

Trabajo de Investigación de Maestría en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias,
Línea: Farmacia

**DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD PROTEÍCA Y DAÑO TÉRMICO DE
NUTRICIONES ENTERALES POLIMÉRICAS COMERCIALIZADAS EN
COLOMBIA**

Andrés Felipe Zapata Betancur

Estudiante de Maestría en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Línea: Farmacia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias Universidad de Antioquia

Director: PhD. José del Carmen Contreras Calderón

Grupo de Investigación Biotecnología de alimentos –BIOALI-

Posgrado Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Universidad de Antioquia

Medellín, 2016

1. TABLA DE CONTENIDO	
2. RESUMEN.....	3
3. ABSTRACT.....	4
4. INTRODUCCION.....	5
5. OBJETIVOS.....	17
5.1. Objetivo general	17
5.2. Objetivos específicos	17
6. MATERIALES Y METODOS.....	18
6.1. Muestras y reactivos	18
6.2. Métodos	19
6.2.1. Furosina.....	19
6.2.2. HMF y Furfural.....	20
6.2.3. Lisina útil.....	21
6.2.4. Absorbancia a 420 nm.....	22
6.3. Análisis complementarios.....	22
6.3.1. Determinación de proteínas.....	22
6.3.2. Determinación de pH.....	22
6.3.3. Determinación de azúcares totales.....	23
6.4. Validación de los métodos	23
6.5. Análisis estadístico.....	23
7. RESULTADOS Y DISCUSION	25
7.1. Furosina	25
7.2. HMF y Furfural	30
7.3. Lisina útil	36
7.4. Absorbancia a 420nm	43
7.5. Análisis complementarios.....	46
7.6. Análisis de modelos lineales generalizados	47
8. CONCLUSIONES	52
9. BIBLIOGRAFÍA.....	54

2. RESUMEN

Los procesos productivos de las *nutriciones enterales poliméricas* tienen diferentes etapas de calentamiento durante la obtención de los ingredientes, mezclado, secado y esterilización. Una de las modificaciones más importantes inducidas por el calentamiento durante el proceso productivo o durante su almacenamiento es la Reacción de Maillard (RM), la cual implica aminoácidos y azúcares reductores, los cuales pueden producir una pérdida de valor nutritivo y la formación de compuestos potencialmente tóxicos o no deseados en el producto. Varios índices químicos pueden ser usados para evaluar el daño térmico en proteínas por la RM de acuerdo a la intensidad del daño. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad proteica y daño térmico de nutriciones enterales poliméricas comercializadas en el país. Para la determinación del daño térmico se evaluaron furosina, 5 hidroximetilfurfural (HMF), furfural, absorbancia a 420 nm, y la calidad proteica se evaluó mediante la determinación de lisina útil. Se obtuvieron valores de furosina entre 61.3 y 183.2 mg 100 g⁻¹ de proteína, para HMF entre 0.15 y 1.11 mg 100 g⁻¹ de proteína, para furfural entre 1.39 y 6.75 mg 100 g⁻¹ de proteína, para lisina útil entre 4.26 y 11.44 g 100g⁻¹ de proteína y absorbancias a 420 nm entre 0.002 y 0.025. Las NE presentan bajo daño térmico, siendo la furosina el indicador de elección para evaluar daño térmico en estas muestras. El 90% de las NE cumplen con las recomendaciones de lisina para un adulto sano. El contenido de HMF y furfural no representa un riesgo para la salud del consumidor. Se proponen parámetros de calidad para evaluar daño térmico y calidad proteica en NE comercializadas en Colombia.

Palabras Clave: Daño térmico, Reacción de maillard, 5-Hidroximetilfurfural, Furfural, Furosina, Lisina útil, Nutriciones enterales

3. ABSTRACT

The production processes of *polymeric enteral nutrition* (EN) have different stages of heating: during the obtaining of the ingredients, mixing, drying and sterilization. One of the most important modifications induced by heating during the production process or during its storage is the Maillard Reaction (MR), which involves amino acids and reducing sugars lead into to a loss of nutritive value and the formation potentially toxic or unwanted compounds in the product. Several chemical indices can be used to evaluate the thermal damage in proteins by MR according to the intensity of the damage. The objective of the present work was to evaluate the protein quality and thermal damage of polymeric enteral nutrition commercialized in the Colombia. The determination of thermal damage was carried out by the evaluation of furosine, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), furfural, the absorbance at 420 nm. The protein quality was assessed by the determination of useful lysine. The obtained furosine values were between 61.3 and 183.2 mg 100 g⁻¹ protein, HMF between 0.15 and 1.11 mg 100 g⁻¹ protein, furfural between 1.39 and 6.75 mg 100 g⁻¹ protein, useful lysine between 4.26 and 11.44 g 100 g⁻¹protein and the absorbances at 420 nm between 0.002 and 0.025. The NE presents low thermal damage; being furosine the indicator of choice for evaluates thermal damage in these samples. The 90% percent of EN comply with lysine recommendations for a healthy adult. The content of HMF and furfural does not represent a risk to the health of the consumer. Quality parameters are proposed to evaluate thermal damage and protein quality in EN marketed in Colombia.

Keywords: Thermal damage, Maillard reaction, 5-Hydroxymethylfurfural, Furfural, Furosine, Useful lysine, Enteral nutrition

4. INTRODUCCION

La malnutrición produce un deterioro de los procesos fisiológicos normales a causa de la insuficiente cantidad disponible de energía o proteínas requeridas para suplir las necesidades metabólicas, ocasionada por una mala ingesta dietética, aumento los requerimientos metabólicos durante la enfermedad o por las pérdidas de elementos nutritivos (1), representando un problema de gran importancia en los pacientes hospitalizados, especialmente en los críticos o con necesidades nutricionales aumentadas (1,2).

El soporte nutricional enteral (SNE) se ha definido como el método de suministro de nutrientes por medio de un tubo directamente al tracto gastrointestinal, sistema que consiste en un portal de entrada en el aparato digestivo en cualquier lugar desde el esófago hasta el recto, sin embargo, desde el punto de vista de la práctica clínica, la nutrición enteral se define como una técnica o método de suministro de nutrientes a un paciente mediante un tubo que tiene su extremo en el estómago, el duodeno o yeyuno, con el fin de brindar la nutrientes necesarios de forma total o parcial (3–5). La implementación de un SNE en pacientes hospitalizados, es de gran importancia debido a los beneficios que se dan durante su uso en el marco terapéutico de los pacientes. Los beneficios de la Nutrición Enteral (NE) se pueden evidenciar en diversas situaciones como: disminución del tiempo de hospitalización de los pacientes, reducción de los costos de tratamiento, de estancia y alta capacidad de afectar de forma significativa y positiva la evolución clínica de los enfermos (6–8).

De esta forma la indicación de la NE puede ser resumida así (Tabla 1):

Tabla 1. Indicaciones nutrición enteral

Paciente desnutrido que no va a poder comer en un periodo de tiempo > 5-7 días y tiene una mínima capacidad funcional absorptiva del intestino delgado.
Paciente normonutrido que no va a poder comer en un periodo de tiempo > 7-9 días y tiene una mínima capacidad funcional absorptiva del intestino delgado.
Pacientes en fase de adaptación de un síndrome de intestino corto.
Pacientes en seguimiento por agresión quirúrgica, trauma o gran quemado

De la misma forma existen patologías que exigen la implementación obligatoria del SNE como son (4,9):

- Pacientes con elevado riesgo de broncoaspiración
- Pacientes con Íleo gástrico o problemas de vaciamiento gástrico
- Fístulas altas (gástricas o esofágicas)
- Procesos pancreáticos especialmente pancreatitis aguda y fístulas pancreáticas
- Post-operatorio inmediato
- Trauma
- Esclerosis múltiple
- Enfermedad de Crohn's
- Cáncer gástrico
- Cáncer pancreático

Las NE se han desarrollado como una técnica de soporte nutricional con el fin de mejorar la calidad de vida y evitar el deterioro de los pacientes que, por su condición de salud, no son capaces de mantener de forma adecuada el aporte de nutrientes necesarios a través de la alimentación, lo que representa variaciones entre el aporte y el requerimiento nutricional. La respuesta del paciente a los tratamientos y terapias establecidas varía de acuerdo al estado nutricional del paciente, razón por la cual conservar un buen estado nutricional se convierte en

un objetivo fundamental y evitar así la aparición de diferentes consecuencias que agravan la condición del paciente. Clínicamente la desnutrición es asociada con dificultades para la curación, aumento del número de complicaciones, estancias hospitalarias y de costos (1,2,9).

El estrés metabólico y la enfermedad aumentan el requerimiento del aporte proteico, para pacientes hospitalizados la recomendación se encuentra alrededor de 1.3 – 1.5 g de proteína $\text{Kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ lo que se traduce en un aporte proteico del 15 al 22% del total de las calorías a consumir (2,9). Las proteínas consisten en polímeros de aminoácidos que se encuentran unidos mediante enlaces peptídicos, de los cuales ocho (esenciales) de los veinte aminoácidos conocidos, no pueden ser sintetizados por nuestro organismo al no poseer los sistemas enzimáticos requeridos(1,10).

Las NE son generalmente formulaciones que contienen una combinación específica de proteínas, las cuales pueden ser aportadas principalmente por: caseínas y caseínatos, proteínas de suero de leche y de soja (11). La caseína constituye una familia de proteínas lácteas que se presentan en diferentes formas moleculares y son las principales proteínas presentes en la leche bovina (12), el suero concentrado en polvo contiene más de un 70% de proteínas y se utiliza en una amplia gama de aplicaciones de alimentos (preparados para lactantes, nutriciones enterales, alimentos saludables, suplementos y bebidas) como ingredientes nutricionales y funcionales (13). El alto valor nutritivo de las proteínas de suero se debe principalmente al alto contenido de aminoácidos esenciales en comparación con la de trigo, carne de vaca o soja (14). Las NE son usadas frecuentemente como sustitutos o complementos alimenticios a nivel hospitalario y domiciliario, son elaboradas en concentraciones de nutrientes similares a las encontradas en los alimentos que consumimos y poseen la capacidad de mantener las condiciones nutricionales de los consumidores en comparación a los alimentos normales (8), por tal motivo son de gran importancia para los pacientes que no pueden ingerir alimentos o suplir sus necesidades básicas alimentarias de

forma natural por largos periodos de tiempo. Son productos que contienen una mezcla de nutrientes (macro y micronutrientes) nutricionalmente equilibrados los cuales pueden ser administradas por vía oral o por vía enteral dependiendo las condiciones del paciente (4).

En la actualidad existe una gran variedad de NE diseñadas para suplir los requerimientos nutricionales de los pacientes, por lo tanto la clasificación puede ser desde diferentes criterios.

De acuerdo al estado de los nutrientes presentes en las nutriciones enterales se pueden clasificar en 3 grupos:

- Nutriciones enterales poliméricas (NEP) (proteína intacta): Son aquellas formulaciones en las cuales los nutrientes se encuentran en su forma macromolecular intacta y requieren que el intestino delgado del paciente conserve una capacidad motora, digestiva y absorbiva mínima. Normalmente poseen una moderada osmolaridad y sabor agradable, también son por lo general las formulaciones de mayor utilización al no requerir infusión continua o bomba. Las formulas poliméricas a su vez se pueden sub clasificar en 4 grupos (15–17):
 - Poliméricas normoproteicas normoconcentradas: Grupo numeroso y de frecuente uso, normalmente se presentan en forma líquida y poseen una densidad calórica de 1 Kcal mL^{-1} y la contribución calórica de las proteínas es del 11 al 18%.
 - Poliméricas normoproteicas concentradas: Presentan una densidad calórica de 1.5 Kcal mL^{-1} y la contribución calórica de las proteínas es del 11 al 18%.

- Poliméricas normoproteicas con fibra: Presentan adición de fibra de origen natural como polisacáridos de maíz, soja, fibra guar y salvado micronizado, ayudan con la prevención del estreñimiento e impactación fecal, su uso es frecuente en pacientes inmovilizados y en tratamiento de la diarrea colónica.
- Poliméricas hiperproteicas: Las proteínas constituyen entre el 18.5 al 30% de la energía total y se encuentran indicadas en situaciones de requerimientos proteicos muy aumentados siempre que las funciones hepática y renal se mantengan.
- Nutriciones enterales oligo-monoméricas: Son aquellas formulaciones en las cuales las proteínas y los carbohidratos se encuentran parcialmente hidrolizados y se presentan en cadenas de 2 a 6 aminoácidos (oligopéptidos) y como dextrinomaltosas de cadena media (oligosacáridos), las grasas en un porcentaje variable, como triglicéridos de cadena media. Son fórmulas indicadas en los casos que presentan la capacidad funcional del intestino delgado disminuida o se requiere un reposo del mismo (17). Presentan una densidad calórica y aporte proteico similar a las poliméricas normoproteicas normoconcentradas.
- Nutriciones enterales elementales: Son formulaciones nutricionalmente completas las cuales presentan los nutrientes (macro y micro) completamente hidrolizados, las proteínas se encuentran en forma de aminoácidos libres y los carbohidratos como monosacáridos, por tal motivo la función intestinal puede estar disminuida (17). Presentan una densidad calórica y aporte proteico similar a las poliméricas normoproteicas normoconcentradas.

Según su composición nutricional las nutriciones enterales se pueden clasificar de la siguiente forma:

- Completas: Están compuestas por todo los nutrientes necesarios para suplir las necesidades nutricionales de los pacientes (15,16).
 - Estándar: Indicada para pacientes sin requerimientos especiales.
 - Especiales: Preparados elaborados para adaptarse a las necesidades metabólicas y nutricionales de pacientes con diversas patologías, pueden no estar diseñadas bajo un equilibrio nutricional.
- Modulares: Presentan un solo nutriente (proteínas, carbohidratos, lípidos; completos o hidrolizados) en su composición y suelen ser usados como completos en pacientes con necesidades aumentadas y que no se adaptan a las formulas completas (16,17).

De acuerdo al aporte proteico al valor calórico total las nutriciones enterales se pueden clasificar en 3 subgrupos (15,18):

- Hiperproteicas: Las proteínas aportan más del 18% del valor calórico total.
- Hipoproteicas: Las proteínas aportan menos del 10 % del valor calórico total.
- Normoproteicas: Las proteínas aportan hasta el 18% del valor calórico total.

De acuerdo el número de calorías por unidad de volumen se clasifican en los siguientes subgrupos (15):

- Normocalórica: 1 Kcal mL^{-1}
- Hipercalórica: $1.5 - 2 \text{ Kcal mL}^{-1}$

- Hipocalórica: 0.5 – 0.75 Kcal mL⁻¹

Las NE durante su elaboración son sometidos a diferentes tratamientos térmicos como son, la mezcla de ingredientes, pasteurización o UHT con el objetivo de asegurar la estabilidad microbiológica y mejorar la conservación (11,19). Una de las modificaciones más importantes inducidas por el calentamiento y condiciones inadecuadas durante largos periodos de almacenamiento es la Reacción de Maillard (RM), en la cual están involucradas las proteínas y los azúcares reductores presentes en el producto, ocasionando una pérdida en su valor nutritivo (19,20). La aplicación de tratamientos térmicos durante la obtención de los diferentes ingredientes o incluso el proceso de mezcla, pasteurización, esterilización y secado de la formulación para obtener el producto final puede implicar el desarrollo de la RM, la cual puede ser considerada una de las más importantes reacciones químicas durante el procesado de los alimentos (13,21–23). La RM influye sobre atributos de calidad tales como color, sabor y valor nutricional, incluyendo efectos deseables e indeseables, por lo que requiere la consideración de las condiciones de procesamiento, así como de las propiedades físico-químicas del material alimenticio (5,24–26). Una gran cantidad de productos de la RM se pueden formar en la matriz del alimento a los cuales se atribuyen características como antioxidantes, antimicrobianas, mutagénicas o cancerígenas (21,27,28). La RM se da entre aminoácidos y azúcares reductores durante el procesado y conservación de los alimentos, lo que produce una pérdida del valor nutricional (22). Este deterioro nutricional se atribuye a la reducción de la disponibilidad de aminoácidos, principalmente la lisina, el cual es el aminoácido más reactivo debido a su grupo amino libre (18,29), lo cual afecta las indicaciones nutricionales de acuerdo al aporte proteico real esperado del producto y generan transformaciones de la proteína causando que no sea absorbible por el organismo debido a la degradación de aminoácidos esenciales (5,11).

Las principales variables que afectan la extensión de la RM son la temperatura y el tiempo, los cuales dependerán de las condiciones de procesamiento, así como del

pH, la actividad del agua, tipo y disponibilidad de sustratos en la matriz alimentaria, los cuales pueden cambiar como resultado del procesamiento de alimentos y materias primas (30). La desnaturalización de las proteínas del suero lácteo, productos de isomerización de la lactosa, degradaciones tales como lactulosa y productos del pardeamiento por Maillard como furosina, hidroximetilfurfural (HMF) y furfural son las más importantes y no deseables consecuencias de un tratamiento térmico (5,31–33). La lisina, principal aminoácido implicado en esta reacción, se convierte en frutosillisina, maltulosillisina o lactulosillisina (13,34,35), compuestos denominados de Amadori, que no son biológicamente utilizables (5).

Adicionalmente se pueden producir cambios en la estructura proteica que impiden la acción de las enzimas digestivas: proteasas y disacaridasas disminuyendo la digestibilidad (36,37), inhibidas por los productos de la reacción y la complejación de determinados elementos minerales no permitiendo su absorción (38). Además de las pérdidas nutricionales, pueden desarrollarse durante los procesos de calentamiento o de preservación compuestos nocivos con efectos mutagénicos, carcinogénicos y citotóxicos (39–41).

Se han identificado varios indicadores químicos que pueden ser utilizados para evaluar el daño inducido por el calentamiento en proteínas ocasionado por la RM (33). Existe la posibilidad de determinar pequeñas variaciones desde etapas iniciales con furosina, etapas intermedias con HMF, furfural y absorbancia 284 nm y etapas avanzadas y finales mediante la determinación del color (L^* , a^* , b^*) o absorbancia de 420 nm (5,31,33,42–44). Además el contenido de lisina útil es un indicador de etapas iniciales y avanzadas de la RM y de la calidad nutricional y biológica de la proteína (13,34,35,42,43,45–47). Diversos autores han propuesto y empleado con éxito el uso de estos indicadores químicos para evaluar la calidad de algunos alimentos y productos compuestos por azúcares y aminoácidos que son sometidos a un tratamiento térmico, demostrando ser útiles para controlar los procesos y para optimizar las condiciones de fabricación (33).

La furosina es un compuesto formado a partir de la hidrólisis ácida de los compuestos resultantes de la reacción entre grupos ϵ -amino de la lisina con la glucosa, lactosa o maltosa llamados compuestos de Amadori y es utilizado como indicador de las primeras etapas de la RM (33,48). La determinación furosina también ha sido utilizada para estudiar las primeras etapas de la RM durante el tratamiento térmico y el almacenamiento de los preparados para lactantes (5,13,33). En ingredientes proteicos usados en formulas infantiles (usados también en formulas enterales) se ha determinado furosina, encontrándose los mayores valores en las proteínas del lactosuero (19).

El HMF es un reconocido indicador de deterioro producido por calentamiento excesivo o almacenamiento en una amplia gama de alimentos que contienen carbohidratos (25,31,33). En etapas intermedias de la RM mediante la degradación subsiguiente de los compuestos de Amadori a pH 7 o inferior, se da principalmente la 1,2-enolización formando el HMF (cuando están involucrados hexosas) (49). Adicionalmente, el proceso de deshidratación directa de azúcares en condiciones ácidas (caramelización) durante los tratamientos térmicos aplicados a los alimentos también origina la formación de este compuesto (23). El contenido de HMF ha sido evaluado en diversos alimentos, entre los que se pueden citar formulas infantiles (33) y NE (50). Así mismo se ha demostrado que concentraciones de HMF superiores a 100 mM inducen daño en el ADN celular, además se debe considerar que la exposición humana al HMF es mucho mayor que la de muchas otras toxinas alimenticias genotóxicas inducidas por los tratamientos térmicos como la acrilamida y el furano (51).

El furfural es un compuesto furánico que se produce en las reacciones de degradación del ácido ascórbico, caramelización y RM, en las etapas intermedias cuando el carbohidrato implicado es una pentosa. Este compuesto es formado durante tratamientos térmicos, deshidratación o almacenamiento a temperaturas inadecuadas de alimentos e ingredientes proteicos usados para la elaboración de

formulas infantiles y NE (33,52). Así mismo ha sido evaluado en sistemas modelo proteína-carbohidrato y en muestras de NE (50).

El aminoácido más estudiado es la lisina debido a sus dos grupos amino, uno de ellos terminal (13,53), el cual es un indicador de ambas fases de la RM (tempranas y avanzadas). Los métodos químicos utilizados se basan en la medida de la lisina disponible o reactiva. El grupo ϵ -amino libre puede reaccionar con agentes específicos y esto da lugar a los diferentes métodos de análisis (19). El daño nutricional y funcional de las proteínas durante las diferentes etapas de procesamiento y almacenamiento, puede ser producido principalmente por la RM bajo condiciones adversas de temperatura y atmósfera. El deterioro nutricional se atribuye principalmente a la reducción de la disponibilidad de la lisina y ha sido utilizado como indicador de la calidad proteica en formulas infantiles (15).

El desarrollo de las RM y de caramelización producen compuestos que absorben entre 250 y 300 nm. Cuando se presenta en medio ácido o en exceso de glucosa las sustancias responsables de la absorbancia son el HMF, que absorbe a 284 nm, y su producto de degradación, el ácido levulínico, que absorbe a 265 nm (54). En la etapa final de la RM se produce la condensación de compuestos aminados y fragmentos de azúcar en proteínas polimerizadas y pigmentos marrones, llamados melanoidinas, los cuales absorben a 420 nm (55) y que han sido evaluadas en productos alimenticios como: café, cacao, pan, malta, miel (56) y NE (50).

En la actualidad muchos estudios se han enfocado en demostrar y determinar el potencial neurotóxico, carcinogénico y genotóxico de los productos de la RM, teniendo en cuenta la permanente exposición y que estos son absorbidos a través de las células intestinales antes de entrar en la circulación sanguínea y posteriormente al hígado; la citotoxicidad se ha investigado sólo en células Caco-2 y células intestinales normales (FH 74) en concentraciones altas de concentrado de proteína del suero de leche (HWPC). Un aumento en la concentración hasta

4.0 mg de proteína mL⁻¹ redujo significativamente la supervivencia de las células Caco-2 y FH 74 (57).

La citotoxicidad de HWPC calentado a 80°C durante 30 minutos en células humanas de carcinoma colorrectal (Caco-2) ha sido demostrada cuando se añade una concentración de HWPC de 2.0 mg de proteína mL⁻¹ (57). Adicionalmente, la supervivencia celular con 2.5 mg de proteína mL⁻¹ se redujo a casi el 60% lo cual podría deberse a la toxicidad de los productos de la RM generados durante el tratamiento térmico a 80° C durante 30 min del HWPC (57). Probablemente los productos de la Reacción de Maillard (PRM) formados durante el tratamiento térmico a 80 °C durante 30 min, junto con la reducción de la capacidad antioxidante, jugaron un papel significativo en la citotoxicidad de células Caco-2 y células normales intestinales humanas (FH 74). Al parecer, la presencia de los PRM en HWPC a concentraciones superiores de 2.0 mg de proteína mL⁻¹ es citotóxico, tanto para las células cancerosas como para las células normales (57).

Estudios han evaluado la calidad proteica de las nutriciones enterales y han determinado la presencia de subproductos de la RM generados por el calentamiento térmico (5,11,44,53,58,59) encontrando estos subproductos en diferentes concentraciones, dependiendo de la cantidad inicial de aminoácidos y de azúcares en la formulación y de los diferentes procesos térmicos a los cuales hayan sido sometidos durante su elaboración y conservación.

Dichos estudios demuestran disminución de la lisina disponible al ser sometidos a procesos térmicos y se puede evidenciar que las mayores pérdidas se presentan cuando se aumenta el tiempo y la temperatura del calentamiento y cuando se usa lactosa en la formulación (59).

Algunos autores han analizados diferentes sistemas modelo de azúcares y proteínas con el fin de determinar los sistemas que presentan mayores pérdidas en la calidad nutricional, también se ha evaluado la disminución de algunos de los

componentes de la nutrición enteral como las vitaminas, las cuales pueden sufrir pérdidas entre un 4 y 5 % luego de un mes de almacenamiento; pérdidas de tiamina entre 13 y 59 % en un periodo de 6 meses y vitamina E en un 4 % durante el mismo periodo (60). En otras publicaciones, se ha informado de la presencia de maltulosa en formulaciones enterales comerciales líquidas, la cual es un isómero de la maltosa y se propone la pertinencia de la relación maltosa/maltulosa como un indicador que permita realizar una evaluación del tratamiento térmico durante la fabricación y controlar las condiciones de almacenamiento del producto (58,61).

Todos estos estudios destacan la importancia de aumentar y mejorar los controles a los procesos de fabricación de los diferentes ingredientes de las nutriciones enterales, con el fin de disminuir la pérdida de la calidad nutricional y el contenido de subproductos de la RM como el HMF, furfural y furosina, y la posible presencia de compuestos tóxicos como la acrilamida (AA); además es necesario disminuir la exposición de los pacientes a estos compuestos furánicos (62).

En la actualidad los diferentes estudios realizados orientados al daño térmico, disminución de la calidad nutricional y presencia de los productos de la RM en nutriciones enteral son pocos, debido a que estas investigaciones se encuentran enfocadas a productos de consumo habitual. En Colombia hasta el momento no se han evaluado las características de las NEP comercializadas y se desconocen los efectos de los tratamientos térmicos. Los datos disponibles son de nutriciones comercializadas en otros países, de ahí la importancia de conocer la calidad nutricional, daño térmico y posible efecto tóxico de los productos comercializados en nuestro país, que permitan crear parámetros de calidad en el país.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la calidad proteica y daño térmico en nutriciones enterales poliméricas comercializadas en Colombia.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar el daño térmico de las nutriciones mediante el uso de indicadores químicos.
- Conocer el contenido de lisina útil en las nutriciones enterales.
- Establecer relaciones entre lisina útil e indicadores de daño térmico.
- Valorar la utilidad de los indicadores de daño térmico en el control de calidad de las nutriciones.
- Proponer parámetros de calidad para este tipo de nutriciones en el país.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Muestras y reactivos

Se evaluaron 10 nutriciones enterales poliméricas comerciales (Tabla 2), las cuales fueron adquiridas de los principales distribuidores del país y que son frecuentemente usadas como apoyo y soporte en instituciones de salud con pacientes que presentan diferentes necesidades nutricionales. Las nutriciones se seleccionaron teniendo en cuenta su composición y su alta utilización en la implementación del soporte nutricional enteral.

Tabla 2. Composición según etiqueta de las Nutriciones enterales poliméricas

Muestra	Tipo	Densidad Calórica (Kcal/mL)	% Proteína	% Carbohidratos
1	Normoproteica	1.05	Proteína de la leche, proteína de soya 3.8	Maltodextrina, Sacarosa, Fructooligosacáridos 17.3
2	Normoproteica	1.0	Caseínatos, proteína de soya 4.0	Maltodextrina, Jarabe de maíz 14.0
3	Normoproteica concentrada	1.50	Caseínatos, proteína de soya 6.24	Maltodextrina, Sacarosa 20
4	Normoproteica concentrada	1.50	Caseínatos 6	Maltodextrina, Sacarosa 16.92
5	Normoproteica con fibra	1.0	Caseínatos 4	Maltodextrina, Fructooligosacáridos 14.1
6	Normoproteica con fibra	1.05	Caseínatos, proteína de soya 3.7	Maltodextrina, Sacarosa, Fructooligosacáridos 17.7
7	Hiperproteica	1.50	Proteínas de la leche 7.5	Maltodextrina 17
8	Hiperproteica	1.05	Caseínatos, proteína de la soya, proteínas del suero 5.48	Maltodextrina, Sacarosa 13.5
9	Hiperproteica	1.20	Caseínatos 5.57	Maltodextrina 15.82
10	Hiperproteica	1.0	Caseínatos 6.4	Jarabe de maíz, Maltodextrina, Dextrosa 11.2

Todos los reactivos químicos usados fueron de grado analítico. Metanol (grado HPLC), acetonitrilo (grado HPLC), acetato de sodio, ferrocianuro potásico, acetato de zinc, etanol, bicarbonato de sodio, hidróxido de sodio y ácido acético glacial se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania), ácido clorhídrico se obtuvo en JT Baker (Xolostoc, México), cartuchos LiChrolut[®] RP-18 se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania). La N-ε-2,4-dinitrofenilo-lisina (DNP-L-lisina) HCl y 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzeno (FDNB) se adquirieron de Sigma-Aldrich (San Luis, USA). 5-(hidroxymethyl)-furfural y 2-furaldehído se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania). Furosina se obtuvo de PolypeptideGroup (Estrasburgo, Francia).

6.2. Métodos

6.2.1. Furosina

Para la determinación de furosina se siguió la metodología descrita por Contreras-Calderón *et al.* (33) y Mesías *et al.* (63) con algunas modificaciones, la cual se basa en la determinación por cromatografía líquida de alta resolución del e-N-furoilmetil-L-lisina (furosina) generada mediante hidrólisis ácida de las proteínas. Se pesaron aproximadamente 3 g de muestra los cuales fueron hidrolizados con 8 mL de HCl 7.95 M (equivalentes a aproximadamente 18 mg de proteína mL⁻¹ de ácido) durante 24 horas a una temperatura de 110 °C en tubos tapa rosca con teflón, previamente burbujeados con nitrógeno por 1 minuto. Luego el hidrolizado fue filtrado a través de papel de filtro cualitativo (Boeco, grado 3 hw diámetro 125 mm). Posteriormente se tomaron 500 µL del filtrado y se pasaron por un cartucho LiChrolut[®] RP-18 previamente activado con 5 mL de metanol y 10 mL de agua desionizada. La furosina retenida en el LiChrolut[®] RP-18 fue extraída posteriormente con 3 mL de HCl 3 N, tras lo cual el ácido fue evaporado en capsulas sobre baño maría a 92 °C. La muestra seca fue diluida en 3.0 mL de Acetato de Sodio 0.06 M a pH 4.3. La solución fue

pasada por un filtro de 0.2 μm (Agilent), analizada en fase reversa en un HPLC Shimadzu Prominence LC-20AD, equipado con bomba de gradiente cuaternaria (DGU-20A5), detector de arreglo de diodos (SPD-M20A), módulo de comunicación (CBM-20A), automuestreador (SIL-20A HT), controlado por el software LC Solution. La furosina fue separada usando una columna cromatográfica Merck LiChospher 100 RP-8 (5 μm) in LiChroCART 250-4. La fase móvil usada fue acetato de sodio a 0.06 M ajustado a pH 4.3 con ácido acético (Merck), el volumen de inyección de las muestras fueron de 50 μL a un flujo de 1.0 mL min^{-1} en condiciones isocráticas y la longitud de onda del detector fue 280 nm. El tiempo de análisis de la muestras fue de 15 minutos y se realizó por duplicado. Furosina (entre 0.001296 y 0.066120 mg mL^{-1}) fue cuantificada usando el método de estándar externo.

6.2.2. HMF y Furfural

Para la determinación de HMF se usó la metodología descrita por Contreras-Calderón *et al.* (33) y Mesías *et al.* (63) con algunas modificaciones. Se pesaron aproximadamente 3 g de muestra en tubos Falcon de 50 mL a los cuales se adicionaron 7 mL de agua desionizada, 1.5 mL de las disoluciones clarificantes, Carrez I (Ferrocianuro potásico al 15% (Merck)) y Carrez II (acetato de zinc al 30% (Merck)) y se agitó en un vortex hasta completa homogenización. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 4500 r.p.m y el sobrenadante se filtró a través de papel filtro cualitativo (Boeco, grado 3 hw diámetro 125 mm) y recogió en un balón volumétrico de 25 mL. Este procedimiento se repitió una vez más juntando los sobrenadantes obtenidos y aforando con una solución de Agua – Acetonitrilo (95:5). Se filtró a través de un filtro de 0.2 μm (Agilent) antes de ser inyectado en el HPLC descrito anteriormente. El HMF y furfural fueron separados usando una columna cromatográfica Merck LiChospher 100 RP-18 (5 μm) in LiChroCART 250-4. La fase móvil usada fue acetonitrilo para HPLC (Merck) - agua desionizada (5:95), el volumen de inyección de las muestras fueron 50 μL a un

flujo de 1.0 mL min^{-1} en condiciones isocráticas, la longitud de onda del detector fue 280 nm. El tiempo de análisis de las muestras fue de 15 minutos y se realizó por triplicado. HMF (entre 0.005 y 1.5 ppm) y furfural (entre 0.00500 y 0.2 ppm) fueron cuantificados usando el método de estándar externo.

6.2.3. Lisina útil

Se determinó por cromatografía líquida de alta resolución del derivado N- ϵ -dinitrofenil-lisina (N- ϵ -DNP-lisina) obtenido tras hidrólisis ácida de las proteínas y formado por reacción del grupo ϵ -amino libre de la lisina con el fluorodinitrobenceno (FDNB). El método que se siguió para la determinación de lisina útil está basado en el propuesto por Ramírez-Jiménez *et al.* y Contreras *et al.* (33,35) con algunas modificaciones. Para la formación de los derivados de FDNB, se adicionó 1.0 mL de una dilución $1 \text{ g } 10 \text{ mL}^{-1}$ (equivalentes a aproximadamente 4 mg de proteína) de las muestras en tubos con tapón de rosca y teflón, junto con 1.0 mL de NaHCO_3 y 1.5 mL de FDNB (3% FDNB en etanol), se agitó durante tres horas a temperatura ambiente y se evaporó el etanol por inmersión en un baño María a $95 \text{ }^\circ\text{C}$. A los derivados de FDNB formados en las muestras se les adicionó 3.0 mL de HCl 7.95 N, se agitaron los tubos hasta eliminar el CO_2 y se introdujeron cerrados en estufa a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h. Luego se filtró (Boeco, grado 3 hw diámetro 125 mm), se ajustó el pH a 5 con una disolución de NaOH 6 M y NaHCO_3 1M (Merck) y se aforó a 25 mL con metanol – acetato de Sodio 0.01 M (Merck) pH 5 (1:1). A 3.0 mL de la solución anterior se le realizó una purificación con éter etílico (Merck) (tres veces) y se descartó la fase orgánica (fase superior). Las muestras se filtraron con filtros de $0.2 \text{ } \mu\text{m}$ (Agilent) y se inyectaron en el HPLC descrito anteriormente. La lisina fue separada con una columna cromatográfica: Merck LiChospher 100 RP-18 ($5 \text{ } \mu\text{m}$) in LiChroCART 250-4. La fase móvil usada fue Metanol – Acetato de Sodio 0.01 M (Merck) pH 5 (1:1), el volumen de inyección de las muestras fue de $50 \text{ } \mu\text{L}$ a un flujo de 1.0 mL min^{-1} en condiciones isocráticas, la longitud de onda del detector fue 360 nm. El

tiempo de análisis de las muestras fue de 10 minutos y se realizó por duplicado. e-DNP-lysine (entre 2 y 65 ppm) fue cuantificada usando el método de estándar externo.

6.2.4. Absorbancia a 420 nm

Se realizaron las lecturas de absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro UV-VIS de los compuestos hidrosolubles presentes en las NE los cuales fueron separados mediante centrifugación (64). Se usaron los mismos extractos obtenidos para el análisis de HMF y Furfural y se leyó absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Genesys 10 UV/VIS a longitud de onda de 420 y 600; la lectura a 600 nm es una medida de turbidez del agua, que se resta a la absorbancia a 420 nm para obtener la absorbancia real. Se usó como blanco una mezcla de Agua – Acetonitrilo (Merck) (95:5) y celdas de cuarzo (Thomas scientific 8490A09).

6.3. Análisis complementarios

6.3.1. Determinación de proteínas

El contenido proteico se determinó por estimación del contenido de nitrógeno, usando el método Kjeldahl AOAC no. 920.105 (65)

6.3.2. Determinación de pH

Se utilizó un pHmetro para determinar la concentración de hidrogeniones previa calibración del pHmetro antes de su uso con soluciones buffer 4 y 7 (Hanna) a 18°C (33,63).

6.3.3. Determinación de azúcares totales

La determinación de azúcares totales se llevó a cabo mediante espectrofotometría según la metodología descrita por Dubois et al. con algunas modificaciones (66).

6.4. Validación de los métodos

Todos los métodos fueron validados teniendo en cuenta parámetros como linealidad, la cual fue determinada por medio de una curva de calibración con rango de concentraciones esperadas presentes en la muestras. Se obtuvieron las ecuaciones de la línea recta para realizar la interpolación de los valores obtenidos, donde Y es el área del pico y X la concentración del compuesto, la cual se verificó con el coeficiente de determinación R^2 . Para la precisión se realizó la repetibilidad del análisis a una muestra preparada 9 veces de forma independiente e inyectada en el cromatógrafo; a su vez se realizó la precisión intermedia mediante la inyección nueve veces de una muestra y fueron verificadas mediante el coeficiente de variación de los datos obtenidos (CV). La exactitud fue evaluada a través del porcentaje de recuperación del estándar adicionado a una de las muestras a analizar y se evaluó por triplicado en tres niveles de la concentración (Alta, media, baja), se realizó la prueba C de Cochran para la comparación de varianzas. Los límites de detección y de cuantificación se determinaron como 3 y 10 veces la señal del ruido respectivamente (67–70).

6.5. Análisis estadístico

Para determinar las correlaciones existentes entre las muestras de NE de acuerdo a las 6 variables analizadas se usó estadística multivariable. Las correlaciones entre las variables se evaluaron por medio de pruebas de correlación de Pearson (nivel de significación del 95%) y los modelos lineales generalizados se usaron

para determinar la dependencia de los indicadores con la cantidad de precursores de la RM (azúcares y proteínas). Todos los análisis estadísticos se realizaron en StatgraphicsCenturion XVI®.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Furosina

Los resultados obtenidos en la validación del método para la determinación de Furosina en muestras de NE muestran que los métodos son fiables y garantizan el correcto análisis de las muestras (Tabla 3). La linealidad obtuvo un R^2 de 0.9932, el coeficiente de variación para la precisión fue de 1.03% y 2.4% en precisión intermedia y repetibilidad respectivamente, los porcentajes de recuperación del compuesto en 3 niveles de concentración (baja, media, alta) fueron de 93.6%, 92.4% y 89.3%, y los límites de detección y cuantificación fueron de 6.873 y 6.903 mg 100 g⁻¹ proteína respectivamente.

Tabla 3. Validación de Furosina

Parámetro	Valor
Linealidad (R^2)	0.9932
Precisión intermedia (%CV)	1.03
Repetibilidad (%CV)	2.40
Exactitud (% de recuperación) concentración alta	89.3
Exactitud (% de recuperación) concentración media	92.4
Exactitud (% de recuperación) concentración baja	93.6
Límite de detección (mg 100 g ⁻¹ proteína)	6.873
Límite de cuantificación (mg 100 g ⁻¹ proteína)	6.903

Se observó un amplio rango de furosina en las nutriciones analizadas (Tabla 4) con valores que oscilaron entre 61.3 y 183.2 mg 100 g⁻¹ de proteína para las muestras 3 y 10 respectivamente, por lo que se puede decir que la muestra 10 presenta mayor daño térmico en las etapas iniciales de la RM. Esto puede ser debido a que pudo ser sometida a condiciones drásticas durante el proceso de elaboración o almacenada durante largos periodos bajo condiciones inadecuadas (tiempo, temperatura, humedad, etc.) (33). Adicionalmente presenta dextrosa (azúcar reductor) en su composición, que favorece la formación de subproductos

de la RM como furosina, la cual es generada mediante la hidrólisis de los compuestos de amadori formados entre los grupos ϵ -amino de la proteína y los azúcares reductores glucosa, lactosa y matosa (5,33,71).

Tabla 4. Contenido de Furosina en NE comercializadas en Colombia

Muestra	Furosina (mg/100g proteína)
1	62.577 \pm 2.41
2	80.080 \pm 2.48
3	61.267 \pm 0.04
4	105.500 \pm 3.11
5	118.197 \pm 1.11
6	83.694 \pm 5.19
7	119.552 \pm 1.29
8	93.693 \pm 1.69
9	117.096 \pm 8.06
10	183.195 \pm 6.99

Las muestras 1 y 3 presentaron los valores más bajos para este indicador, por lo que se puede inferir que tuvieron tratamientos térmicos menos drásticos durante su elaboración y que los ingredientes empleados presentaban menor daño térmico (33).

Durante las diferentes etapas del procesamiento de NE líquidas se han reportado valores de furosina entre 346.6 y 744.7 mg 100 g⁻¹ de proteína, donde los valores más altos corresponden a las etapas del procesamiento con bajo tratamiento térmico y con las muestras de bajo contenido proteico, dichos valores de furosina pueden derivarse del proceso de secado y purificación de los ingredientes y durante el mezclado y emulsión de los componentes; a medida que la intensidad del tratamiento térmico aumenta, la RM avanza por lo cual la furosina comienza a degradarse y se empiezan a generar otros compuestos (5). En NE comerciales

liquidas compuestas por: maltodextrinas, proteínas de la leche, algunas con lactosa y sacarosa, se han determinado valores entre 245.4 y 441.0 mg 100 g⁻¹ de proteína, diferencias originadas debido a las variaciones en los procesos de elaboración y a las proporciones de los componentes (5). Otros autores reportaron valores para furosina en NE enterales en polvo luego de ser reconstituidas entre 85.4 y 306 mg 100 g⁻¹ de proteína para formulas compuestas por mono, di y polisacáridos e hidrolizados de lactoalbumina, siendo la muestra con mayor valor de furosina la compuesta por maltodextrina e hidrolizado de proteínas del suero, determinándose que a pesar de evaluar fórmulas de similares composiciones las variaciones en el contenido de furosina dependían de la calidad de cada uno de los ingredientes utilizados y del daño térmico presente en estos (58).

En formulas infantiles, productos elaborados con ingredientes y procesos similares a los usados en la NE, también se ha evaluado furosina durante las etapas del procesamiento (mezcla de proteínas y carbohidratos, adición de aceite y secado por spray dry) obteniendo valores entre 55.4 y 1937 mg 100 g⁻¹ de proteína, donde los mayores valores se presentaron en las formulas compuestas por proteínas del suero y lactosa, los cuales son altamente reactivos a la RM, siendo la etapa de secado donde se presentaron los incrementos más significativos debido a la alta temperatura del proceso (72).

La variación en la cantidad de furosina durante el almacenamiento de formulas infantiles fue evaluado por Guerra *et al.* (13) obteniendo valores de 701 mg 100 g⁻¹ de proteína al inicio de la conservación y de 854 y 1054 mg 100 g⁻¹ de proteína tras 15 y 90 días respectivamente bajo atmosfera de oxígeno a 20 °C y de 1027 y 932 mg 100 g⁻¹ de proteína en atmosfera de nitrógeno. Los valores aumentaron durante el almacenamiento a 55 °C obteniendo valores de 2158 y 2936 mg 100 g⁻¹ de proteína en atmosfera de oxígeno tras 15 y 90 días respectivamente y de 3401 y 1382 mg 100 g⁻¹ de proteína en atmosfera de nitrógeno tras 15 y 90 días; los incrementos observados se debieron principalmente al aumento de la temperatura de almacenamiento en presencia de oxígeno el cual favorece la reacción de

formación del compuesto, adicionalmente en etapas finales de la RM el aumento de furosina no se da linealmente con la severidad de las condiciones de almacenamiento.

En sistemas modelos de NE (caseínatos de calcio, proteínas del suero, maltodextrinas y lactosa) calentados a 120 °C durante 120 min se obtuvieron valores iniciales antes del calentamiento entre no detectado y 1272 mg 100 g⁻¹ de proteína y luego del tratamiento térmico se observó una disminución en el contenido de furosina con valores entre 31.1 y 405.9 mg 100 g⁻¹ de proteína, lo cual es debido a la degradación de la furosina en etapas intermedias de la RM (5). De forma similar ocurrió en sistemas modelos (caseína – lactosa y caseína – maltodextrina) donde a tiempo cero de calentamiento se encontraron valores de 60.3 y 60.9 mg 100 g⁻¹ de proteína respectivamente, lo cual es debido al daño inicial de los ingredientes usados; luego del calentamiento a 100, 120 y 140 °C durante 30 min se observó un incremento en las dos primeras temperaturas durante todo el tiempo de proceso, sin embargo a 140 °C los valores de furosina mostraron una disminución tras 20 min, alcanzando valores máximos de 369 y 251 mg 100 g⁻¹ de proteína en sistemas modelo con lactosa y maltodextrina respectivamente, y mínimos de 316 y 194 mg 100 g⁻¹ de proteína tras 30 min (32). La disminución en los valores furosina pueden ser debidos a que la constante de velocidad de formación los compuestos de amadori después de la etapa inicial de la RM es similar a la tasa de degradación de los productos en las etapas siguientes de la RM de modo que los niveles de furosina disminuyen (32).

Rufian *et al.* (30) evaluaron el contenido de furosina en suplementos proteicos comerciales para deportistas, reportando valores entre 2.8 a 1125.7 mg 100 g⁻¹ de proteína para suplementos que contenían aislado de proteína de suero y concentrado de proteína del suero respectivamente; el alto valor asociado a este último ingrediente puede ser debido al daño generado durante su extracción y purificación, lo cual es debido a la mayor proporción de lactosa en comparación con el contenido de proteína (73).

En ingredientes proteicos usados para la elaboración de fórmulas infantiles, los cuales también son usados en la elaboración de NE, han mostrado valores de furosina entre 1.36 y 1435 mg 100 g⁻¹ de proteína, donde los valores más bajos fueron encontrados en hidrolizados de proteína (1.36 a 20.3 mg 100 g⁻¹ de proteína) y los más altos para las proteínas de suero (354 a 1435 mg 100 g⁻¹ de proteína), los caseínatos y aislados de la soya obtuvieron valores intermedios (22.8 a 60.5 y de 5.85 a 33.8 mg 100 g⁻¹ de proteína respectivamente). El mayor contenido de furosina encontrado en las proteínas del lactosuero es debido a la mayor cantidad de azúcares reductores (lactosa) en comparación con los demás ingredientes por lo cual se presentan una mayor reactividad (33). De igual manera Rufián-Henares *et al.* (5) reportaron mayores valores de furosina (1264 mg 100 g⁻¹ de proteína) en proteínas del lactosuero usados en la elaboración de formulas enterales.

En general los valores obtenidos en las muestras estudiadas en el presente trabajo están por debajo de los reportados en la literatura, lo que indica que las NE comercializadas en Colombia tienen un bajo daño térmico en las etapas iniciales de la RM. Esto puede ser debido al uso de ingredientes proteicos con bajo daño térmico y poco reactivos, como son los caseínatos, proteínas de soya (33), así como el uso de azúcares de baja reactividad como los fructooligosacaridos y maltodextrinas (74). Así mismo puede ser debido a que fueron sometidas a tratamientos térmicos y tiempos de conservación moderados. Teniendo en cuenta los valores de furosina encontrados en el presente trabajo y en la literatura se podrían proponer valores para las NE comercializadas en Colombia entre 200 y 400 mg 100 g⁻¹ de proteína, los cuales son superiores a los encontrados en este estudio, pero muy inferiores a los reportados en otros trabajos. Estos valores garantizan un bajo daño térmico y un mayor valor biológico de las NE.

7.2. HMF y Furfural

Los resultados obtenidos para la validación de los métodos para la determinación de HMF y furfural en muestras de NE muestran que los métodos son fiables y garantizan el correcto análisis de las muestras (Tabla 5). Los valores R^2 obtenidos para la linealidad fueron de 0.9985 y 0.9947 para HMF y furfural respectivamente, los coeficientes de variación para la precisión fueron de 0.20% y 0.98% en precisión intermedia y de 0.3% y 1.1% para la repetibilidad respectivamente para HMF y furfural, los porcentajes de recuperación de los compuestos en 3 niveles de concentración (baja, media, alta) fueron de 103.9%, 99.3% y 98.0% para HMF y de 97.9%, 98.9% y 102.4% para furfural, los límites de detección fueron de 0.102 y 0.060 mg 100 g⁻¹ de proteína y los límites de cuantificación fueron de 0.111 y 0.078 mg 100 g⁻¹ de proteína respectivamente para HMF y furfural.

Tabla 5. Validación de HMF y Furfural

Parámetro	HMF	Furfural
Linealidad (R^2)	0.9985	0.9947
Precisión intermedia (%CV)	0.20	0.98
Repetibilidad (%CV)	0.3	1.10
Exactitud (% de recuperación) concentración alta	98.0	102.4
Exactitud (% de recuperación) concentración media	99.3	98.9
Exactitud (% de recuperación) concentración baja	103.9	97.9
Límite de detección (mg 100 g ⁻¹ proteína)	0.102	0.060
Límite de cuantificación (mg 100 g ⁻¹ proteína)	0.111	0.078

En todas las muestras evaluadas de NE se pudo determinar la presencia de estos productos de la degradación de los compuestos de amadori (31) lo cual puede indicar que las NE fueron elaboradas con ingredientes que ya contenían dichos compuestos (33) o que sufrieron daño térmico durante su elaboración o conservación, provocando la generación de los productos intermedios de la RM (31,49,75). Los valores obtenidos en las muestras (Tabla 6) estuvieron entre 0.149 y 1.107 mg 100 g⁻¹ de proteína para el HMF y entre 1.385 y 6.745 mg 100 g⁻¹ de proteína para el furfural. Las muestras 1, 5 y 6 fueron las que presentaron

mayores valores de HMF y las muestras 1, 5 y 8 mayores valores de furfural. De esta forma se podría decir que estas muestras son las de mayor daño térmico, especialmente las muestras 1 y 5 cuyos valores fueron los más altos. La muestra 1 está compuesta por proteína de la leche, proteína de soya, maltodextrinas, sacarosa y fructooligosacáridos, mientras que la muestra 5 está elaborada con caseínatos, maltodextrinas, fructooligosacáridos y fibra.

Tabla 6. Contenido de HMF y Furfural en NE comercializadas en Colombia

Muestra	HMF		Furfural	
	mg/100g proteína	mg/Kg	mg/100g proteína	mg/Kg
1	0.410 ± 0.01	0.139 ± 0.004	6.745 ± 0.23	2.293 ± 0.08
2	0.317 ± 0.02	0.117 ± 0.009	1.703 ± 0.63	0.630 ± 0.23
3	0.380 ± 0.01	0.213 ± 0.005	1.970 ± 0.10	1.103 ± 0.06
4	0.273 ± 0.03	0.142 ± 0.013	1.385 ± 0.21	0.720 ± 0.11
5	1.107 ± 0.03	0.376 ± 0.010	3.372 ± 0.29	1.146 ± 0.10
6	0.548 ± 0.05	0.186 ± 0.016	2.010 ± 0.16	0.684 ± 0.05
7	0.149 ± 0.02	0.097 ± 0.011	1.499 ± 0.56	0.974 ± 0.36
8	0.211 ± 0.02	0.105 ± 0.008	2.167 ± 0.03	1.084 ± 0.01
9	0.239 ± 0.01	0.122 ± 0.005	2.099 ± 0.13	1.070 ± 0.07
10	0.276 ± 0.02	0.165 ± 0.010	1.693 ± 0.07	1.016 ± 0.04

El furfural es un indicador de sobrecalentamiento y se puede generar por degradación de HMF (76), lo cual indica un mayor daño térmico, por lo que en este caso la muestra 1 presentaría el mayor daño, lo cual puede ser debido no solo a un proceso térmico intenso, largos periodos de conservación (13,33,77,78), sino también a la posible presencia de proteínas del suero lácteo en su formulación, las cuales presentan alto daño térmico y por tanto presencia de estos compuestos (20), la sacarosa presente en la formulación, puede hidrolizarse a glucosa y fructosa a pH ligeramente ácidos bajo tratamientos térmicos severos, favoreciendo la RM (79), adicionalmente tanto la sacarosa como las maltodextrinas usadas como ingredientes ya contienen dichos compuestos (50). La menor presencia de

este indicador de la RM en las muestras restantes puede deberse a que durante el proceso de elaboración se usaron ingredientes con bajo daño térmico, almacenados bajo mejores condiciones o que durante su elaboración fueron sometidas a un tratamiento térmico leve o moderado.

Se puede observar que los valores obtenidos para el furfural son superiores a los valores hallados de HMF y a los reportados por otros autores, lo cual no es lo esperado, ya que por lo general se encuentran mayores contenidos de HMF, debido a que este generado a partir de hexosas (glucosa, fructosa, galactosa) (49), azúcares normalmente presente en los alimentos y el furfural a partir de pentosas (xilosa, ribosa, arabinosa) (33,52). Esto puede ser debido a la degradación del ácido ascórbico (80,81), el cual se encuentra en la composición de las NE (60), el cual produce una serie de derivados furánicos, de los cuales se considera al furfural como el producto principal (82–84). Vernin et al. (84) sugirieron que el furfural se genera principalmente por dos vías: la primera mediante la degradación por reacciones de deshidratación y de descarboxilación de 3-desoxipentosulosa y 3,4-didesoxipentos-3-en-ulosas; la segunda por la combinación de las vías hidroxiacetaldehído y piruvaldehído.

De acuerdo a la revisión realizada en la literatura, se encontró que existe muy poca información reportada sobre el contenido de estos compuestos en NE, ya que las principales investigaciones están encaminadas a la determinación de los compuestos en alimentos como; cereales, leche, zumos, miel y pan (75).

Rufian *et al.* (50) reportó valores de HMF y furfural en NE entre 0.05 y 19.1 mg L⁻¹ y desde no detectado a 0.72 mg L⁻¹ respectivamente. Estos mismos autores en un sistema modelo caseína-lactosa con tratamiento térmico a 120 °C durante 15 y 30 min reportaron valores de HMF entre 0.21 y 0.69 mg L⁻¹ y entre 0.04 y 0.1 mg L⁻¹ de furfural y en un sistema modelo caseína-maltodextrina la concentración de HMF no presentó cambios durante el calentamiento y furfural no fue detectado; luego de un mes de almacenamiento los valores reportados de HMF y furfural

respectivamente en el modelo caseína-lactosa fueron de 0.66 y 0.48 mg L⁻¹ y de 0.44 y 0.3 mg L⁻¹ en el modelo caseína-maltodextrina.

En productos de uso farmacéutico o nutricional, como los ingredientes proteicos usados en la elaboración de fórmulas infantiles se han reportado valores de HMF entre 0.05 y 2.47 mg 100 g⁻¹ de proteína para muestras de proteínas de soya y proteínas del lactosuero respectivamente (33). El alto valor de HMF en las proteínas del lactosuero se debe al alto contenido de lactosa y al proceso de secado al cual son sometidas durante su obtención; además las muestras de caseínatos, aislados de proteína e hidrolizados de proteínas del suero y de caseína no mostraron presencia de HMF, lo cual es debido al bajo contenido de azúcares y alto el contenido proteico (33). En fórmulas infantiles se han reportado valores entre 1.07 y 11.7 mg 100 g⁻¹ de proteína para HMF y entre 0.04 y 0.51 mg 100 g⁻¹ de proteína para furfural (19). Albalá *et al.*(85) reportaron valores para HMF y furfural en formulas infantiles en polvo (reconstituidas) y formulas liquidas, después de almacenarlas a tres temperaturas diferentes, el contenido de HMF para las muestras reconstituidas estuvo entre 15.0 y 34.7 μmol L⁻¹ (1.89 y 4.37 mg L⁻¹) y el furfural entre 1.8 a 6.8 μmol L⁻¹ (0.17 y 0.65 mg L⁻¹), en las muestras líquidas el contenido de HMF estuvo entre 9.0 a 12.2 μmol L⁻¹ (1.13 y 1.54 mg L⁻¹) y el furfural entre 1.4 a 2.3 μmol L⁻¹ (0.13 y 0.22 mg L⁻¹) (85).

En formulas infantiles en polvo adaptadas y de seguimiento se reportaron valores de 0.34 y 1.84 mg 100 g⁻¹ de proteína para HMF y entre no detectado y 0.08 mg 100 g⁻¹ de proteína para furfural respectivamente (86). Chávez *et al.* (78) evaluaron el contenido de HMF y furfural en fórmulas infantiles en polvo, luego de 12 meses de almacenamiento a 25 y 37°C, reportando valores entre 0.58 y 1.62 mg Kg⁻¹, y entre no detectado y 0.18 mg Kg⁻¹ respectivamente. En muestras de formulas infantiles se han obtenido valores para HMF entre 16.99 y 15689 ng g⁻¹ (0.017 y 15.69 mg Kg⁻¹) y de furfural entre no detectado y 22.73 ng g⁻¹ (0.023 mg Kg⁻¹) (81).

Rufian *et al.* (87) determinaron la ingesta total de HMF en la población Española en 10 mg día^{-1} (aproximadamente $170 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ por día, en un escenario de exposición medio) y 23 mg día^{-1} (aproximadamente $380 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ por día en un escenario de máxima exposición). Estimaciones similares de HMF se realizaron para la población Noruega por Husøy *et al.* (88) donde revelaron una estimación media y mediana de exposición a HMF de 5.56 y 3.04 mg día^{-1} , respectivamente (93 y $51 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ por día).

Se ha mencionado que el HMF induce efectos genotóxicos y mutagénicos en células bacterianas y humanas, y promueve el cáncer de colon en ratas (89). Sin embargo el panel de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el panel científico de aditivos alimentarios, aromatizantes, auxiliares tecnológicos y materiales en contacto con alimentos (AFC) llegaron a la conclusión que no existen datos disponibles suficientes para determinar su potencial genotóxico in vivo (40,90).

La EFSA estimó la ingesta de HMF de acuerdo con el enfoque de consumo máximo diario en $0.012 \text{ } \mu\text{g día}^{-1}$ (39) y el AFC en 1.6 mg día^{-1} basado en una mTAMDI (Ingesta diaria máxima agregada modificada) (90,91), estimación que se encuentra por encima del umbral de preocupación de $540 \text{ } \mu\text{g día}^{-1}$ derivado de estudios subcrónicos y crónicos en animales (92) para sustancias clase II como el HMF, por lo que se necesitan datos de exposición más exactos para una evaluación renovada por la EFSA. Zaitzev *et al.* (93) sugirieron una Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de 132 mg día^{-1} aplicando un factor de seguridad de 40.

Por su parte el furfural fue evaluado por el Comité Científico de la Alimentación (SCF) en el año de 2002, pero no pudo asignar un valor para la IDT, debido a que los datos no eran convincentes para demostrar la carcinogenicidad del furfural (94,95). El Comité de Expertos del Consejo de Europa sobre Sustancias Aromatizantes (CEFS) determinó la ingesta diaria máxima teórica de furfural en $0.136 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal (96). Otro estudio realizado durante 90 días para

evaluar la hepatotoxicidad del furfural en ratas, determinó con base al NOEL (niveles sin efecto observable) una concentración de $54 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ con un factor de seguridad de 100 y debido a que el dietilacetal de furfural se convierte rápidamente en furfural a pH fisiológico, se estableció una IDT para ambos compuestos de $0.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}$ (94).

En pacientes quemados donde el hipermetabolismo estimula el aumento de las necesidades proteico calóricas (97), un paciente (hombre de 32 años con un peso de 90 kg, 1.80 m de altura, grado de actividad de 1.2 y de estrés metabólico de 1.2) aplicando la fórmula para determinar la necesidades calóricas y proteicas de Harris-Benedict ($66.47 + (13.7 \times \text{Kg}) + (5 \times \text{talla en cm}) - (6.76 \times \text{edad en años})$) (98) ajustada con el grado de actividad y de estrés metabólico requeriría 2856 Kcal diariamente. Para suplir este requerimiento se necesitan 12 unidades al día de una NE (240 mL) con un aporte de 1.0 Kcal mL^{-1} . Si la NE seleccionada para el paciente fuera la muestra 5 que presento mayor contenido de HMF, al final del día el paciente habría consumido 1.27 mg día^{-1} ($(1.107 \text{ mg HMF}/100 \text{ g proteína}) \times (4 \text{ g proteína}/100 \text{ mL}) \times 240 \text{ ml} \times 12 \text{ unidades/día}$) de este compuesto y 3.88 mg día^{-1} ($(3.372 \text{ mg furfural}/100 \text{ g proteína}) \times (4 \text{ g proteína}/100 \text{ mL}) \times 240 \text{ ml} \times 12 \text{ unidades/día}$) de furfural. Además si el SNE fuera con la muestra 1 cuyo contenido de furfural fue el mayor, el consumo de HMF y furfural sería de 0.49 y 7.38 mg día^{-1} respectivamente, lo que en comparación con la IDA (HMF: 132 mg día^{-1} y Furfural: $0.5 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ que para este ejemplo correspondería a 45 mg día^{-1}) se encuentran por debajo de los valores recomendados, por lo que las NE analizadas no representan un riesgo para la salud del paciente.

No se encontró correlación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre HMF y furfural, lo que es inesperado, ya que es considerado que la formación de ambos es afectada por los mismos factores. Tampoco se encontró correlación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre HMF-furfural y furosina, lo cual también es inesperado ya que la furosina es un compuesto de Amadori formado a partir de lisina (99) a través de la condensación de azúcar-amino, que

posteriormente reacciona para formar una serie de compuestos intermedios de la RM como el HMF (100). Esto puede ser debido a que HMF y furfural ya pueden estar presentes en los ingredientes usados (carbohidratos) y no derivan de la RM durante el procesado. La falta de correlación se confirma con el bajo contenido de furosina en las NE, lo cual indicaría que las muestras se encuentran en etapas iniciales de la RM, y teniendo en cuenta que furosina es un indicador exclusivo de la RM, en este caso sería el indicador de elección para evaluar el daño térmico.

Teniendo en cuenta los valores de HMF y furfural encontrados en el presente trabajo y en la literatura se podrían proponer valores para las NE comercializadas en Colombia, inferiores a 5 mg 100 g⁻¹ de proteína y 15 mg 100 g⁻¹ de proteína respectivamente, los cuales son superiores a los encontrados en este estudio, pero inferiores o similares a los reportados en otros trabajos. Estos valores garantizan un bajo daño térmico y un mayor valor biológico de las NE.

7.3. Lisina útil

Los resultados obtenidos en la validación del método para la determinación de lisina útil en muestras de NE muestran que los métodos son fiables y garantizan el correcto análisis de las muestras (Tabla 7Tabla 7). La linealidad obtuvo un R² de 0.9999, el coeficiente de variación para la precisión fue de 0.07% y 2.8% en precisión intermedia y repetibilidad respectivamente, los porcentajes de recuperación del compuesto en 3 niveles de concentración (baja, media, alta) fueron de 91.7%, 94.3% y 94.1%, y los límites de detección y cuantificación fueron de 0.062 y 0.063 g 100 g⁻¹ proteína.

Tabla 7. Validación de Lisina útil

Parámetro	HMF
Linealidad (R^2)	0.9999
Precisión intermedia (%CV)	0.07
Repetibilidad (%CV)	2.8
Exactitud (% de recuperación) concentración alta	94.1
Exactitud (% de recuperación) concentración media	94.3
Exactitud (% de recuperación) concentración baja	91.7
Límite de detección ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ proteína)	0.062
Límite de cuantificación ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ proteína)	0.063

Los valores de lisina útil obtenidos en las muestras (Tabla 8) estuvieron entre 4.263 y 11.440 $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ de proteína. Las muestras 6, 7 y 8 fueron las que presentaron mayores valores. Las muestras con menor contenido fueron la 5, 9 y 10, siendo esta última la de menor valor. Los valores más bajos pueden ser ocasionados por el daño térmico presente en los ingredientes usados, ya que la composición en todas las NE es similar, también a los tratamientos térmicos a los que fueron sometidas durante su elaboración o las condiciones de almacenamiento (33,46,59). La muestra 6 con mayor contenido de lisina útil, está compuesta por maltodextrina, sacarosa y fructooligosacáridos, mientras que la muestra 10 está elaborada con jarabe de maíz, maltodextrina y dextrosa, este último altamente reactivo en la RM (71,80,101). El bajo valor de lisina útil de la muestra 10 coincide con el mayor contenido de furosina, lo cual indica que esta es la muestra con mayor daño térmico por la RM, el cual se encuentra en las etapas iniciales.

Tabla 8. Contenido de Lisina útil en NE comercializadas en Colombia

Muestra	Lisina (g/100g proteína)
1	7.297 ± 0.07
2	7.613± 0.17
3	7.744± 0.66
4	7.924± 0.20
5	6.853± 0.18
6	11.440± 0.17
7	10.131± 0.16
8	10.361± 0.03
9	6.180± 0.23
10	4.263± 0.03

El deterioro nutricional de la proteína se atribuye principalmente a la reducción de la disponibilidad de lisina (lisina útil), la cual es el aminoácido más reactivo debido a su grupo ϵ -amino libre (74,79,102,103) el cual ha sido usado como indicador de la severidad de los tratamientos térmico y las condiciones de almacenamiento en diferentes alimentos(33,74,79,86,104), además, la disminución de la disponibilidad de lisina indica una reducción en la eficiencia de la digestión de las proteínas por enzimas gástricas debido a la formación de isopéptidos o proteína de reticulación (101).

La disminución de lisina útil durante el procesado y almacenamiento de fórmulas infantiles en polvo a 20 y 37 °C durante 6 meses, fue estudiada por Ferrer *et al.* (86), donde la pérdida en formulas adaptadas con respecto a la leche cruda estuvo entre 15.7 y 24.8 % y para fórmulas de seguimiento entre 15.2 y 26.7 %. Las mayores pérdidas de lisina se encontraron tras el secado, lo que indica que el proceso de spray dry aplicado, contribuye a la disminución en mayor medida del contenido de lisina (86).

El contenido de lisina útil en diferentes ingredientes proteicos (caseínatos, proteínas del suero, hidrolizado de caseína y de proteínas del suero y proteínas de

soya) usados en la elaboración de formulas infantiles, ingredientes similares a los usados en la elaboración de NE, fue reportado por Contreras *et al.* (33) entre 1.85 y 7.91 g 100 g⁻¹ de proteína, donde los valores más bajos fueron para el hidrolizado de caseína y los más altos para el caseínato de calcio.

Rufian *et al.* (59) estudiaron el contenido de lisina útil en sistemas modelo (proteína-carbohidrato) que fueron sometidos a calentamiento a 100, 120 y 140 °C durante 30 min, reportando valores entre 2.360 y 8.791 g 100 g⁻¹ de proteína. Los porcentajes de pérdida de lisina debido al tiempo y temperatura de calentamiento estuvieron entre 38.5 y 72.09 % dependiendo la naturaleza de los componentes. Los sistemas modelos compuestos por lactosa y proteínas del suero presentaron mayores pérdidas, debido a la mayor reactividad de la lactosa a la RM y al alto contenido de lisina en las proteínas del suero. En todos los sistemas, las pérdidas fueron mayores cuando se incrementó el tiempo y la temperatura de calentamiento (59).

El efecto de las etapas del procesamiento (mezcla de ingredientes, adición de aceite y secado por spray dry) de formulas infantiles sobre el contenido de lisina útil fue investigado por Contreras *et al.* (72) reportando valores entre 4.48 y 8.04 g 100g⁻¹ de proteína, donde el contenido disminuía a medida que avanzaba el proceso de elaboración y los valores más bajos se obtuvieron luego del proceso de secado.

Otros autores han demostrado que formulas infantiles elaboradas con ingredientes proteicos de bajo daño térmico durante el proceso de esterilización pueden sufrir pérdidas nutricionales cercanas al 5%, medido como lisina útil, cuando la fuente de carbohidratos son maltodextrinas y si se utiliza lactosa la perdida podría ser el doble(80). Keiseker *et al.* (105) reportaron valores para la perdida de lisina disponible durante el almacenamiento de leches en polvo elaboradas a baja, media y alta temperatura, y conservadas a 10, 20, 30 y 40°C, las cuales fueron de

2, 6 y 12.1% cuando fueron almacenadas a 10 °C, y a 40 °C aumentaron a 23.5, 27.5 y 35.3%.

Se puede observar que a pesar de las similitudes en la composición de las muestras evaluadas el 70 % de los valores obtenidos (muestras 1, 2, 3, 4, 5, 9 y 10) son similares a los reportados por diversos autores para contenidos de lisina útil en ingredientes proteicos y muestras de similar composición a las NE y el 30 % de las muestras restantes (muestras 6, 7 y 8) son superiores, lo que se puede atribuir a la naturaleza de los ingredientes usados en la formulación, su influencia en el desarrollo de la RM y el daño térmico inicial presente en ellos (33,59,101). Los valores inferiores pueden ser debidos al daño térmico sufrido durante las etapas del procesado, debido a que tiempos prolongados de calentamiento a altas temperaturas generan mayores pérdidas (59,72), así como a las condiciones inadecuadas de almacenamiento a la que pudieron estar sometidas (58). La presencia de maltodextrinas en la composición puede generar menores pérdidas durante la elaboración en comparación con la lactosa, de igual forma sucede con el uso de caseína frente al uso de proteínas del suero (59), además, las muestras evaluadas son líquidas por lo que no fueron sometidas a procesos de secado (spray dry), el cual aumenta notoriamente la disminución de la lisina útil (33).

La calidad nutricional de una fuente proteica, es la capacidad que tiene de cubrir los requerimientos de nitrógeno y de aminoácidos en un individuo determinado (10). Las proteínas son la principal fuente de aminoácidos para el organismo en situaciones de estrés y su disminución representa la pérdida de proteína funcional y el aumento de la morbilidad y mortalidad (106). La importancia nutricional de la lisina útil aumenta cuando el alimento se utiliza como complemento de una dieta donde la lisina es limitante o está destinado a un grupo de población con altas necesidades nutricionales, debido a que la lisina es un aminoácido esencial (no sintetizados por el organismo) con un requerimiento diario en adulto sano de 45 mg g⁻¹ de proteína (106) o de 58 mg g⁻¹ de proteína como sugiere la FAO (107). Desde el punto de vista de la biodisponibilidad, la digestibilidad es el aspecto más

importante de los aminoácidos y proteínas, ya que determina la verdadera utilización digestiva, pero esta puede ser afectada por los tratamientos térmicos a la que es sometida; existen reportes donde comparan la calidad proteica de diferentes proteínas alimentarias desde la determinación de parámetros como el cómputo de aminoácidos, cómputo de aminoácidos corregido con la digestibilidad de la proteína, % de digestibilidad, índice de eficiencia proteica y su valor biológico, resultando que las proteínas del suero lácteo poseen un mayor valor biológico, índice de eficiencia proteica y cómputo de aminoácidos en comparación con las proteínas del gluten de trigo, (10).

Los requerimientos energéticos en pacientes con necesidades nutricionales especiales deben ser calculados preferiblemente por calorimetría o mediante la aplicación de alguna de las formulas destinadas para tal fin, además se debe garantizar que el objetivo terapéutico sea alcanzado entre 4 y 5 días, por lo que se debe elegir una NE que cubra los requerimientos de macro y micronutrientes de forma adecuada, la distribución y el tipo de nutrientes debe realizarse según las implicaciones metabólicas de la enfermedad de base y sus requerimientos (15). Los requerimientos nutricionales están conformados por las proteínas entre un 15 y 20 % del aporte calórico total, los carbohidratos entre el 50 y 60 % y los lípidos del 25 al 30 %, los requerimientos de proteína son de $0.8 \text{ g Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en un paciente sano y aumenta a entre 1.3 y $1.5 \text{ g Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en paciente enfermo, con un máximo de $2.2 \text{ g Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$; en cuanto a los carbohidratos entre 4 y $5 \text{ g Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en paciente sano y en paciente enfermo se aumenta sin superar $7 \text{ g Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y los lípidos en todos los pacientes entre 1 y $1.5 \text{ g Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (15,108–110).

Retomando el ejemplo mencionado anteriormente (apartado 7.2. HMF y Furfural) de un paciente quemado con un requerimiento proteico – calórico de 2856 Kcal, el cual debe consumir 12 unidades al día de una NE (240 mL) con un aporte de 1.0 Kcal mL^{-1} ; si la NE elegida fuera la muestra 10 cuyo valor de lisina útil fue el inferior, el aporte sería de 42.64 mg g^{-1} de proteína ($(4.264 \text{ g lisina}/100\text{g}) \times (1000 \text{ mg lisina}/1\text{g lisina})$), valor que está por debajo de las recomendaciones de la FAO

(107) y otros autores (106), por lo tanto no cubre las necesidades nutricionales del paciente, lo que supone demoras en la recuperación, aumento de las complicación, mayores tiempos y costos de tratamiento, poniendo en riesgo la salud de los pacientes (6–8). Por el contrario si la NE usada fuera la muestra 6 el aporte de lisina sería de 114.40 mg g^{-1} de proteína, valor ampliamente superior a las recomendaciones nutricionales, lo que contribuye a la efectividad del tratamiento, disminuyendo tiempos de estancia hospitalaria, de costos, de complicaciones y mejorando los procesos de cicatrización (6–8). Se puede observar que de las NE analizadas, el 90 % de las muestras cumplen con el aporte de lisina recomendado y solo el 10 % (muestras 10) no.

Se encontró una correlación negativa estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la furosina y lisina útil, lo cual era lo esperado, ya que durante las primeras etapas de la RM se da la formación de una serie de compuestos conocidos como compuestos de Amadori, donde el primer paso, es una condensación entre el grupo ϵ -amino de la lisina y el grupo carbonilo de los carbohidratos, lo que produce una disminución de la cantidad de lisina útil por el bloqueo del grupo ϵ -amino y un aumento de la furosina, debido a una posterior degradación de los compuestos de amadori (74). La disponibilidad de lisina o no ligada a carbohidratos es un buen indicador de daño térmico en NE en etapas iniciales de la RM, debido a que su disminución está relacionada directamente con los tratamientos térmicos, las condiciones de almacenamiento y posterior extensión de la RM (74,75,101).

No se encontró correlación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre lisina útil y HMF-furfural, debido a que la disminución de la disponibilidad de la lisina, se genera durante el desarrollo de las primeras etapas de la RM, mientras que HMF y furfural son productos de etapas intermedias, mediados por tratamientos térmicos intensos y condiciones de almacenamiento inadecuadas (13,26,55). Además el HMF y furfural no son específicos de la RM, ya que se pueden generar por caramelización o degradación del ácido ascórbico (50,79,80), por lo que ya

podrían estar presentes en los ingredientes de partida y no tener relación con la RM durante el procesado de las NE. Por otro lado cuando están presentes productos intermedios de la RM como HMF y furfural, la RM puede darse sin la competencia de los azúcares reductores, ya que estos productos presentan grupos carbonilo que reaccionan con la lisina, reduciendo su disponibilidad (111). En este último caso debería haber una correlación inversamente significativa entre HMF-Furfural y lisina útil, lo que indicaría que las NE se encuentran en etapas intermedias de la RM; sin embargo en las NE analizadas se puede afirmar que se encuentran en etapas iniciales de la RM y que el HMF y furfural presente en las NE no se deriva de la RM durante el procesado, si no que ya están presentes en los ingredientes.

La utilización de lisina útil como indicador de la calidad proteica en las NE, luego de ser sometidas a diferentes tratamientos térmicos y bajo diversas condiciones de almacenamiento, es efectivo debido a la alta reactividad del grupo ϵ -amino terminal del aminoácido en la RM (33,74,79,86,104).

Teniendo en cuenta los valores de lisina útil encontrados en el presente trabajo y en la literatura se podrían proponer valores para las NE comercializadas en Colombia, superiores a $7 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de proteína, el cuales es similar a los encontrados en este estudio y a los reportados en otros trabajos. Este valor garantiza un mayor valor biológico de las NE.

7.4. Absorbancia a 420nm

Los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las muestra analizadas (Tabla 9) se encuentran en el rango entre 0.002 y 0.025 para las muestras 7 y 3 respectivamente.

Tabla 9. Absorbancia a 420 nm de las NE comercializadas en Colombia

Muestra	Absorbancia
	420
1	0.015
2	0.019
3	0.025
4	0.018
5	0.007
6	0.017
7	0.002
8	0.022
9	0.018
10	0.015

Los mayores valores de absorbancia a 420 nm son debido a la presencia de melanoidinas, las cuales son compuestos formados en etapas finales de la RM de color oscuro y que han sido usadas como indicadores de daño térmico, son formadas por reacciones de condensación aldólica y polimerización entre grupos aldehído y amino presentes en los alimentos (24,28,32,33,44,56,79,112,113), las cuales se encuentran en alimentos ampliamente consumidos como: café, cacao, pan, malta y miel (56).

La absorbancia a 420 nm como indicador de los efectos inducidos por el calor durante el almacenamiento a 20, 30 y 55 °C por 36 semanas de fórmulas enterales fue evaluado por Rufian *et al.* (113), en muestras de composición similar, excepto por el contenido proteico (formula A (3.7 %) y B (5.4%)), reportando valores entre 0.004 y 0.305 para la formula A y entre 0.005 y 0.393 para B, indicando que los mayores valores obtenidos durante el almacenamiento para la formula B fueron debidos al mayor contenido de proteína en su formulación en comparación con la formula A.

La evolución de la RM medida como absorbancia a 420 nm en sistemas modelo de glutamina o arginina-dextrinomaltosa, calentados a 100, 120 y 140 °C entre 5 y 30 min, fue evaluado por Pastoriza *et al.* (28) reportando valores entre 0.007 y 8.892, donde los valores más altos se encontraron en los sistemas sometidos a mayores temperaturas y tiempos de calentamiento, lo que genera la formación de PRM en etapas finales. En sistemas modelos azúcar-caseína, Brands *et al.* (21) evaluaron la evolución de la RM usando glucosa, fructosa, galactosa, tagalosa, lactosa y lactulosa, tras ser calentados a 120 °C durante 20, 40 y 60 min, reportando valores de absorbancia entre 1.01 y 12.24.

La absorbancia a 420 nm también ha sido evaluada en diversos alimentos como indicador de daño térmico; es así como Delgado *et al.* (112) reportaron valores para platos típicos españoles entre 0.013 y 0.538, donde los valores más altos, correspondían a los platos sometidos a los tratamientos térmicos más severos; finalmente Rufian *et al.* (31) reportaron valores entre 0.380 y 6.448 para vegetales deshidratados.

Los valores de absorbancia obtenidos en el presente estudio son bajos y similares a los reportados por otros autores en formulas enterales y sistemas modelo previos al almacenamiento y calentamiento, así como similares a alimentos sometidos a tratamientos térmicos no muy severos; pero muy inferiores a los valores reportados tras el calentamiento y en alimentos sometidos a tratamientos térmicos severos, lo que indica que las NE evaluadas no fueron sometidas a tratamientos térmicos severos y que las condiciones de almacenamiento fueron adecuadas.

No existe una correlación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre absorbancia a 420 nm con furosina, HMF, furfural y lisina, indicando que el daño térmico presente en las NE se encuentra en etapas iniciales, lo que se confirma con los bajos valores de furosina hallados. La existencia de una correlación indicaría el avance de la RM, lo cual generaría compuestos de etapas avanzadas

como las melanoidinas que absorben a esta longitud de onda (56). Por lo tanto para estas muestras la furosina sería el indicador de elección.

Teniendo en cuenta los valores de absorbancia a 420 nm encontrados en el presente trabajo y en la literatura se podrían proponer valores para las NE comercializadas en Colombia entre 0.005 y 0.050, los cuales son superiores a los encontrados en este estudio, pero muy inferiores a los reportados en otros trabajos en NE y alimentos sometidos a calentamientos severos. Estos valores garantizan un bajo daño térmico y un mayor valor biológico de las NE.

7.5. Análisis complementarios

Se determinó el contenido de precursores de la RM (azúcares totales y proteína) presentes en las NE, además se midió el pH como variable que afecta el desarrollo de la RM (22). Los resultados obtenidos para proteína cruda, azúcares totales y pH se encuentran en la Tabla 10. La proteína cruda estuvo entre 3.4 y 6.5%, azúcares totales entre 3.22 y 8.88% y el pH entre 6.49 y 7.38.

Tabla 10. Análisis complementarios de NE comercializadas en Colombia

Muestra	Proteína cruda (%)	pH	Azúcares totales (%)
1	3.4	6.91	7.88
2	3.7	7.01	4.93
3	5.6	6.66	8.88
4	5.2	6.89	5.03
5	3.4	6.49	3.43
6	3.4	6.73	7.50
7	6.5	7.02	4.83
8	5.0	7.34	5.05
9	5.1	6.73	3.82
10	6.0	7.09	3.22

García *et al* (58) evaluaron el pH de NE en polvo luego de ser reconstituidas, reportando valores entre 4.91 y 7.63, los cuales son similares a los encontrados en el presente estudio. Por su parte Rufian (80) reporto la variación del pH en sistemas modelos de NE elaborados con caseína y glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetrosa y maltopentosa respectivamente, donde solo se observaron variaciones del pH en los sistemas con glucosa y maltosa.

Los valores de proteína encontrados son muy similares a los reportados en la etiqueta del producto, la mayor diferencia se encontró en la muestra 7 con una diferencia de 1 % a lo reportado en la etiqueta. Esta diferencia puede afectar significativamente la dosis proporcionada a los pacientes, prolongando los periodos de recuperación y aumentando los costos de hospitalización.

Debido a que se analizó azúcares totales y no carbohidratos, los valores obtenidos son inferiores a los reportados en la etiqueta.

7.6. Análisis de modelos lineales generalizados

El análisis de modelos lineales generalizados fue usado para determinar la dependencia de los indicadores con la precusores de la RM (azúcares y proteínas), donde se encontró una dependencia directa estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para la furosina con la proteína (Figura 4), que en un 80% de las muestras fue caseína, sola o en combinación, de forma que al aumentar su concentración, los valores del indicador también lo hacían, debido al mayor número de grupos ϵ -aminos disponibles para generar los denominados compuestos de amadori, cuya posterior hidrolisis forma la furosina (63,80). Por otro lado no se encontró dependencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre la furosina y los azúcares totales, ya que en todas las muestras se usaron maltodextrinas, como fuente única de carbohidratos o en combinación con otros

azúcares y/o carbohidratos, y estas tienen poca reactividad (80) por lo que un aumento en su concentración, no genera aumento en la evolución de la reacción.

Se encontró una dependencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre HMF y ambos precursores. En la Figura 2 se puede observar el comportamiento proyectado del modelo, cada calor indica la concentración del compuesto a diferentes valores de proteína y azúcares, al aumentar el contenido de proteínas, el valor de HMF disminuía, debido a la poca reactividad de las fuentes de proteína usadas en la formulación (50); por el contrario el HMF incremento al aumentar la concentración de azúcares, lo que se debe el daño térmico presente en los ingrediente usados en la elaboración de las NE (33), lo que confirma que el contenido de HMF en las NE no es debido al generado por la RM durante el procesado.

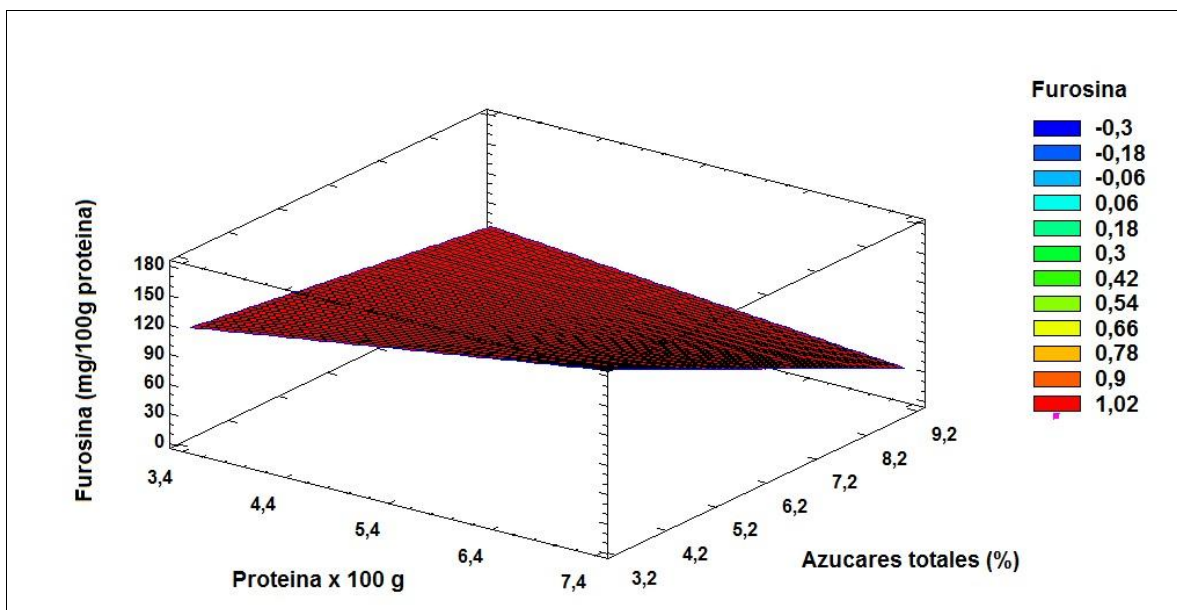


Figura 1. Superficie de respuesta estimada para furosina

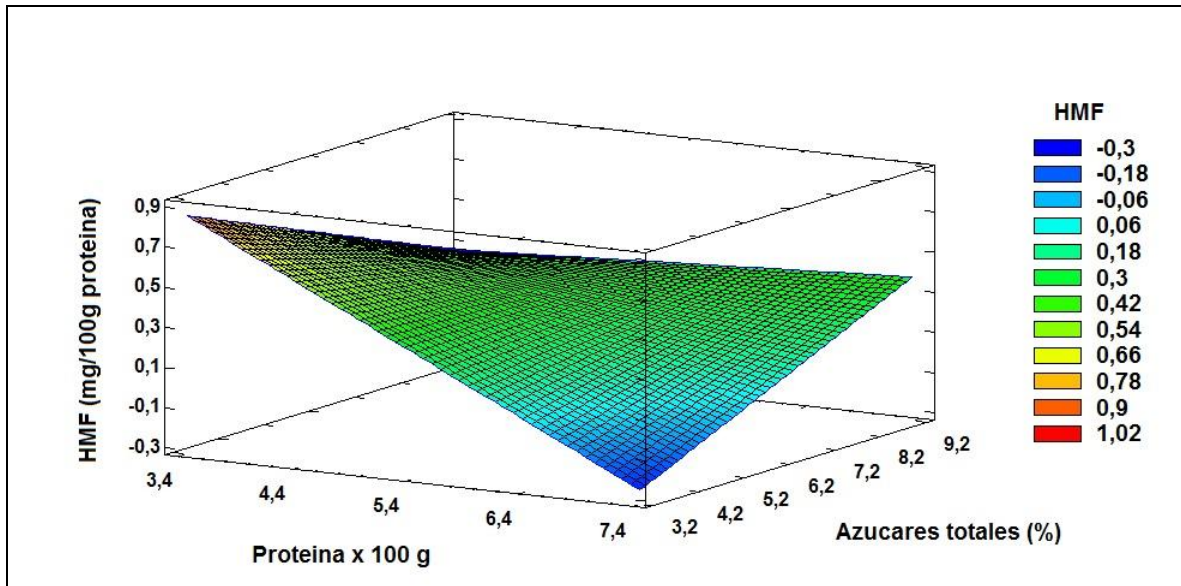


Figura 2. Superficie de respuesta estimada para HMF

Para furfural se encontró dependencia inversa estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre furfural y el azúcar contenido en las muestras (Figura 3), ya que al aumentar el contenido de azúcares, el valor de furfural disminuye, lo cual puede ser debido a la poca reactividad de que presentan los carbohidratos usados, lo que puede confirmar la teoría de que los altos valores de furfural pueden ser producto de la degradación del ácido ascórbico presente en las NE (80) y no a la RM durante el procesado. Por otro lado no se encontró dependencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre furfural y las proteínas, lo que ratifica que el furfural no es generado durante el procesado por la RM, y se confirma con el hecho de que al aumentar el contenido proteico el valor de furfural disminuye (Figura 6).

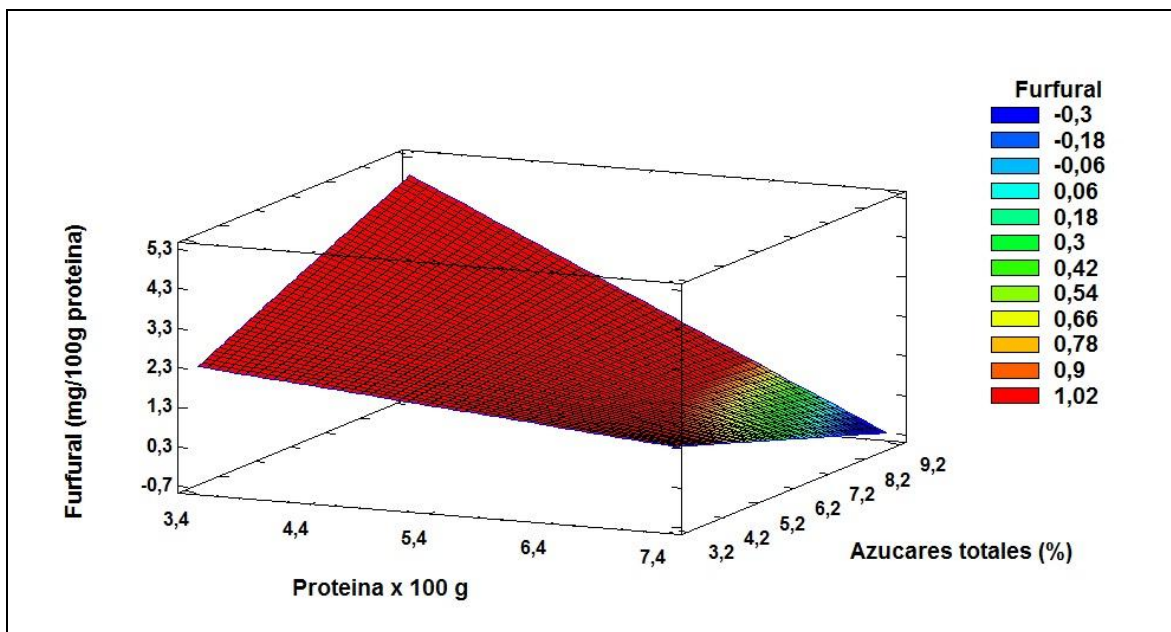


Figura 3. Superficie de respuesta estimada para furfural

EL pH y los precursores de la RM (Figura 4) mostraron una dependencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), debido al aumento del pH cuando se incrementa el contenido de las proteínas, las cuales tienen carácter básico (74) y la disminución de este al aumentar el contenido de azúcares que favorecen el desarrollo de la reacción (55).

No se encontró dependencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre lisina útil y absorbancia a 420 nm con los precursores de la RM, lo cual es inesperado para el caso de la lisina ya que se esperaría que a mayor contenido de proteína, mayor contenido de lisina como se observó para furosina, ya que la lisina es su precursor. Esta falta de correlación puede ser debido al diferente contenido de lisina en las diferentes mezclas de proteínas usadas en las NE analizadas, lo cual se podría explicar por el hecho de que el 50% de las muestras presentan en su formulación proteína de soya, las cuales tienen menor contenido de lisina útil en comparación con los caseínatos y lactosuero (33). En el caso de la absorbancia a 420 nm, la no dependencia confirma que las NE analizadas se encuentran en las

etapas iniciales de la RM y que los ingredientes usados no favorecen el desarrollo de la reacción, ni la formación de compuestos de etapas finales debido a su baja reactividad (5,33).

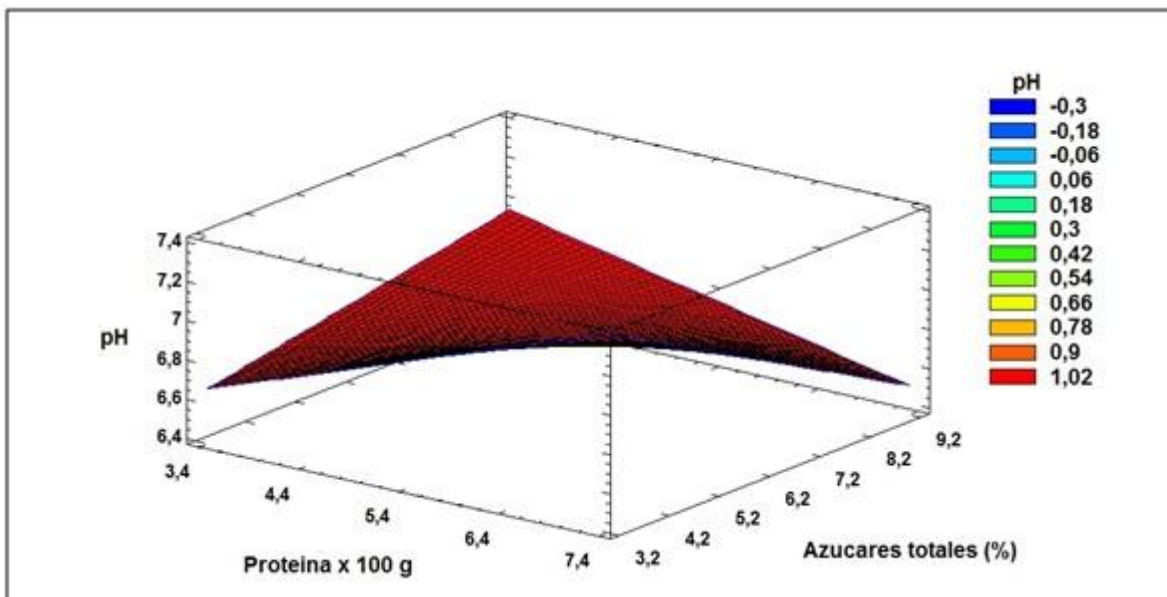


Figura 4. Superficie de respuesta estimada pH

8. CONCLUSIONES

Se evaluó la calidad proteica y daño térmico en NE poliméricas comercializadas en Colombia mediante la utilización de diferentes indicadores químicos.

Las NE comercializadas en Colombia analizadas mostraron bajo daño térmico debido a la buena calidad y baja reactividad de los ingredientes usados, siendo la furosina (indicador de etapas iniciales de la RM) el indicador de elección para evaluar el daño térmico en estas muestras.

Se analizó el contenido de lisina útil en NE comercializadas en Colombia, donde el 90% de las muestras cumple con el aporte de lisina recomendado por la FAO en adulto sano.

El consumo de la NE no representa un riesgo de toxicidad para las personas, ya que los niveles de compuestos con potencial tóxico como HMF y furfural se encuentran por debajo de los niveles máximos recomendados.

Se establecieron relaciones entre lisina útil y los indicadores de daño térmico, encontrándose únicamente relación inversa con furosina, lo que confirma la utilidad de estos indicadores para evaluar daño térmico y calidad proteica en NE.

Los indicadores de daño térmico son una herramienta útil para evaluar la calidad de las NE, sus ingredientes, procesos de elaboración, condiciones y tiempo de conservación a que son sometidos.

Con base a los resultados obtenidos, se proponen parámetros de calidad para las NE comercializadas en el país en función de los indicadores estudiados, los cuales permitirían garantizar una buena calidad nutricional.

El análisis de modelos lineales generalizados permitió conocer las diferentes dependencias de los indicadores de daño térmico y calidad proteica en función de sus precursores (proteínas y carbohidratos).

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Garcia A, Garcia P, Marse P, Planas M. El libro blanco de la denutricion clinica en Espana. 2004;1–126.
2. Galvez, Ricardo. Hirsch, Sandra. Klaassen J. Guías prácticas de soporte nutricional en unidades de cuidados intensivos e intermedio. *As Chi Nut.* 2011;32.
3. Dudrick SJ, Palesty JA. Historical highlights of the development of enteral nutrition. *Surg Clin North Am* [Internet]. Elsevier Inc; 2011;91(4):945–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2011.05.002>
4. Álvarez Hernández J, Peláez Torres N, Muñoz Jiménez A. Utilización clínica de la nutrición enteral. *Nutr Hosp.* 2006;21(2):87–99.
5. Angel Rufian-Henares J, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. Maillard reaction in enteral formula processing: Furosine, loss of o-phthaldialdehyde reactivity, and fluorescence. *Food Res Int.* 2002;35(6):527–33.
6. Amparo N, Giraldo G, Velásquez JV, Andrea P, Cano R, Astudillo CO, et al. Cost-effectiveness of early nutritional therapy in malnourished adult patients in a high complexity hospital. *Nutr Hosp.* 2015;32(6):2938–47.
7. Caccialanza R, Klersy C, Marinelli M, Cameletti B, Chiara B, Montagna E, et al. A 4-year survey of the activity of a malnutrition task force in an Italian research hospital. *Nutrition.* 2010;26:575–8.
8. Askegard-giesmann JR, Kenney BD. Controversies in nutritional support for critically ill children. *Semin Pediatr Surg.* 2015;24:20–4.
9. DiBaise JK, Scolapio JS. Home Parenteral and Enteral Nutrition. *Gastroenterol Clin North Am.* 2007;36(1):123–44.
10. Augustin OM, Martínez E, Muñoz DV. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. 2006;21:1–14.
11. Boschini G, D'Agostina a, Rinaldi a, Arnoldi a. Lysinoalanine content of formulas for enteral nutrition. *J Dairy Sci.* 2003;86(7):2283–7.
12. Alipanah M, Alexandrovna Kalashnikova L, Veladimirovich Rodionov G. Kappa-casein and PRL-Rsa I genotypic frequencies in two Russian cattle

- breeds. *Arch Zootec.* 2008;57(218):131–8.
13. Guerra-Hernández E, Leon C, Corzo N, García-Villanova B, Romera JM. Chemical changes in powdered infant formulas during storage. *Int J Dairy Technol.* 2002;55(4):171–6.
 14. Grandison AS. Developments in dairy chemistry 4—Functional milk proteins. *Food Chem* [Internet]. 1990 Jan [cited 2015 May 19];38(3):237. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030881469090199E>
 15. More RAL, Martínez RG. Nutrición enteral. *Pediatr Integr.* 2015;19(5):e1–6.
 16. Rabat Restrepo JM, Campos Martínez C, Rebollo Pérez I. Fórmulas de Nutrición Enteral [Internet]. 2010. Available from: <http://sancyd.es/comedores/discapacitados/imprimir.php?idcontenido=0306Formulas&>
 17. Ramón MDC. Nutrición enteral: indicaciones y complicaciones en el paciente médico. 2010;
 18. Carbonell Ramón M. Nutrición enteral: indicaciones y complicaciones en el paciente médico. *Mezclas Intraven y Nutr Artif* [Internet]. 2010;564–99. Available from: <http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/mivyna/miv21.pdf>
 19. Contreras-Calderón J. Utilidad de indicadores de pardeamiento químico para el control de ingredientes y fórmulas infantiles. 2008.
 20. Henle T, Walter H, Krause I, Klostermeyer H. Efficient determination of individual maillard compounds in heat-treated milk products by amino acid analysis. *Int Dairy J.* 1991 Jan;1(2):125–35.
 21. Brands CMJ, Alink GM, Van Boekel M a JS, Jongen WMF. Mutagenicity of heated sugar-casein systems: Effect of the Maillard reaction. *J Agric Food Chem.* 2000;48(6):2271–5.
 22. Jaeger H, Janositz a, Knorr D. The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies. *Pathol Biol (Paris)* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2010;58(3):207–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2009.09.016>
 23. Martins SIFS, Jongen WMF, Van Boekel MAJS. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. Vol. 11, *Trends in Food Science*

- and Technology. Elsevier; 2000. p. 364–73.
24. Eric K, Raymond LV, Huang M, Cheserek MJ, Hayat K, Savio ND, et al. Sensory attributes and antioxidant capacity of Maillard reaction products derived from xylose, cysteine and sunflower protein hydrolysate model system. *Food Res Int* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;54(2):1437–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.034>
 25. Jalili Maryam AF. Original Article Identification and Quantification of 5-Hydroxymethylfurfural in Food Products. *Nutr Food Sci Res*. 2015;2(1):47–53.
 26. Garcia-Amezquita LE, Martinez-Alvarenga MS, Olivas GI, Zamudio-Flores PB, Acosta-Muñiz CH, Sepulveda DR. Effect of Maillard reaction conditions on the degree of glycation and functional properties of whey protein isolate - Maltodextrin conjugates. *Food Hydrocoll* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;38:110–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.006>
 27. Cheriot S, Billaud C, Pöchtrager S, Wagner KH, Nicolas J. A comparison study between antioxidant and mutagenic properties of cysteine glucose-derived Maillard reaction products and neoformed products from heated cysteine and hydroxymethylfurfural. *Food Chem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;114(1):132–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.026>
 28. Pastoriza S, Delgado-Andrade C, Haro a., Rufián-Henares J a. A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. the GAR method. *Food Chem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;129(4):1926–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.009>
 29. Vidal-Casariego A, Calleja-Fernández A, Villar-Taibo R, Kyriakos G, Ballesteros-Pomar MD. Efficacy of arginine-enriched enteral formulas in the reduction of surgical complications in head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2014.04.020>
 30. Rufián-Henares J a., Delgado-Andrade C, Jiménez-Pérez S, Morales FJ.

- Assessing nutritional quality of milk-based sport supplements as determined by furosine. *Food Chem.* 2007;101(2):573–8.
31. Rufián-Henares J, García-Villanova B, Guerra-Hernández E. Occurrence of furosine and hydroxymethylfurfural as markers of thermal damage in dehydrated vegetables. *Eur Food Res Technol* [Internet]. Springer-Verlag; 2008;228(2):249–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-008-0929-4>
 32. Rufián-Henares JÁ, García-Villanova B, Guerra-Hernández E. Generation of furosine and color in infant/enteral formula-resembling systems. *J Agric Food Chem.* 2004;52(17):5354–8.
 33. Contreras-Calderón J, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. Indicators of non-enzymatic browning in the evaluation of heat damage of ingredient proteins used in manufactured infant formulas. *Eur Food Res Technol.* 2008;227(1):117–24.
 34. Erbersdobler HF, Hupe A. Determination of lysine damage and calculation of lysine bio-availability in several processed foods. *Z Ernährungswiss. GERMANY*; 1991 Feb;30(1):46–9.
 35. Ramírez-Jiménez A, García-Villanova B, Guerra-Hernández E. Effect of storage conditions and inclusion of milk on available lysine in infant cereals. *Food Chem.* 2004 Apr;85(2):239–44.
 36. Oste RE, Dahlqvist A, Sjoestroem H, Noren O, Miller R. Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vitro studies. *J Agric Food Chem* [Internet]. American Chemical Society; 1986 Mar 1;34(2):355–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf00068a051>
 37. Oeste RE, Miller R, Sjoestroem H, Noren O. Effect of Maillard reaction products on protein digestion. Studies on pure compounds. *J Agric Food Chem* [Internet]. American Chemical Society; 1987 Nov 1;35(6):938–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf00078a020>
 38. Einarsson H, Eklund T, Nes IF. Inhibitory mechanisms of Maillard reaction products. *Microbios. ENGLAND*; 1988;53(214):27–36.
 39. Abraham K, Gürtler R, Berg K, Heinemeyer G, Lampen A, Appel KE.

- Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(5):667–78.
40. Capuano E, Fogliano V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;44(4):793–810. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.002>
 41. Cef PA. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 66 , Revision 1 Consideration of Furfuryl Alcohol and Related Flavouring Substances Evaluated by JECFA (55 th meeting) 1 EFSA Panel on Food Contact Materials , Enzymes , Flavourings and. Vol. 9. 2011. 1-44 p.
 42. María Margarita UL, Sepúlveda UJV, Hernández A. Bebida fermentada de suero de Queso fresco con *Lactobacillus casei*. *Rev Fac Nal Agr Medellin*. 2008;61(1):4409–21.
 43. Aider M, de Halleux D, Melnikova I. Skim Milk Whey Cryoconcentration and Impact on the Composition of the Concentrated and Ice Fractions. *Food Bioprocess Technol* [Internet]. Springer-Verlag; 2009;2(1):80–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-007-0023-0>
 44. Rufián-Henares JÁ, Guerra-Hernandez E, García-Villanova B. Colour measurement as indicator for controlling the manufacture and storage of enteral formulas. *Food Control*. 2006;17(6):489–93.
 45. Mottu F, Mauron J. The differential determination of lysine in heated milk II.— Comparison of the in vitro methods with the biological evaluation. *J Sci Food Agric*. Wiley Online Library; 1967;18(2):57–62.
 46. Ramírez-Jiménez A, García-Villanova B, Guerra-Hernández E. Effect of storage conditions and inclusion of milk on available lysine in infant cereals. *Food Chem* [Internet]. 2004 Apr;85(2):239. Available from: [10.1016/j.foodchem.2003.06.017](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.017)
 47. Tomarelli RM, Yuhas RJ, Fisher A, Weaber JR. An HPLC method for the determination of reactive (available) lysine in milk and infant formulas. *J Agric Food Chem*. ACS Publications; 1985;33(2):316–8.
 48. Ruttkat A, Steuernagel A, Erbersdobler HF. The Maillard Reaction in Foods

- and Medicine [Internet]. The Maillard Reaction in Foods and Medicine. Elsevier; 2005 [cited 2015 May 20]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781855737914501477>
49. Lopez-Fandiño R, Corzo N, Villamiel M, Delgado T, Olano A, Ramos M. Assessment of quality of commercial UHT milks by chromatographic and electrophoretic methods. *J Food Prot. International Association for Food Protection*; 1993;56(3):263–9.
 50. Rufian-Henares JA, Garcia-Villanova B, Guerra-Hernandez E. Determination of furfural compounds in enteral formula. *J Liq Chromatogr Relat Technol* [Internet]. 2001;24(19):3049–61. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/JLC-100107356>
 51. Durling LJK, Busk L, Hellman BE. Evaluation of the DNA damaging effect of the heat-induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;47(4):880–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.022>
 52. Broersen K, Voragen AGJ, Hamer RJ, De Jongh HHJ. Glycoforms of B-Lactoglobulin with Improved Thermostability and Preserved Structural Packing. *Biotechnol Bioeng. Wiley Online Library*; 2004;86(1):78–87.
 53. Naranjo GB, Gonzales ASP, Leiva GE, Malec LS. The kinetics of Maillard reaction in lactose-hydrolysed milk powder and related systems containing carbohydrate mixtures. *Food Chem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;141(4):3790–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.093>
 54. Singh B, Dean GR, Cantor SM. The role of 5-(hydroxymethyl)-furfural in the discoloration of sugar solutions. *J Am Chem Soc. ACS Publications*; 1948;70(2):517–22.
 55. Van Boekel M a JS. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chem*. 1998;62(4):403–14.
 56. Rufián-Henares JA, Morales FJ. Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Res Int*.

2007;40(8):995–1002.

57. Hongsprabhas P, Kerdchouay P, Sakulsom P. Lowering the Maillard reaction products (MRPs) in heated whey protein products and their cytotoxicity in human cell models by whey protein hydrolysate. *Food Res Int* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;44(3):748–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.010>
58. García-Baños JL, Del Castillo MD, Sanz ML, Olano a., Corzo N. Maillard reaction during storage of powder enteral formulas. *Food Chem.* 2005;89(4):555–60.
59. Angel Rufián-Henares J, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. Available lysine and fluorescence in heated milk proteins/dextrinomaltose or lactose solutions. *Food Chem.* 2006;98(4):685–92.
60. Frias J, Peñas E, Vidal-Valverde C. Changes in vitamin content of powder enteral formulas as a consequence of storage. *Food Chem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;115(4):1411–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.070>
61. García-Baños JL, Olano A, Corzo N. Changes in the Carbohydrate Fraction during Manufacture and Storage of Enteral Formulas. *J Food Sci.* 2002 Nov;67(9):3232–5.
62. Petisca C, Henriques AR, Pérez-Palacios T, Pinho O, Ferreira IMPLVOMPLVO. Assessment of hydroxymethylfurfural and furfural in commercial bakery products. *J Food Compos Anal* [Internet]. 2014 Feb;33(1):20–5. Available from: [10.1016/j.jfca.2013.10.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2013.10.004)
63. Mesías, M, Guerra Hernandez E GVB. Determination of acrylamide and furosine in flour and infant formulas. *ARS Pharm.* 2010;51(3):135–43.
64. Fernández-Artigas P, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. Browning indicators in model systems and baby cereals. *J Agric Food Chem.* 1999;47(7):2872–8.
65. Schaafsma G. The Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)--a concept for describing protein quality in foods and food ingredients: a critical review. *J AOAC Int. United States*; 2005;88(3):988–94.

66. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chemistry*. 1956;28(3):350–6.
67. Food and Drug Administration. FDA Foods Program Guidelines for Chemical Methods US Food and Drug Administration Office of Foods Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program. U.S. Department of Health and Human Services. 2012.
68. Bliesner DM. Validating chromatographic methods. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey; 2006. 283 p.
69. Huber L. Validation and qualification in analytical laboratories [Internet]. Second edi. New York: Informa Healthcare USA, Inc; 2007. 303 p. Available from: www.informahealthcare.com
70. Burgess C. Valid analytical methods & procedures. Cambridge: Royal society of chemistry; 2000. 87 p.
71. Ames JM. Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chem*. 1998;62(4):431–9.
72. Contreras-Calderón J, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. Utility of some indicators related to the Maillard browning reaction during processing of infant formulas. *Food Chem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;114(4):1265–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.004>
73. Wolf J, Thompson D, Reineccius G. Initial losses of available lysine in model systems. *J Food Sci*. Blackwell Publishing Ltd; 1977 Nov;42(6):1540–4.
74. Delgado Hervas T. Contenido en Furosina, Lactulosa y 8-Lactoglobulina como indicadores de calidad en leches líquida y en polvo. Universidad Complutense de Madrid; 1993.
75. Cardelle Cobas A, Villamiel M. Evaluación del pardeamiento no enzimático en alimentos derivados de cereales. *Aliment Nutr y salud*. 2005;12(3):91–100.
76. Ferrer E, Alegria A, Courtois G, Farre R. High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cows' milk. *J Chromatogr A*.

- Elsevier; 2000;881(1):599–606.
77. Ferrer E, Alegria A, Farré R, Abellán P, Romero F. High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant formulas during full shelf-life. *Food Chem.* Elsevier; 2005;89(4):639–45.
 78. Chávez-Servín JL, Castellote AI, López-Sabater MC. Evolution of potential and free furfural compounds in milk-based infant formula during storage. *Food Res Int.* Elsevier; 2006;39(5):536–43.
 79. Bosch J L. Estudio de la reaccion de Maillard en papillas listas para el consumo. Universitat de Valencia; 2007.
 80. Rufian H JA. Pardeamiento quimico en formulas enterales: Indicadores de control de tratamiento termico. Universidad de Granada; 2002.
 81. Madani-Tonekaboni M, Kamankesh M, Mohammadi A. Determination of furfural and hydroxymethyl furfural from baby formula using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography and method optimization by response surface methodology. *J Food Compos Anal* [Internet]. 2015;40:1–7. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84922559560&partnerID=40&md5=e8442802b37ac7007b22a48c700e0988>
 82. Shephard AB, Nichols SC, Braithwaite A. Moisture induced solid phase degradation of L-ascorbic acid part 3, structural characterisation of the degradation products. *Talanta.* Elsevier; 1999;48(3):607–22.
 83. Juhász M, Kitahara Y, Fujii T. Thermal decomposition of vitamin C: An evolved gas analysis– ion attachment mass spectrometry study. *Food Chem.* Elsevier; 2011;129(2):546–50.
 84. Vernin G, Chakib S, Rogacheva SM, Obretenov TD, Párkányi C. Thermal decomposition of ascorbic acid. *Carbohydr Res.* Elsevier; 1997;305(1):1–15.
 85. Albalá-Hurtado S, Veciana-Nogués MT, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC. Changes in furfural compounds during storage of infant milks. *J Agric Food Chem.* ACS Publications; 1998;46(8):2998–3003.
 86. Ferrer E, Alegría A, Farré R, Abellán P, Romero F. Effects of thermal processing and storage on available lysine and furfural compounds contents

- of infant formulas. *J Agric Food Chem*. ACS Publications; 2000;48(5):1817–22.
87. Rufián-Henares JA, de la Cueva SP. Assessment of hydroxymethylfurfural intake in the Spanish diet. *Food Addit Contam Part A* [Internet]. Taylor & Francis; 2008 Nov 1;25(11):1306–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/02652030802163406>
 88. Husøy T, Haugen M, Murkovic M, Jöbstl D, Stølen LH, Bjellaas T, et al. Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(12):3697–702.
 89. Anese M, Suman M. Mitigation strategies of furan and 5-hydroxymethylfurfural in food. *Food Res Int* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;51(1):257–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.024>
 90. Publication E, Larsen JC, Nørby KK, Beltoft VM, Frandsen HL. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in contact with Food (AFC) on a request from the Commission, Flavouring Group Evaluation 13: Furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain. Question No EFSA-Q-2003-156. European Food Safety Authority; 2005.
 91. EFSA. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 13 , Revision 1 (FGE . 13Rev1): Furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain substituents and heteroatoms from chemical group 14. *EFSA J*. 2010;8(4):1–112.
 92. JECFA. Toxicological evaluation of certain food additives. The forty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and contaminants. WHO Food Addit Ser. Geneva: IFCS, WHO, WHO; 1996;35.
 93. Zaitzev, A. N., Simonyan, T. A., & Pozdnyakov AL. Hygienic standardization of oxymethylfurfural in food products. *Vopr Pitan*. 1975;1:52–5.
 94. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the

- Commission related to Furfural and Furfural Diethylacetal Question number EFSA-Q-2003-236. EFSA J. 2004;67:1–277.
95. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes F and PA (CEF). Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 218, Revision 1 (FGE.218Rev1): alpha,beta-Unsaturated aldehydes and precursors from subgroup 4.2 of FGE.19: Furfural derivatives. EFSA J. 2011;9(3):1840.
 96. CEFS. Council of Europe, Committee of Experts on Flavouring Substances, RD 4.2/4- 42. Detailed and publication datasheet on furfural. Brussels; 1998.
 97. Collado Hernández CM, Pérez Núñez V. Aspectos básicos de la nutrición enteral en el paciente quemado. Rev Cuba Cir. 2013;52(4):332–41.
 98. Harris J, Benedict F. Biometric studies basal metabolism in man. Carnegie Inst Washingt. 1919;
 99. Eskin M, Ho C-T, Shahidi F. Browning reaction in food. In: Biochemistry of foods. Elsevier. 2013. p. 259–90.
 100. Martins SIFS, Van Boekel MAJS. A kinetic model for the glucose/glycine Maillard reaction pathways. Food Chem [Internet]. 2005 Mar;90(1–2):257–69. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604003188>
 101. Rufián-Henares J a. AA, Delgado-Andrade C, Jiménez-Pérez S, Morales FJ, Mesías, M, Guerra Hernandez E GVB, Rufián-Henares J a. AA, et al. Assessing nutritional quality of milk-based sport supplements as determined by furosine. Eur Food Res Technol [Internet]. Elsevier Ltd; 2008;101(1):573–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.03.034>
 102. Henry CJK, Chapman C. The nutrition handbook for food processors. Elsevier; 2002.
 103. Ashoor SH, Zent JB. Maillard Browning of Common Amino Acids and Sugars. J Food Sci [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 1984;49(4):1206–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb10432.x>
 104. Chávez-Servín JL, De La Torre Carbot K, García-Gasca T, Castellote AI, López-Sabater MC. Content and evolution of potential furfural compounds in commercial milk-based infant formula powder after opening the packet. Food

- Chem. 2015;166:486–91.
105. Kiesecker FG, Clarke D. The effect of storage on the properties of non-fat milk powders. *Aust J Dairy Technol.* 1984;39:74–7.
 106. García Luna PP, Pérez de la Cruz antonio J. Nutrientes específicos Hacia una nutrición clínica individualizada. *Aula medica*; 2013. 266 p.
 107. FAO RCC. Necesidades de energía y de proteínas: informe de una Reunión Consultiva Conjunta FAO/OMS/UNU de Expertos. Organización Mundial de la Salud; 1985.
 108. Ramón MDC, Carbonell Ramón M. Nutrición enteral: indicaciones y complicaciones en el paciente médico. *Mezclas Intraven y Nutr Artif [Internet].* 2010;564–99. Available from: <http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/mivyna/miv21.pdf>
 109. Lochs H, Dejong C, Hammarqvist F, Hebuterne X, Leon-Sanz M, Schütz T, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Gastroenterology. *Clin Nutr [Internet].* 2006;25(2):260–74. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561406000252>
 110. Kreymann KG, Berger MM, Deutz NEP, Hiesmayr M, Jolliet P, Kazandjiev G, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Intensive care. *Clin Nutr [Internet].* 2006;25(2):210–23. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561406000410>
 111. Clegg KM. Non-enzymic browning of lemon juice. *J Sci Food Agric. Wiley Online Library*; 1964;15(12):878–85.
 112. Delgado-Andrade C, Morales FJ, Seiquer I, Pilar Navarro M. Maillard reaction products profile and intake from Spanish typical dishes. *Food Res Int [Internet]. Elsevier Ltd*; 2010;43(5):1304–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.018>
 113. Rufián-Henares JA, García-Villanova B, Guerra-Hernández E. Furosine content, loss of o-phthalaldehyde reactivity, fluorescence and colour in stored enteral formula. *J Dairy Technol [Internet].* 2002;55(3):121–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-0307.2002.00039.x>