> ( $\mu\text{g}$ )	9	42	35	175
Biotina ( $\mu\text{g}$ )	0,4	1,8	1,5	7,5
Acido fólico ( $\mu\text{g}$ )	2,5	12	10	50
Vitamina B <sub>12</sub> ( $\mu\text{g}$ )	0,025	0,12	0,1	0,5
Vitamina C (mg)	2,5	7,5	10	30
Vitamina K ( $\mu\text{g}$ )	1	6	4	25
Vitamina E (mg $\alpha\text{-ET}$ ) <sup>(4)</sup>	0,5/g de ácidos grasos poliinsaturados expresados como ácido linoleico, corregido en función de los dobles enlaces <sup>(5)</sup> , pero en ningún caso inferior a 0,1 mg por 100 kJ disponibles	1,2	0,5/g de ácidos grasos poliinsaturados expresados como ácido linoleico, corregido en función de los dobles enlaces <sup>(5)</sup> , pero en ningún caso inferior a 0,5 mg por 100 kcal disponibles	5

<sup>(1)</sup> ER = todo equivalente de retinol trans.

<sup>(2)</sup> En forma de colecalférol, del que 10  $\mu\text{g}$  = 400 i.u. de vitamina D.

<sup>(3)</sup> Niacina preformada.

<sup>(4)</sup>  $\alpha\text{-ET}$  = equivalente de d- $\alpha$ -tocoferol.

<sup>(5)</sup> 0,5 mg de  $\alpha\text{-ET}/1$  g de ácido linoleico (18:2 n-6); 0,75 mg de  $\alpha\text{-ET}/1$  g de  $\alpha$ -ácido linoléico (18:3 n-3); 1,0 mg de  $\alpha\text{-ET}/1$  g de ácido araquidónico (20:4 n-6); 1,25 mg de  $\alpha\text{-ET}/1$  g de ácido eicosapentanoico (20:5 n-3); 1,5 mg de  $\alpha\text{-ET}/1$  g de ácido docosahexanoico (22:6 n-3).

## 12. NUCLEÓTIDOS

Se podrán añadir los nucleótidos siguientes:

	Máximo <sup>(1)</sup>	
	(mg/100 kJ)	(mg/100 kcal)
citidina 5'- monofosfato	0,60	2,50
uridina 5'- monofosfato	0,42	1,75
adenosina 5'- monofosfato	0,36	1,50
guanosina 5'- monofosfato	0,12	0,50
inosina 5'- monofosfato	0,24	1,00

<sup>(1)</sup> La concentración total de nucleótidos no será superior a 1,2 mg/100 kJ (5 mg/100 kcal).

## ANEXO II

**COMPOSICIÓN BÁSICA DE LOS PREPARADOS DE CONTINUACIÓN CUANDO SE RECONSTITUYEN SEGÚN LAS INSTRUCCIONES DEL FABRICANTE**

Los valores establecidos en el presente anexo se refieren al producto final listo para el consumo, comercializado tal cual o reconstituido según las instrucciones del fabricante.

## 1. ENERGÍA

Mínimo	Máximo
250 kJ/100 ml (60 kcal/100 ml)	295 kJ/100 ml (70 kcal/100 ml)

## 2. PROTEÍNAS

(Contenido en proteínas = contenido en nitrógeno × 6,25).

## 2.1 Preparados elaborados a partir de proteínas de la leche de vaca

Mínimo	Máximo
0,45 g/100 kJ (1,8 g/100 kcal)	0,8 g/100 kJ (3,5 g/100 kcal)

Para un valor energético igual, los preparados de continuación deberán contener una cantidad disponible de cada uno de los aminoácidos indispensables y condicionalmente indispensables equivalente por lo menos a la contenida en la proteína de referencia (leche materna, tal y como se define en el anexo V). No obstante, a efectos de cálculo, podrán sumarse las concentraciones de metionina y de cistina si la relación metionina:cistina no es superior a 3, así como las concentraciones de fenilalanina y tirosina, si la relación tirosina:fenilalanina no es superior a 2.

## 2.2 Preparados elaborados a partir de hidrolizados de proteínas

Mínimo	Máximo
0,56 g/100 kJ (2,25 g/100 kcal)	0,8 g/100 kJ (3,5 g/100 kcal)

Para un valor energético igual, los preparados de continuación deberán contener una cantidad disponible de cada uno de los aminoácidos indispensables y condicionalmente indispensables equivalente por lo menos a la contenida en la proteína de referencia (leche materna, tal y como se define en el anexo V). No obstante, a efectos de cálculo, podrán sumarse las concentraciones de metionina y de cistina si la relación metionina:cistina no es superior a 3, así como las concentraciones de fenilalanina y tirosina, si la relación tirosina:fenilalanina no es superior a 2.

## 2.3 Preparados elaborados a partir de aislados de proteínas de soja solos o mezclados con proteínas de la leche de vaca

Mínimo	Máximo
0,56 g/100 kJ (2,25 g/100 kcal)	0,8 g/100 kJ (3,5 g/100 kcal)



Se utilizarán únicamente aislados de proteínas de soja en la elaboración de estos preparados.

Para un valor energético igual, los preparados deberán contener una cantidad disponible de cada uno de los aminoácidos indispensables y condicionalmente indispensables equivalente por lo menos a la contenida en la proteína de referencia (leche materna, tal y como se define en el anexo V). No obstante, a efectos de cálculo, podrán sumarse las concentraciones de metionina y de cistina si la relación metionina:cistina no es superior a 3, así como las concentraciones de fenilalanina y tirosina, si la relación tirosina:fenilalanina no es superior a 2.

- 2.4 En cualquier caso, solo podrán añadirse aminoácidos a los preparados de continuación con el fin de aumentar el valor nutritivo de las proteínas y siempre en la proporción necesaria para tal fin.

### 3. TAURINA

Si se añade taurina a preparados para lactantes, la cantidad añadida no superará 2,9 mg/100 kJ (12 mg/100 kcal).

### 4. LÍPIDOS

Mínimo	Máximo
0,96 g/100 kJ (4,0 g/100 kcal)	1,4 g/100 kJ (6,0 g/100 kcal)

- 4.1. Queda prohibida la utilización de las siguientes sustancias:

— aceite de sésamo,

— aceite de algodón.

### 4.2. Ácido láurico y ácido mirístico

Mínimo	Máximo
—	por separado o en conjunto: 20 % del contenido total en materia grasa

- 4.3. El contenido en ácidos grasos trans no será superior al 3 % del contenido total en materia grasa.

- 4.4. El contenido en ácido erúico no será superior al 1 % del contenido total en materia grasa.

### 4.5. Ácido linoleico (en forma de glicéridos = linoleatos)

Mínimo	Máximo
70 mg/100 kJ (300 mg/100 kcal)	285 mg/100 kJ (1 200 mg/100 kcal)

- 4.6. El contenido en ácido alfa-linolénico no será inferior a 12 mg/100 kJ (50 mg/100 kcal).

La proporción entre los ácidos linoleico y alfa-linolénico no será inferior a 5 ni superior a 15.

- 4.7 Podrán añadirse ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (20 y 22 átomos de carbono) (PCL). En ese caso, su contenido no será superior:

— al 1 % del contenido total en materia grasa para los PCL n-3, ni

— al 2 % del contenido total en materia grasa para los PCL n-6 [1 % del contenido total en materia grasa para el ácido araquidónico (20:4 n-6)].

El contenido en ácido eicosapentanoico (20:5 n-3) no será superior al contenido en ácido docosahexanoico (22:6 n-3).

El contenido en ácido docosahexanoico (22:6 n-3) no excederá del de los PCL n-6.

## 5. FOSFOLÍPIDOS

La cantidad de fosfolípidos en los preparados de continuación no excederá de 2 g/l.

## 6. CARBOHIDRATOS

Mínimo	Máximo
2,2 g/100 kJ (9 g/100 kcal)	3,4 g/100 kJ (14 g/100 kcal)

- 6.1 Queda prohibida la utilización de ingredientes que contengan gluten.

## 6.2 Lactosa

Mínimo	Máximo
1,1 g/100 kJ (4,5 g/100 kcal)	—

Esta disposición no será aplicable a los preparados de continuación en los que las proteínas de soja supongan más del 50 % del contenido de proteínas.

## 6.3 Sacarosa, fructosa, miel

Mínimo	Máximo
—	por separado o en conjunto: 20 % del contenido total de carbohidratos

Se tratará la miel para destruir las esporas *Clostridium botulinum*.

## 6.4 Glucosa

Solo se podrá añadir glucosa a los preparados de continuación a partir de hidrolizados de proteínas. Si se añade, su contenido no excederá de 0,5 g/100 kJ (2 g/100 kcal).

## 7. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS Y GALACTOOLIGOSACÁRIDOS

Podrán añadirse fructooligosacáridos y galactooligosacáridos a los preparados de continuación. En ese caso, su contenido no será superior a 0,8 g/100 ml según una combinación de 90 % de oligogalactosil lactosa y 10 % de oligofructosil sacarosa de elevado peso molecular.

Podrán utilizarse diferentes combinaciones y niveles máximos de fructooligosacáridos y galactooligosacáridos, de conformidad con el artículo 6.

## 8. SUSTANCIAS MINERALES

8.1 **Preparados de continuación elaborados a partir de proteínas de la leche de vaca o de hidrolizados de proteínas**

	Por 100 kJ		Por 100 kcal	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Sodio (mg)	5	14	20	60
Potasio (mg)	15	38	60	160
Cloro (mg)	12	38	50	160
Calcio (mg)	12	33	50	140
Fósforo (mg)	6	22	25	90
Magnesio (mg)	1,2	3,6	5	15
Hierro (mg)	0,14	0,5	0,6	2
Cinc (mg)	0,12	0,36	0,5	1,5
Cobre (µg)	8,4	25	35	100
Yodo (µg)	2,5	12	10	50
Selenio (µg)	0,25	2,2	1	9
Manganeso (µg)	0,25	25	1	100
Flúor (µg)	—	25	—	100

La relación calcio:fósforo en los preparados de continuación no será inferior a 1 ni superior a 2.

8.2 **Preparados de continuación elaborados a partir de aislados de proteínas de soja solos o mezclados con proteínas de la leche de vaca**

Se aplicarán todos los requisitos del punto 8.1 salvo para el hierro y el fósforo, en cuyos casos serán los siguientes:

	Por 100 kJ		Por 100 kcal	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Hierro (mg)	0,22	0,65	0,9	2,5
Fósforo (mg)	7,5	25	30	100

## 9. VITAMINAS

	Por 100 kJ		Por 100 kcal	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Vitamina A ( $\mu\text{g-ER}$ ) <sup>(1)</sup>	14	43	60	180
Vitamina D ( $\mu\text{g}$ ) <sup>(2)</sup>	0,25	0,75	1	3
Tiamina ( $\mu\text{g}$ )	14	72	60	300
Riboflavina ( $\mu\text{g}$ )	19	95	80	400
Niacina ( $\mu\text{g}$ ) <sup>(3)</sup>	72	375	300	1 500
Ácido pantoténico ( $\mu\text{g}$ )	95	475	400	2 000
Vitamina B <sub>6</sub> ( $\mu\text{g}$ )	9	42	35	175
Biotina ( $\mu\text{g}$ )	0,4	1,8	1,5	7,5
Acido fólico ( $\mu\text{g}$ )	2,5	12	10	50
Vitamina B <sub>12</sub> ( $\mu\text{g}$ )	0,025	0,12	0,1	0,5
Vitamina C (mg)	2,5	7,5	10	30
Vitamina K ( $\mu\text{g}$ )	1	6	4	25
Vitamina E (mg $\alpha\text{-TE}$ ) <sup>(4)</sup>	0,5/g de ácidos grasos poliinsaturados expresados como ácido linoleico, corregido en función de los dobles enlaces <sup>(5)</sup> , pero en ningún caso inferior a 0,1 mg por 100 kJ disponibles	1,2	0,5/g de ácidos grasos poliinsaturados expresados como ácido linoleico, corregido en función de los dobles enlaces <sup>(5)</sup> , pero en ningún caso inferior a 0,5 mg por 100 kcal disponibles	5

<sup>(1)</sup> ER = todo equivalente de retinol trans.

<sup>(2)</sup> En forma de colecalciferol, del que 10 g = 400 i.u. de vitamina D.

<sup>(3)</sup> Niacina preformada.

<sup>(4)</sup>  $\alpha\text{-ET}$  = equivalente de d- $\alpha$ -tocoferol.

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

## 10. NUCLEÓTIDOS

Se podrán añadir los siguientes nucleótidos:

	Máximo <sup>(1)</sup>	
	(mg/100 kJ)	(mg/100 kcal)
citidina 5'-monofosfato	0,60	2,50
uridina 5'-monofosfato	0,42	1,75
adenosina 5'-monofosfato	0,36	1,50
guanosina 5'-monofosfato	0,12	0,50
inosina 5'-monofosfato	0,24	1,00

<sup>(1)</sup> La concentración total de nucleótidos no será superior a 1,2 mg/100 kJ (5 mg/100 kcal).

## ANEXO III

## SUSTANCIAS NUTRITIVAS

## 1. Vitaminas

Vitamina	Fórmula de la vitamina
Vitamina A	Acetato de retinol
	Palmitato de retinol
	Retinol
Vitamina D	Vitamina D <sub>2</sub> (ergocalciferol)
	Vitamina D <sub>3</sub> (colecalfiferol)
Vitamina B <sub>1</sub>	Clorhidrato de tiamina
	Mononitrato de tiamina
Vitamina B <sub>2</sub>	Riboflavina
	Riboflavina-5'-fosfato sódico
Niacina	Nicotinamida
	Ácido nicotínico
Vitamina B <sub>6</sub>	Clorhidrato de piridoxina
	Piridoxina -5'-fosfato
Folato	Ácido fólico
Ácido pantoténico	D-pantotenato cálcico
	D-pantotenato sódico
	Dexpantenol
Vitamina B <sub>12</sub>	Cianocobalamina
	Hidroxocobalamina
Biotina	D-biotina
Vitamina C	L-ácido ascórbico
	L-ascorbato sódico
	L-ascorbato cálcico
	6-palmitil-L-ácido ascórbico (palmitato de ascorbilo)
	Ascorbato potásico
Vitamina E	D-alfa tocoferol
	DL-alfa tocoferol
	D-alfa acetato de tocoferol
	DL-alfa acetato de tocoferol
Vitamina K	Filoquinona (Fitomenadiona)

## 2. Sustancias minerales

Sustancias minerales	Sales permitidas
Calcio (Ca)	Carbonato de calcio
	Cloruro de calcio
	Sales cálcicas de ácido cítrico
	Gluconato de calcio
	Glicerofosfato de calcio
	Lactato de calcio
	Sales cálcicas de ácido ortofosfórico
	Hidróxido de calcio
Magnesio (Mg)	Carbonato de magnesio
	Cloruro de magnesio
	Óxido de magnesio
	Sales magnésicas de ácido ortofosfórico
	Sulfato de magnesio
	Gluconato de magnesio
	Hidróxido de magnesio
	Sales magnésicas de ácido cítrico
Hierro (Fe)	Citrato ferroso
	Gluconato ferroso
	Lactato ferroso
	Sulfato ferroso
	Citrato amónico férrico
	Fumarato ferroso
	Difosfato férrico (Pirofosfato férrico)
	Bisglicinato ferroso
Cobre (Cu)	Citrato cúprico
	Gluconato cúprico
	Sulfato cúprico
	Complejo cobre-lisina
	Carbonato cúprico
Yodo (I)	Yoduro de potasio
	Yoduro de sodio
	Yodato de potasio
Cinc (Zn)	Acetato de cinc
	Cloruro de cinc
	Lactato de cinc
	Sulfato de cinc
	Citrato de cinc
	Gluconato de cinc
	Óxido de cinc

Sustancias minerales	Sales permitidas
Manganeso (Mn)	Carbonato de manganeso
	Cloruro de manganeso
	Citrato de manganeso
	Sulfato de manganeso
	Gluconato de manganeso
Sodio (Na)	Bicarbonato de sodio
	Cloruro de sodio
	Citrato de sodio
	Gluconato de sodio
	Carbonato de sodio
	Lactato de sodio
	Sales sódicas de ácido ortofosfórico
Hidróxido de sodio	
Potasio (K)	Bicarbonato de potasio
	Carbonato de potasio
	Cloruro de potasio
	Sales potásicas de ácido cítrico
	Gluconato de potasio
	Lactato de potasio
	Sales potásicas de ácido ortofosfórico
Hidróxido de potasio	
Selenio (Se)	Seleniato de sodio
	Selenito de sodio

### 3. Aminoácidos y otros compuestos nitrogenados

L-cistina y su clorhidrato  
 L-histidina y su clorhidrato  
 L-isoleucina y su clorhidrato  
 L-leucina y su clorhidrato  
 L-lisina y su clorhidrato  
 L-cisteína y su clorhidrato  
 L-metionina  
 L-fenilalanina  
 L-treonina  
 L-triptófano  
 L-tirosina  
 L-valina  
 L-carnitina y su clorhidrato  
 L-carnitina-L-tartrato  
 Taurina

citidina 5'-monofosfato y su sal sódica  
uridina 5'-monofosfato y su sal sódica  
adenosina 5'-monofosfato y su sal sódica  
guanosina 5'-monofosfato y su sal sódica  
inosina 5'-monofosfato y su sal sódica

---

#### 4. Otras sustancias nutricionales

---

Colina  
Cloruro de colina  
Citrato de colina  
Bitartrato de colina  
Inositol

---



## ANEXO IV

**ALEGACIONES NUTRICIONALES Y DE PROPIEDADES SALUDABLES DE LOS PREPARADOS PARA LACTANTES Y CONDICIONES DE GARANTÍA DE LA ALEGACIÓN CORRESPONDIENTE**

## 1. ALEGACIONES NUTRICIONALES

Alegación nutricional relativa a	Condiciones que garantizan la alegación nutricional
1.1. Únicamente lactosa	La lactosa será el único carbohidrato presente.
1.2. Ausencia de lactosa	El contenido en lactosa no superará 2,5 mg/100 kJ (10 mg/100 kcal).
1.3. PCL añadidos o una alegación nutricional equivalente relacionada con la adición de ácido docosahexanoico	El contenido en ácido docosahexanoico no será inferior a un 0,2 % del contenido total en ácidos grasos.
1.4. Alegaciones nutricionales sobre la adición de los ingredientes opcionales siguientes:	} Añadidos voluntariamente en una medida apropiada para el uso particular previsto por parte de los lactantes y de conformidad con las condiciones establecidas en el anexo I.
1.4.1. Taurina	
1.4.2. Fructooligosacáridos y galactooligosacáridos	
1.4.3. Nucleótidos	

## 2. ALEGACIONES DE PROPIEDADES SALUDABLES (INCLUIDAS LAS ALEGACIONES DE REDUCCIÓN DE RIESGO DE ENFERMEDAD)

Alegación de propiedades saludables	Condiciones que garantizan la alegación
2.1. Reducción del riesgo de alergia a las proteínas de la leche. Esta alegación de propiedades saludables puede ir acompañada de términos que hagan referencia a una propiedad alergénica reducida o anti-génica reducida.	<p>a) debe disponerse de datos objetivos y verificados científicamente como prueba de las propiedades alegadas;</p> <p>b) los preparados para lactantes cumplirán lo establecido en el punto 2.2 del anexo I y la cantidad de proteína inmunorreactiva medida con métodos generalmente aceptados es inferior al 1 % de las sustancias nitrogenadas del preparado;</p> <p>c) se indica en la etiqueta que el producto no debe ser consumido por lactantes alérgicos a las proteínas intactas de que procede, salvo que se compruebe mediante ensayos clínicos generalmente aceptados que el preparado para lactantes es tolerado por más del 90 % de lactantes (intervalo de confianza del 95 %) hipersensibles a las proteínas de que procede el hidrolizado;</p> <p>d) los preparados para lactantes administrados oralmente no deben inducir sensibilización en animales frente a las proteínas intactas de que procede el preparado para lactantes.</p>

## ANEXO V

**AMINOÁCIDOS INDISPENSABLES Y CONDICIONALMENTE INDISPENSABLES DE LA LECHE MATERNA**

A efectos de la presente Directiva, los aminoácidos indispensables y condicionalmente indispensables de la leche materna, expresados en miligramos por 100 kJ y 100 kcal, son los siguientes:

	Por 100 kJ <sup>(1)</sup>	Por 100 kcal
Cistina	9	38
Histidina	10	40
Isoleucina	22	90
Leucina	40	166
Lisina	27	113
Metionina	5	23
Fenilalanina	20	83
Treonina	18	77
Triptófano	8	32
Tirosina	18	76
Valina	21	88

<sup>(1)</sup> 1 kJ = 0,239 kcal.

## ANEXO VI

**Especificación para el contenido y la fuente de proteínas y la transformación de proteínas utilizadas en preparados para lactantes con un contenido proteínico inferior a 0,56 g/100 kJ (2,25 g/100 kcal), elaborados a partir de hidrolizados de proteínas de lactosuero derivado de proteínas de la leche de vaca**

**1. Contenido proteínico**

Contenido proteínico = contenido en nitrógeno × 6,25

Mínimo	Máximo
0,44 g/100 kJ	0,7 g/100 kJ
(1,86 g/100 kcal)	(3 g/100 kcal)

**2. Fuente de proteínas**

Proteínas de lactosuero dulce desmineralizado derivadas de la leche de vaca después de la precipitación enzimática de las caseínas mediante el empleo de quimosina, integradas por:

- a) 63 % de aislado de proteínas de lactosuero sin caseinoglicomacropéptido con un contenido mínimo en proteínas del 95 % de la materia seca, una desnaturalización de las proteínas inferior al 70 % y un contenido máximo de cenizas del 3 %, y
- b) 37 % de concentrado de proteínas de lactosuero dulce con un contenido mínimo en proteínas del 87 % de la materia seca, una desnaturalización de las proteínas inferior al 70 % y un contenido máximo de cenizas del 3,5 %.

**3. Transformación de las proteínas**

Proceso de hidrólisis en dos fases utilizando un preparado de tripsina con un tratamiento térmico (de 3 a 10 minutos de duración a una temperatura de entre 80 y 100 °C) entre las dos fases de hidrólisis.

## ANEXO VII

**VALORES DE REFERENCIA PARA EL ETIQUETADO DE PROPIEDADES NUTRICIONALES DE ALIMENTOS DESTINADOS A LACTANTES Y NIÑOS DE CORTA EDAD**

Nutriente	Valor de referencia para el etiquetado
Vitamina A	(µg) 400
Vitamina D	(µg) 7
Vitamina E	(mg TE) 5
Vitamina K	(µg) 12
Vitamina C	(mg) 45
Tiamina	(mg) 0,5
Riboflavina	(mg) 0,7
Niacina	(mg) 7
Vitamina B <sub>6</sub>	(mg) 0,7
Folato	(µg) 125
Vitamina B <sub>12</sub>	(µg) 0,8
Ácido pantoténico	(mg) 3
Biotina	(µg) 10
Calcio	(mg) 550
Fósforo	(mg) 550
Potasio	(mg) 1 000
Sodio	(mg) 400
Cloruro	(mg) 500
Hierro	(mg) 8
Cinc	(mg) 5
Yodo	(µg) 80
Selenio	(µg) 20
Cobre	(mg) 0,5
Magnesio	(mg) 80
Manganeso	(mg) 1,2

## ANEXO VIII

**PLAGUICIDAS QUE NO SE PODRÁN UTILIZAR EN LOS PRODUCTOS AGRÍCOLAS DESTINADOS A LA ELABORACIÓN DE PREPARADOS PARA LACTANTES Y PREPARADOS DE CONTINUACIÓN**

Cuadro 1

Nombre químico de la sustancia (definición de los residuos)
Disulfoton (suma de disulfoton, disulfotonsulfóxido y disulfotonsulfona, expresada como disulfoton)
Fensulfotion (suma de fensulfotion, su análogo oxigenado y sus sulfonas, expresada como fensulfotion)
Fentin, expresada como catión trifenilestaño
Haloxifop (suma de haloxifop, sus sales y sus ésteres, incluidos conjugados, expresada como haloxifop)
Heptacloro y epóxido de trans-heptacloro, expresada como heptacloro
Hexaclorobenceno
Nitrofené
Ometoato
Terbufos (suma de terbufos, su sulfóxido y su sulfona, expresada como terbufos)

Cuadro 2

Nombre químico de la sustancia
Aldrin y dieldrina, expresada como dieldrina
Endrin

## ANEXO IX

**LÍMITES MÁXIMOS ESPECÍFICOS PARA RESIDUOS DE PLAGUICIDAS O DE METABOLITOS DE PLAGUICIDAS EN LOS PREPARADOS PARA LACTANTES Y PREPARADOS DE CONTINUACIÓN**

Nombre químico de la sustancia	Nivel máximo de residuos (mg/kg)
Cadusafos	0,006
Demeton-S-metil/demeton-S-metilsulfona/oxidemeton-metil (individualmente o combinadas, expresadas como demeton-S-metil)	0,006
Etoprofos	0,008
Fipronil (suma de fipronil y fipronil-desulfinyl, expresada como fipronil)	0,004
Propineb/propilentiourea (suma de propineb y propilentiourea)	0,006

## ANEXO X

## PARTE A

**Directiva derogada con sus modificaciones sucesivas**

(contempladas en el artículo 19)

Directiva 91/321/CEE de la Comisión (DO L 175 de 4.7.1991, p. 35)

Punto XI.C.IX.5 del anexo I del Acta de adhesión de 1994, p. 212

Directiva 96/4/CE de la Comisión (DO L 49 de 28.2.1996, p. 12)

Directiva 1999/50/CE de la Comisión (DO L 139 de 2.6.1999, p. 29)

Directiva 2003/14/CE de la Comisión (DO L 41 de 14.2.2003, p. 37)

Punto IJ.3. del anexo II del Acta de adhesión de 2003, p. 93

## PARTE B

**Plazos de transposición al Derecho nacional**

(contemplados en el artículo 19)

Directiva	Plazos de transposición	Autorización del comercio de los productos conformes a la presente Directiva	Prohibición del comercio de los productos no conformes a la presente Directiva
91/321/CEE		1 de diciembre de 1992	1 de junio de 1994
96/4/CE	31 de marzo de 1997	1 de abril de 1997	31 de marzo de 1999
1999/50/CE	30 de junio de 2000	30 de junio de 2000	1 de julio de 2002
2003/14/CE	6 de marzo de 2004	6 de marzo de 2004	6 de marzo de 2005

## ANEXO XI

## TABLA DE CORRESPONDENCIAS

Directiva 91/321/CEE	Presente Directiva
Artículo 1, apartado 1	Artículo 1
Artículo 1, apartado 2	Artículo 2
Artículo 2	Artículo 3
Artículo 3, apartado 1	Artículo 5
Artículo 3, apartado 2	Artículo 6
Artículo 3, apartado 3	Artículo 7, apartado 4
Artículo 4	Artículo 7, apartados 1 a 3
Artículo 5, apartado 1, párrafo primero	Artículo 8, apartado 1
Artículo 5, apartado 1, párrafo segundo	Artículo 8, apartados 2 y 3
Artículo 5, apartado 2	—
—	Artículo 9
Artículo 6, apartado 1, primera frase	Artículo 4
Artículo 6, apartado 1, segunda frase	—
Artículo 6, apartado 2	Artículo 10, apartado 1
Artículo 6, apartado 3, letra a), frase introductoria	Artículo 10, apartado 2, frase introductoria
Artículo 6, apartado 3, letra a), inciso i)	Artículo 10, apartado 2, letra a)
Artículo 6, apartado 3, letra a), inciso ii)	Artículo 10, apartado 2, letra b)
Artículo 6, apartado 3, letra b), párrafo primero	Artículo 10, apartado 3
Artículo 6, apartado 3, letra b), párrafo segundo	—
Artículo 6, apartado 3, letra c)	Artículo 10, apartado 4
Artículo 6, apartado 4	—
Artículo 7, apartado 1, párrafo primero	Artículo 11
Artículo 7, apartado 1, párrafo segundo	Artículo 12
Artículo 7, apartado 2, letra a)	Artículo 13, apartado 1, letra a)
Artículo 7, apartado 2, letra b)	—
Artículo 7, apartado 2, letra c)	Artículo 13, apartado 1, letra b)
Artículo 7, apartado 2, letra d)	Artículo 13, apartado 1, letra c)

Directiva 91/321/CEE	Presente Directiva
Artículo 7, apartado 2, letra e)	Artículo 13, apartado 1, letra d)
Artículo 7, apartado 2, letra f)	Artículo 13, apartado 1, letra e)
Artículo 7, apartado 2 bis	Artículo 13, apartado 2
Artículo 7, apartado 3	Artículo 13, apartado 3
Artículo 7, apartado 4	Artículo 13, apartado 4
Artículo 7, apartado 5	Artículo 13, apartado 5
Artículo 7, apartado 6	Artículo 13, apartado 6
—	Artículo 13, apartado 7
Artículo 7, apartado 7	Artículo 13, apartado 8
Artículo 8	Artículo 14
Artículo 9	Artículo 15
Artículo 10	—
—	Artículo 16
—	Artículo 17
—	Artículo 18
—	Artículo 19
—	Artículo 20
Artículo 11	Artículo 21
Anexos I a V	Anexos I a V
Anexo VI	—
Anexo VII	—
—	Anexo VI
Anexos VIII a X	Anexos VII a IX
—	Anexo X
—	Anexo XI





## VIII. ANEXO C)

### C) Presentación de Pósters:

En 4th Euro Fed Lipid Congress: Oils, Fats and Lipids for a Healthier Future. Madrid, Octubre de 2006:

1.- “Volatile compounds evolution in LC-PUFA supplemented milk-based infant formulae by static headspace gas chromatography”. Autores: Jorge L. Chávez Servín, A.I.Castellote y M.C.López-Sabater.

En 11 Jornadas de Análisis Instrumental (JAI); Alimentos y Seguridad Alimentaria. Barcelona, España ( 15-17 noviembre 2005):

2.- “Analysis of vitamins A and E in infant milk-based formulae by HPLC-DAD”. Autores: Jorge L. Chávez-Servín, Ana I.Castellote y M. Carmen López-Sabater.

3.- “Analysis of available lysine in infant formulae by HPLC. Evolution during storage.” Autores: Jorge L. Chávez-Servín, Ana I.Castellote y M. Carmen López-Sabater.

En 4rd Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques. Madrid, España (5 al 7-10-2004):

4.- “Analysis of potential and free furfural compounds in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with diode array detection.” Autores: Jorge L. Chávez-Servín, Ana I.Castellote y M. Carmen López-Sabater

En 3rd Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques. Almería, España. (19 al 21-11-2003):

5.- “Mono and disaccharides analysis in milk-based formulae by HPLC-RID”. Autores: Jorge L. Chávez Servín, A.I.Castellote y M.C.López-Sabater.



# Volatile compounds evolution in LC-PUFA supplemented milk-based infant formulae by static headspace gas chromatography.

Jorge L. Chávez-Servín<sup>a</sup>; Ana I. Castellote<sup>a</sup>; Montserrat Rivero<sup>b</sup>; María Rodríguez-Palmero<sup>b</sup>; Ricard Chifre<sup>b</sup>; M. Carmen López-Sabater<sup>\*a</sup>.

<sup>a</sup>Department of Nutrition and Food Science, Reference Center in Food Technology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n 08028 Barcelona, Spain.

<sup>b</sup>Scientific Department ORDESA Lab. SL, Sant Boi de Llobregat, Barcelona, Spain.

\* (mlopez@ub.edu)

## Introduction

Lipid oxidation is well recognized as a major cause of quality deterioration during manufacture and storage of lipid-containing foods. During peroxidation of unsaturated fatty acids, lipid hydroperoxides are formed during the propagation phase, these primary compounds are unstable and are rapidly decompose in the presence of trace elements to give a range of new free-radicals and other non-radical compounds including alkoxy and alkyl radicals, aldehydes, ketones and a range of carboxyl compounds forming a complex mixture of secondary lipid oxidation products, which adversely affect the quality of the formula powders. One of these compounds are propanal, pentanal and hexanal, which are being associated with the development of undesirable flavors and as potential markers of lipid oxidation status.

A static headspace gas chromatographic method (HS-GC) was used to determine the main volatile compounds in infant formula (IF) propanal, pentanal and hexanal. These aldehydes are secondary lipid oxidation products and therefore suitable indicators of damage.

The evolution volatiles in two types infant formulae, differing only in the type of LC-PUFA supplementation (Type 1: supplemented in the form of TAG and Type 2, supplemented in the form of phospholipids) was monitored. They were stored at 25 during a standard one-year shelf life.

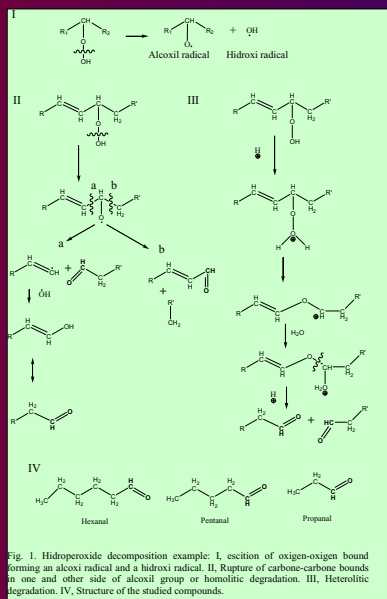


Fig. 1. Hydroperoxide decomposition example: I, scission of oxygen-oxygen bond forming an alkoxy radical and a hydroxy radical. II, Rupture of carbene-carbene bonds in one and other side of alkoxy group or homolytic degradation. III, Heterolytic degradation. IV, Structure of the studied compounds.

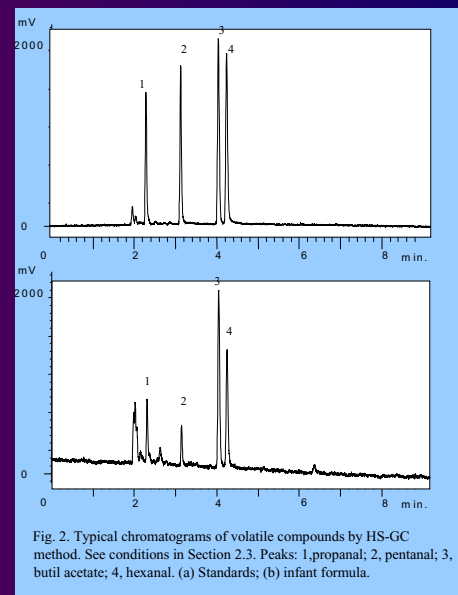


Fig. 2. Typical chromatograms of volatile compounds by HS-GC method. See conditions in Section 2.3. Peaks: 1, propanal; 2, pentanal; 3, butyl acetate; 4, hexanal. (a) Standards; (b) infant formula.

## Chromatographic conditions

We used a Shimadzu gas chromatograph system Model GC-14 A, coupled with a flame ionization detector, and a split-splitless manual injector (Shimadzu, Kyoto, Japan). We used a supelcowax<sup>TM</sup>-10 fused silica capillary column (30m x 0.25 mm x 0.25 μm film thickness) from Supelco (Bellafonte, PA, USA). The aldehydes were separated isothermally at 75°C. The injector and 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 20.39 cm/sec. Data acquisition was performed in an HP GC chemstation software for Windows (Hewlett-Packard).

## METHOD PROCEDURE

500 mg of infant formula powder was weighted into a 10 ml headspace vial, 2.5 ml of Milli-Q water and 0.5 ml of IS (butyl acetate) were added.

The vial was sealed with silicone rubber PTFE caps. Samples were homogenized by a vortex during 1 minute.

Samples were equilibrated at 60°C during 15 min into a 21<sup>®</sup> Vial Heater Model VH 6200 from Tracer (Teknokroma, Barcelona, Spain), 500 μl of headspace volume was measured using a Static Headspace Sampler MHS 123, sampling time was 30 seconds.

The gas volume sample was injected in the GC system.

Analyses were performed in quadruplicate.

## Conclusions

From the 3 studied volatiles, hexanal presented major sensitivity during storage and it increased among the time. It could be used as a fast potential marker to evaluate the oxidative stability in infant formula powders during their shelf life. Formula type 2 (supplemented with phospholipids) shows better stability than type 1 (supplemented with TAG).

Sample	Storage	Propanal (mg/Kg)	Pentanal (mg/Kg)	Hexanal (mg/Kg)
IF Type 1 25°C	0	0.814 ± 0.110	0.460 ± 0.13	1.527 ± 0.450
	1	0.905 ± 0.048	0.569 ± 0.07	1.778 ± 0.195
	3	1.068 ± 0.096	0.831 ± 0.04	2.947 ± 0.280
	6	1.225 ± 0.019	0.879 ± 0.00	3.148 ± 0.101
	9	1.598 ± 0.176	1.217 ± 0.08	3.639 ± 0.186
	12	1.631 ± 0.235	1.363 ± 0.16	3.686 ± 0.076
IF Type 2 25°C	0	-	-	0.508 ± 0.040
	1	-	0.236 ± 0.028	0.473 ± 0.152
	3	-	0.306 ± 0.022	0.561 ± 0.027
	6	0.525 ± 0.06	0.380 ± 0.080	0.739 ± 0.053
	9	0.634 ± 0.03	0.383 ± 0.090	1.040 ± 0.112
	12	0.639 ± 0.03	0.385 ± 0.050	1.093 ± 0.019

IF Type 1: Supplemented in the form of TAG

IF Type 2: Supplemented in the form of phospholipids



# Analysis of vitamins A and E in infant formulae milk by HPLC-DAD

\* Chávez-Servín Jorge Luis, Castellote Ana Isabel, López-Sabater M. Carmen.  
 (\*jchavez@ub.edu)

Dpt. de 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.

## Introduction

Generally vitamin A refers to all-*trans*-retinol, which is the most active form of this vitamin, while vitamin E is a collective term for tocopherols ( $\alpha$ -T,  $\beta$ -T,  $\gamma$ -T and  $\delta$ -T). Tocopherols and retinol are added to Infant Formulae (IF) both to improve the vitamin content and to prevent lipid oxidation during manufacture and storage, they help to extend the shelf life of this product. Fortification of IF is necessary with the more stable vitamin esters, such as retinol acetate, retinol palmitate and tocopherol acetate [1-4].

One of the techniques more used in fat-soluble vitamins analyses is the HPLC. Normal-phase (NP) is a common and an extended technique for fat-soluble vitamins determination. It presents several advantages when direct extraction is carried out: i.e. lipid fraction could be injected directly onto a column, easily sample preparation, the positional isomers  $\alpha$ -T,  $\beta$ -T,  $\gamma$ -T and  $\delta$ -T can be resolved,  $\alpha$ -TAc and  $\alpha$ -T are differentiated because saponification is not necessary.

The recent introduction of shorter columns (i.e. 50 mm x 2.1 mm; 3 mm particle size) in comparison with traditional columns (250 mm and/or 150 mm x 4.6 mm; particle size 5 mm) present several advantages including less solvent consumption, and higher mass sensitivity. We developed a HPLC-DAD method for measuring vitamin A and E by direct extraction.

## Chromatographic conditions

The HPLC system used consisted of a Hewlett Packard liquid chromatographic system (Waldbronn, Germany) with an HP 1050 pump system and a HP-1040 M photodiode-array detector and a Waters 717 plus autosampler injector (Milford, MA, USA). We used a Pinnacle II silica column (50 x 2.1 mm), with a 3  $\mu$ m particle size and a precolumn guard cartridge Pinnacle II silica (10 x 2 mm) (Restek, Bellefonte PA, USA). Separation was performed at 30°C using a mixture of 0.5% ethyl acetate in hexane and a flow rate of 0.4 ml/min. The injection volume was 20  $\mu$ l.

## METHOD PROCEDURE

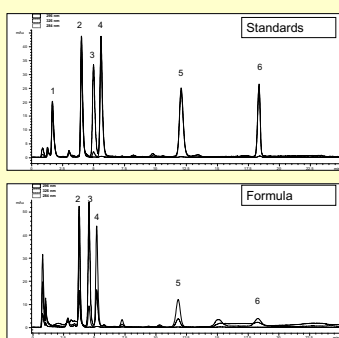
Weight 2g of formula powder and dissolve in 8ml warm water.

Introduce 1ml in a centrifuge tube Add 3 ml of absolute ethanol and shake 3 min.

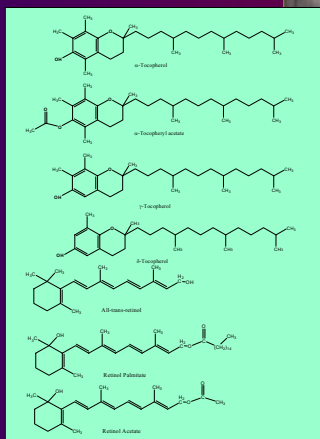
Add 1 ml hexane and shake 1 min Left 5 min to stand.

Add 3 ml of saturate NaCl. Centrifuge 5 min at 3000 rpm.

Filter the hexanic phase through a 0.22  $\mu$ m Inject in the HPLC-DAD system



1- Retinol Palmitate, 2-Retinol Acetate, 3- $\alpha$ -Tocopheryl Acetate, 4- $\alpha$ -Tocopherol, 5- $\gamma$ -Tocopherol, 6- $\delta$ -Tocopherol.



## Validation Method

Compound	DL <sup>a</sup> (mg/100g)	DL <sup>b</sup> ( $\mu$ g/100g)	Linearity (R <sup>2</sup> )	Equation	Repeatability RSD	Reproducibility	Recovery (%)
$\alpha$ -Tocopherol	0.13 <sup>a</sup>	0.44 <sup>a</sup>	2-100 ppm 0.9994	y=7.3294x+0.2813	1.41	5.42	95.833
Acetate	0.69 <sup>a</sup>	0.92 <sup>a</sup>	2-100 ppm 0.9993	y=13.994x-23.418	0.79	3.71	93.056
$\gamma$ -Tocopherol	0.43 <sup>a</sup>	0.59 <sup>a</sup>	1-50 ppm 0.9994	y=18.483x-14.171	0.70	6.92	99.228
$\delta$ -Tocopherol	0.44 <sup>a</sup>	0.61 <sup>a</sup>	1-50 ppm 0.9993	y=13.517x-14.28	-	-	94.590
Retinol	3.65 <sup>b</sup>	9.54 <sup>b</sup>	0.2-5 ppm 0.9991	y=108.46x+7.3056	-	-	99.454
Palmitate	3.41 <sup>b</sup>	7.18 <sup>b</sup>	0.2-5 ppm 0.9994	y=189.54x-0.7629	0.22	6.20	98.508
Acetate							

## Conclusions

The HPLC-DAD "short-column" method by direct extraction is rapid, simple and reproducible for measuring vitamins A and E in milk-based formulae. It shows acceptable precision, recovery and sensitivity [5, 6].

## References

### Reference List

- [1] E.Miquel, A.Alegria, R.Barbera, R.Farre, G.Clemente, International Dairy Journal 14 (2004) 1003.
- [2] G.W.Chase, A.R.Long, Journal of Aoac International 81 (1998) 582.
- [3] N.Rodrigo, A.Alegria, R.Barbera, R.Farre, Journal of Chromatography A 947 (2002) 97.
- [4] B.R.Mendoza, S.M.Pons, A.I.C.Bargallo, M.C.Lopez-Sabater, Journal of Chromatography A 1018 (2003) 197.
- [5] W.Horwitz, Anal. Chem. 54 (1982) 67A.
- [6] The United States Pharmacopeia (USPXXIII), Mack Printing, Easton, 1989.



# Analysis of available lysine in infant formulae by high-performance liquid chromatography.

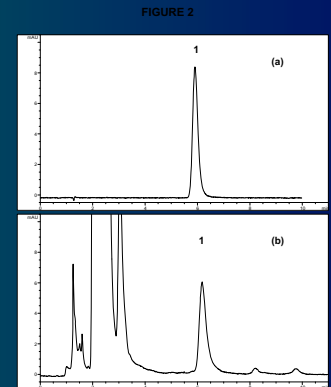
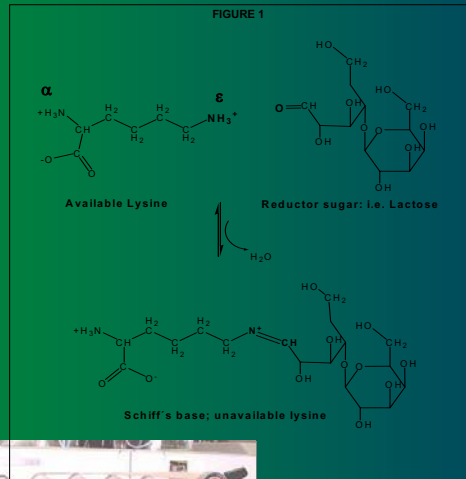
\* Chávez-Servín Jorge Luis, Castellote Ana Isabel, López-Sabater M. Carmen.  
(\*jchavez@ub.edu)

Dpt. de 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.

## Introduction

One of the challenges of industry is to control the stability of formulae milk, which makes these products susceptible to the Maillard Reaction (MR). The reductor sugars and lysine are the main compounds involved in the initial states of the MR, and consequently a lactulosyl-lysine compound is produced. This leads to the biological unavailability of lysine [1-6]. Figure 1 shows the initial step of the Maillard reaction in which the amino  $\alpha$ -group of lysine react with a reductor sugar (namely lactose) forming an unavailable product, lactose-lysine products can not be digested in the stomach by the proteolytic enzymes [7, 8]. Lysine is an essential amino acid which is generally used as an indicator of the biological value of food protein [9].

A simple and reproducible RP-HPLC-DAD method for the qualitative and quantitative analysis of available lysine (as  $N\epsilon$ -dinitrophenyl-lysine) in milk-based infant formulae was performed and validated. [10, 11]. taking as the start point the method proposed by Albalá-Hurtado [12]. This method is based in the reactivity of the  $\alpha$ -amino group of lysine, which react with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene forming a derivative, which is measured at 362nm.



1: Ne-DNP-Lys. (a) Standard of 5ppm solution; (b) Infant Formula

## Chromatographic conditions

The HPLC system used consisted of a Hewlett Packard liquid chromatographic system (Waldbronn, Germany) with an HP 1050 pump system and a HP-1040 M photodiode-array detector and a Waters 717 plus autosampler injector (Milford, MA, USA). We used a Tracer ODS-2 C18 column (4.6 x 150 mm), with a 5  $\mu$ m particle size (Teknokroma, Barcelona, Spain). Separation was performed at 30°C using a mixture of 35% methanol and 65% 0.01 M sodium acetate solution and a flow rate of 1 ml/min. Detection was made at 362 nm, and the injection volume was 20  $\mu$ l.

## Validation Method

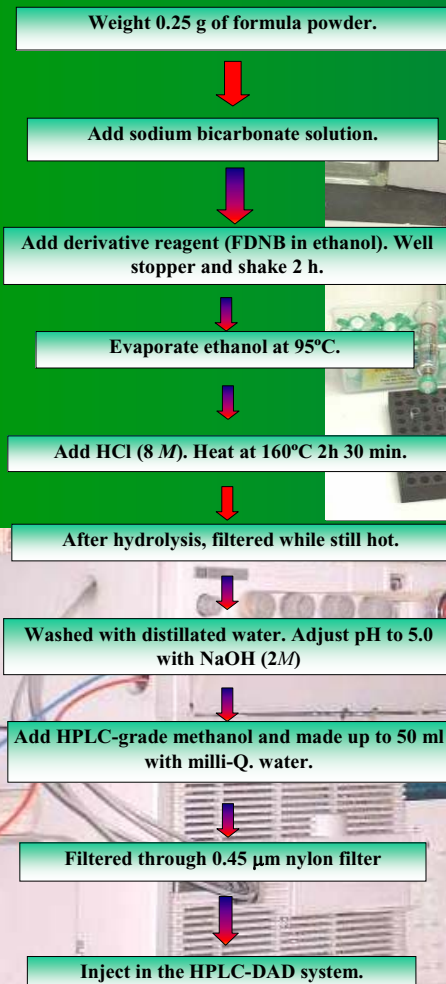
Available lysine	Repeatability (n = 6)			Reproducibility (n = 8)		
	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD
g/100g IF sample	0.74	0.05	5.13	0.73	0.08	8.55
g/100g protein	6.01	0.37	5.13	5.96	0.63	8.55
Recovery <sup>a</sup> (% , n = 6)	94.18	3.87	4.11			
DL (mg/100g IF)	0.53					
QL (mg/100g IF)	2.78					
Equation curve <sup>b</sup> $y = 48.9x + 0.7602$						$r^2 = 0.9999$ (range 0.05- 7 $\mu$ g/ml)

## Conclusions

The HPLC-DAD method used in this study is relatively simple and reproducible for measuring available lysine compound in milk-based infant formulae. It shows acceptable precision, recovery and sensitivity.

- [1] Z.U.Rehman, Milchwiss. -Milk Sci. Int. 57 (2002) 629.
- [2] A.Ramirez-Jimenez, B.Garcia-Villanova, E.Guerra-Hernandez, Food Chem. 85 (2004) 239.
- [3] M.Friedman, J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 631.
- [4] M.A.J.S.van Boekel, Food Chem. 62 (1998) 403.
- [5] Z.U.Rehman, W.H.Shah, Milchwiss. -Milk Sci. Int. 58 (2003) 474.
- [6] J.L.Chávez-Servín, A.I.Castellote, M.C.López-Sabater, J. Chromatogr. A 1076 (2005) 133.
- [7] P.A.Finat, F.Mottu, E.Bujard, Abstracts of Papers of the American Chemical Society 172 (1976) 70.
- [8] G.B.Naranjo, L.S.Malec, M.S.Vigo, Food Chem. 62 (1998) 309.
- [9] J.Mauron, F.Mottu, Archives of Biochemistry and Biophysics 77 (1958) 312.
- [10] W.Horwitz, Anal. Chem. 54 (1982) 67A.
- [11] The United States Pharmacopeia (USPXXIII), Mack Printing, Easton, 1989.
- [12] S.Albalá-Hurtado, S.Bover-Cid, M.Izquierdo-Pulido, M.T.Veciana-Nogues, M.C.Vidal-Carou, J. Chromatogr. A 778 (1997) 235.

## METHOD PROCEDURE







# Analysis of Potential and Free Furfural Compounds in Milk-Based Formulae by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection.



\* Chávez-Servín Jorge Luis, Castellote Ana Isabel, López-Sabater M. Carmen.  
 (\*jchavez@farmacia.far.ub.es)

Dpt. 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.

## Introduction

The composition of milk-based formulae powder, integrate many factors that make them susceptible to Maillard Reaction. This reaction is one of the most important alterations occurred during heat processing and/or storage of this milk-based products, rich in reducing sugars (i.e. Lactose, glucose..) and lysine contents, particularly when thermal process are inadequate [1-8].

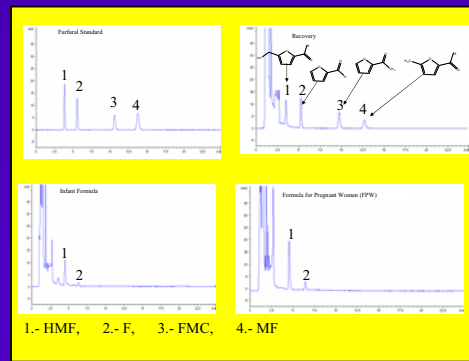
Furfurals as 5-hidroximethyl-2-furfural (HMF), 2-furfuraldehyde (F), 2-furyl methyl ketone (FMC) and 5-methyl 2-furfural (MF), are intermediary compounds in the formation of pigments (melanoidines) and are undesirable compounds which are generated at advance stages of Maillard Reaction. These compounds are useful indicators for evaluating the intensity of the thermal treatment applied and/or the effects of storage [9-14].

## Objective

The purpose of this study was to validate a method [15-16] by HPLC-RI that permit the furfurals can be separated from components such as proteins and other macromolecules that could create interference in the system and analyze qualitative and quantitative free and potential furfural compounds in milk based formulae.

## Chromatographic conditions

The HPLC system used, consisted of a Hewlett Packard HP 1050 series controller pump degassing device and a Waters 717 plus autosampler injector, and a DAD HP 1040 M series II HPLC detection system. The separation was performed on a Tracer Extrasil ODS-2 C<sub>18</sub> column (4.6 x 150 mm), 5 µm particle size. Separation was carried out at 30°C, using as the mobile phase a mixture of acetonitrile-water (4.5:95.5 v/v) at a flow rate of 1 ml/min. Detection was made in a wavelength of 284 nm for HMF, 277nm for F, 274 nm for FMC and 293 nm for MF.



## Conclusions

This HPLC-DAD method is suitable for routine analysis of potential and free Furfurals and showed acceptable precision, recovery and sensitivity.

## References

- [1] W. Baltes, Food Chem. 9 (1982) 59-73.
- [2] M.R. Guo, G.M. Hendricks, and P.S. Kindstedt, Int. Dairy J. 8 (1998) 333-339.
- [3] Z.U. Rehman, Milchwiss. Milk Sci. Int. 57 (2002) 629-631.
- [4] A.S. Pereyra Gonzalez, G.B. Naranjo, L.S. Matec, and M.S. Vigo, Int. Dairy J. 13 (2003) 95-99.
- [5] J.L. Chávez-Servín, A.I. Castellote, and M.C. Lopez-Sabater, J.Chromatogr. A 1043 (2004) 211-215.
- [6] M.A.J.S. van Boekel, Food Chem. 62 (1998) 403-414.
- [7] S.I.F.S. Martins, W.M.F. Jansen, and M.A.J.S. van Boekel, Trends Food Sci. Technol. 11 (2000) 364-373.
- [8] P.J.J.M. Vennil and J.A. Jans, Neth. Milk Dairy J. 45 (1991) 145-167.
- [9] E. Ferrer, A. Alegria, R. Ferré, P. Abellón, and F. Romero, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 1817-1822.
- [10] F.J. Morales and S. Jimenez-Perez, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 3385-3390.
- [11] S. Altaba-Hernando, M.T. Vascotto-Noguez, M. Esquivel-Pulido, and M.C. Vidal-Goreo, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 2128-2133.
- [12] E. Ferrer, A. Alegria, R. Ferré, P. Abellón, and F. Romero, J. Chromatogr. A 947 (2002) 85-95.
- [13] M. Keeney and R. Bassette, J. Dairy Sci. 42 (1959) 945-960.
- [14] M.A.J.S. van Boekel and Z.U. Rehman, Neth. Milk Dairy J. 41 (1987) 297-306.
- [15] The United States Pharmacopoeia (USPXXIII), Mack Printing, Easton, 1989.
- [16] W. Horwitz, Anal. Chem. 54 (1982) 67A-76A.

## METHOD PROCEDURE

Weight 2 g of formula powder in a centrifuge tube.

Add 10 ml of freshly oxalic acid ( 0.2 N). Sealed the tube.

Heat in a boiling water bath exactly 25 minutes. Cooled room temperature.

Add 3 ml of TCA ( 40% w/v). And mix 5 minutes.

Centrifuge 15 minutes at 4000 rpm.

Collect the supernatant phase in a 25 ml volumetric flask.

Add 10 ml of TCA ( 4% w/v) to the residue in the tube, mix 10 minutes and repeat centrifugation.

Collect the supernatant in the same volumetric flask.

Carry out to 25 ml with TCA ( 4% w/v).

Force through a 0.45 µm nylon filter and inject into the HPLC-DAD.

## Validation Method

Compound	DL (µg/100g sample)	QL (µg/100g sample)	Linearity r <sup>2</sup>	Equation	Repeatability CV	Reproducibility CV	Recovery (%)
5-hidroximethyl-2-furfural (HMF)	32.07	49.05	0.9999	Y= 90.172x-1.7882	1.05	2.68	96.32
2-furfuraldehyde (F)	0.32	15.17	0.9993	Y= 1.03106x+0.4888	2.30	4.26	96.24
2-furyl methyl ketone (FMC)	5.66	28.19	0.9995	Y= 33.5726x+0.1291	1.76	3.51	94.46
5-methyl 2-furfural (MF)	18.88	32.11	0.9997	Y= 113.17x+1.8876	1.28	3.35	98.71



# Mono and disaccharides analysis in milk-based formula supplemented with LC-PUFA by high-performance liquid chromatography (HPLC) with refractive index (RI) detector.



**Chávez-Servín Jorge Luis.**, Castellote Ana Isabel, \*López-Sabater M. Carmen. (\*mclopez@ub.edu)

*Dpt. 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.*

## Introduction

The different milk-base formulae can be based on any appropriate blend of proteins, carbohydrates, fats, minerals and vitamins. One of the principal problem is to control the stability of formulae along their shelf-life. Powered formulae integrate many factors that make them susceptible to Maillard reaction, for example its carbohydrate content.

One of the causes of deterioration of milk-products is the interaction of lactose with other components. The composition of many milk-base formulae contain sugars besides lactose and the evolution of mono and disaccharides must be evaluated across the storage time. Levels of monosaccharides can change as a consequence of thermal processing and/ or during storage.

## Objective

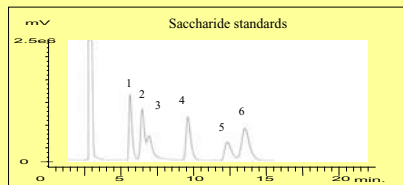
The propose of this study was to design and to validate a method by HPLC-RI that permit the sugars fraction can be separated from components such as proteins and other macromolecules that could create interference in the system and analyze qualitative and quantitative free mono- and disaccharides in milk based formulae.

## Chromatographic conditions

HPLC type LC-10AD double pump, manual injector type 7725 Rheodyne with a 20 µl loop. RID-6A Refractive Index Detector. Tracer carbohydrates column (5 µm particle size; 250 x 4.6 mm I.D.), and a precolumn NH<sub>2</sub> (13 x 3 mm I.D.).

Isocratic elution mobile phase acetonitrile-water (75:25, v/v), flow-rate 1.8 ml/min. Analysis samples at room temperature.

### CHROMATOGRAM RESULTS

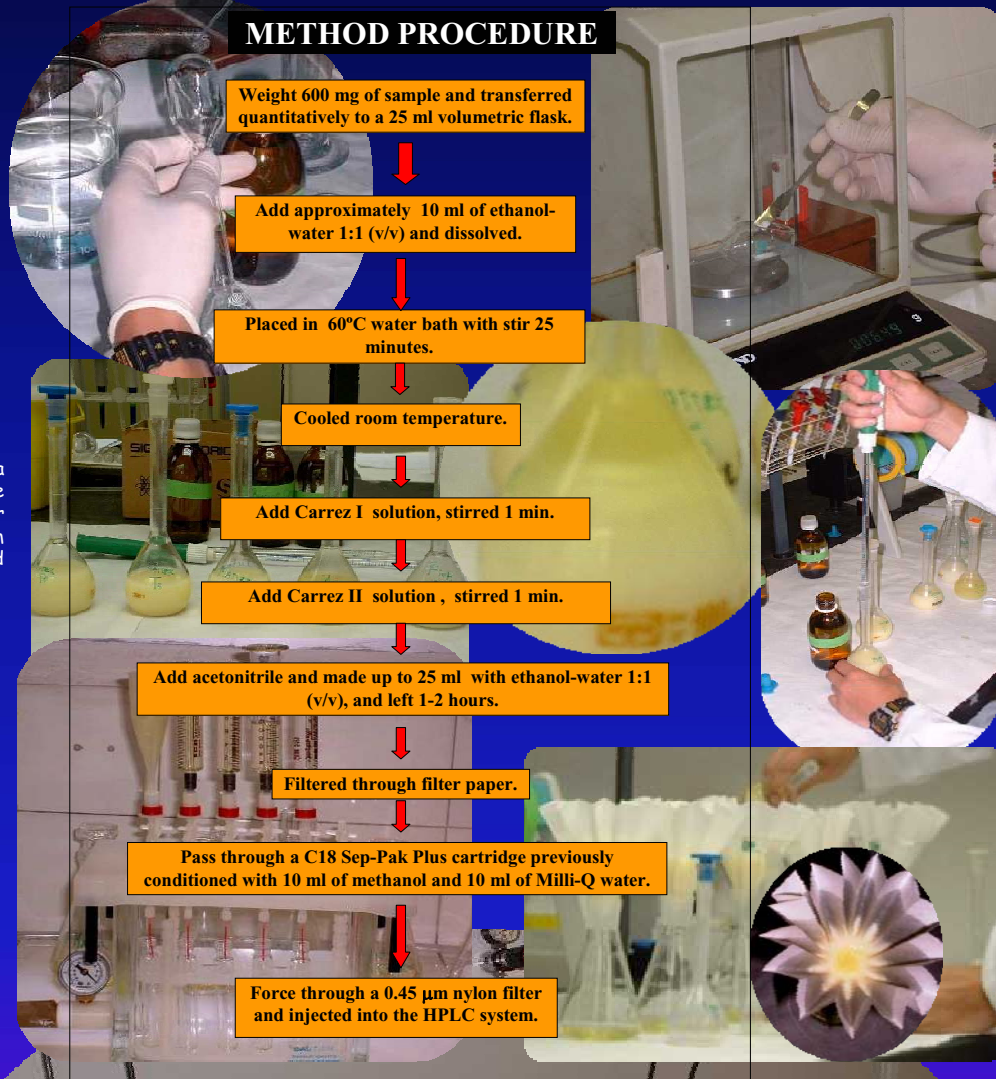


1.- fructose, 2.-glucose, 3.- galactose, 4.- sucrose, 5.- lactulose, 6.- lactose.

## Conclusions

This HPLC method with refractive index detection is suitable for routine analysis of mono and disaccharides in milk-based formulas, and provide acceptable precision, recovery and sensitivity.

## METHOD PROCEDURE



## Validation Method

Compound	DL (mg/ml)	QL (mg/ml)	Linearity r <sup>2</sup>	Equation	Repeatability CV	Reproducibility CV	Recovery (%)
Fructose	0,09	0,21	0,996	y=522657x-16132	0,78	4,8	105
Glucose	0,09	0,21	0,997	y=486515x-54265	0,78	4,8	105
Galactose	0,28	0,55	0,999	y=318735x-54424	0,99	6,15	99
Sucrose	0,03	0,2	0,999	y=507138x-18712	0,99	6,15	99
Lactulose	0,05	0,22	0,999	y=495929x-10673	0,99	6,15	99
Lactose	0,09	0,25	0,998	y=399859x-66979	0,46	2,49	105

