

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Determinación de nutrientes e inocuidad de las fórmulas para
prematuros sometidas al proceso de autoclave a diferentes
tiempos de esterilización

Guatemala
2005

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Determinación de nutrientes e inocuidad de las fórmulas para
prematuros sometidas al proceso de autoclave a diferentes
tiempos de esterilización

Trabajo de investigación presentado para optar al grado
académico de Licenciada en Nutrición por
Mariarenee Klussmann González

Guatemala
2005

Determinación de nutrientes e inocuidad de las fórmulas para prematuros sometidas al proceso de autoclave a diferentes tiempos de esterilización

CONTENIDO

Lista de Cuadros.....	vi
Resumen	vii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
A. Alimentación del neonato prematuro	2
1. Nutrientes esenciales en prematuros	2
a. Proteínas	3
b. Energía	3
c. Lípidos	3
d. Carbohidratos	4
e. Minerales	4
f. Vitaminas.....	5
2. Características de las fórmulas lácteas para prematuros	5
3. Composición de las fórmulas lácteas para prematuros	6
4. Preparación de las fórmulas lácteas	8
5. Esterilización de vapor o autoclave	9
a. Efecto del procesamiento térmico en la leche.....	10
1) Efectos en los carbohidratos y proteínas	11
2) Grasas	13
3) Vitaminas	13
B. Métodos de determinación de nutrientes	14
1. Método de enlace de colorante	14
2. Método de 2,6-diclorofenolindofenol	15
3. Análisis proximal de las fórmulas	16
a. Método Kjeldahl para determinar proteínas	16
b. Método de Babcock para determinar grasa.....	16
c. Determinación de Humedad	16
d. Determinación de cenizas	17
e. Determinación de color	18
C. Análisis microbiológico	18
1. Determinación de bacterias coliformes.....	18
III. Justificación	20
IV. Objetivos.....	21
V. Hipótesis	22
VI. Materiales y métodos	23
A. Materiales	23
1. Universo	23
2. Muestra	23
3. Equipo.....	23
4. Reactivos	24
B. Métodos	25
1. Tipo de investigación.....	25
2. Selección de muestra	25
3. Diseño experimental	25
4. Tabulación de datos	25
5. Análisis estadístico	25
VII. Cronograma	26
VIII. Presupuesto	27
IX. Resultados	28
X. Discusión	37
XI. Conclusiones	39
XII. Recomendaciones	40
XIII. Bibliografía	41
XIV. Anexos	43
A. Anexo 1: Reacción de Maillard	43
B. Anexo 2: Preparación de fórmulas en el Hospital Roosevelt	44
C. Anexo 3: Métodos utilizados	46

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Composición de macronutrientes y micronutrientes del Neosure	7
Cuadro 2: Componentes del agar rojo violeta bilis (VRBA).....	19
Cuadro 3: Cambio de volumen con respecto al tiempo de esterilización	28
Cuadro 4: Resultados estadísticos del cambio de volumen	28
Cuadro 5: Contenido de proteína según los diferentes tiempos de esterilización.....	29
Cuadro 6: Resultados estadísticos del cambio de proteína	29
Cuadro 7: Contenido de grasa con respecto al tiempo de esterilización.....	30
Cuadro 8: Resultados estadísticos del cambio de grasa.....	30
Cuadro 9: Contenido de humedad según los tiempos de esterilización.....	31
Cuadro 10; Resultados estadísticos del cambio de humedad	31
Cuadro 11: Contenido de cenizas según el tiempo de esterilización	32
Cuadro 12: Resultados estadísticos del cambio de cenizas	32
Cuadro 13: Resultados del análisis proximal	33
Cuadro 14: Lisina disponible antes y después de la esterilización a diferentes tiempos	33
Cuadro 15: Resultados estadísticos del cambio de lisina disponible	33
Cuadro 16: Contenido de vitamina C en fórmulas esterilizadas a diferentes tiempos.....	34
Cuadro 17; Resultados estadísticos del cambio de la vitamina C.....	34
Cuadro 18: Resultados de color a diferentes tiempos de esterilización	35
Cuadro 19: Resultados estadísticos del cambio de color (L).....	35
Cuadro 20: Resultados del cambio de volumen después del procesamiento térmico	49
Cuadro 21: Resultados del cambio de proteína después del procesamiento térmico.....	49
Cuadro 22: Resultados del cambio de grasa después del procesamiento térmico	49
Cuadro 23: Resultados del cambio de cenizas después del procesamiento térmico	50
Cuadro 24: Resultados del cambio de humedad después del procesamiento térmico	50
Cuadro 25: Resultados del cambio de lisina después del procesamiento térmico	50
Cuadro 26: Resultados del cambio de la vitamina C después del procesamiento	51

RESUMEN

La alimentación de un recién nacido prematuro es de vital importancia para su desarrollo óptimo. Por medio de esta investigación se pretendió conocer la efectividad del procedimiento de preparación de fórmulas lácteas para prematuros del Hospital Roosevelt, tanto nutricionalmente, así como, microbiológicamente; por medio de la determinación de la calidad de la proteína con la obtención de la lisina disponible, las pérdidas de vitamina C por calor, la determinación del análisis proximal y conteo de bacterias coliformes y E. coli. Se observó que, en general, las pérdidas de nutrientes no fueron significativas y no se encontraron bacterias a ningún tiempo de esterilización, por lo que se concluyó que el proceso de preparación de las fórmulas es el adecuado para permitir una alimentación que provea de los nutrientes esenciales y sea inocua.

I. INTRODUCCIÓN

La utilización del procesamiento térmico por autoclave como etapa final de la preparación de fórmulas enterales infantiles y de adultos, es una práctica común en los hospitales públicos de Guatemala. Sin embargo, se han realizado varios estudios en países desarrollados en los que se ha comprobado que este tipo de procedimientos producen pérdidas de algunos nutrientes en los alimentos y fórmulas lácteas; si estas pérdidas fueran significativas podrían afectar el adecuado desarrollo y crecimiento de niños que dependan solamente de estas fórmulas para su alimentación y niños que tengan una aumentada necesidad de ciertos nutrientes como los neonatos prematuros. (Tomarelli 1985:317)(Lowry 1989:1024)(Harris 1960:525)(Leclere, 2001:4682)

Tomando en cuenta el propósito que tienen estas instituciones para la utilización de este procedimiento, es importante considerar si éste se cumple y si las fórmulas finalizan totalmente inocuas. Relacionando el tiempo de esterilización con la inocuidad de las fórmulas y la retención de ciertos nutrientes se puede llegar a resultados que apoyen o critiquen la utilización de estos métodos.

II. ANTECEDENTES

A. Alimentación del neonato prematuro

En los servicios de cuidados intensivos del recién nacido, la evaluación nutricional del niño prematuro es un proceso continuo, ya que en él hay un flujo constante de desarrollo, crecimiento y situación clínica que modifica continuamente sus necesidades nutricionales, su tolerancia a los distintos nutrientes y a la alimentación, y el método de nutrición preferente. La valoración nutricional y la terapia en los prematuros debe empezarse inmediatamente después del nacimiento. En comparación con los nacidos a término, los niños prematuros corren riesgo de insuficiencia de nutrientes o intoxicación por muchos motivos. Entre ellos están: (1) el propio nacimiento prematuro, que implica falta de reserva de nutrientes, (2) un rápido crecimiento que agota en seguida dichas reservas y crea la necesidad de nuevas ingestas que satisfagan sus necesidades, (3) mayor frecuencia de enfermedades, lo que altera las necesidades de nutrientes, la tolerancia de las tomas y la elección del método alimentario, y (4) la inmadurez fisiológica, en especial del tubo digestivo, que interfiere en el tránsito y la tolerancia de los alimentos por el intestino. Debido a estos factores, las necesidades de nutrientes de un niño prematuro son superiores a las del recién nacido a término sano. La leche humana satisface las necesidades de éste, pero para que el niño prematuro crezca de manera adecuada es preciso enriquecerla con suplementos de nutrientes. (Berseth 2002; 293)(Hendricks 2000; 507)

La alimentación del niño prematuro debe favorecer el que se duplique el ritmo de crecimiento y la composición corporal en comparación con un feto sano de la misma edad gestacional sin inducir insuficiencias nutricionales o trastornos tóxicos. El régimen nutricional debe maximizar el crecimiento y la nutrición, pero sin comprometer el estado metabólico. (Berseth 2002;293)(Hendricks 2000; 509)

Por la vía enteral, es posible satisfacer las necesidades del niño prematuro mediante cantidades ilimitadas de leche humana enriquecida o de fórmulas para prematuros. Cuando está indicada una reducción de líquidos, se debe tener en cuenta la concentración de la leche, la fórmula que se va a utilizar y lo que se agrega adicional a la fórmula en el niño alimentado por boca. (Berseth 2002; 295)

Para los recién nacidos de menos de 1000 gramos, se recomienda tanto la mitad o el cien por ciento de leche materna o fórmulas para prematuros a 10mL/kg/24 horas por sonda nasogástrica por goteo. Si tolera la alimentación inicial, el volumen se incrementa a 10-15mL/kg/24horas. El incremento diario en el volumen no debe excederse de 20mL/kg/24 horas. Cuando el volumen ha llegado a 150mL/kg/24 horas, el contenido calórico debe incrementarse a 24-27kcal/oz. Con una densidad calórica alta, los infantes tienen riesgo de deshidratación, edema, intolerancia a la lactosa, diarrea, flatulencia y vaciamiento gástrico lento. Se necesitan los fluidos intravenosos hasta que la alimentación provea aproximadamente 120mL/kg/24 horas. El protocolo de alimentación para infantes prematuros que pesan más de 1500 gramos se inicia con un volumen de 20-25mL/kg/24 horas de lactancia materna o fórmula para prematuro dada por bolo cada tres horas. Después de esto, los incrementos de volumen de las fórmulas no deben sobrepasar 20mL/kg/24 horas. (Behrman 2000;481)

1. **Nutrientes esenciales en prematuros.** Se han hecho pocos estudios con respecto al conocimiento de los nutrientes esenciales en los recién nacidos prematuros de muy bajo peso y extremadamente muy bajo peso al nacer. Los estudios que se han realizado, los han hecho utilizando animales como ovinos, de los cuales se ha encontrado mucha información útil como que durante el tercer trimestre de gestación de los fetos ovinos, éstos utilizan de 8 a 10mg/kg/min de glucosa, lo cual es parecido a lo máximo que pueden tolerar los prematuros. (Hay 1999: 187)

a. **Aminoácidos y proteínas.** Los recién nacidos prematuros que sólo reciben glucosa pierden un exceso de 1.2g/kg por día de proteína endógena. Esto hace que se vea aumentada la proteólisis y disminuida la síntesis de proteínas que es muy importante para lograr el crecimiento de estos recién nacidos y evitar el catabolismo. Se ha visto que una provisión pequeña de aminoácidos, incluso si el consumo total de energía es bajo, aumenta la síntesis proteica, porque disminuye la diferencia entre la proteólisis y la síntesis de proteínas y además; no afecta el metabolismo. Con un aporte de 1.1-1.5g/kg de proteína y 30kcal/kg se puede cambiar el balance proteico de negativo a cero o un poco positivo. (Hay 1999: 187)(Ziegler 1999:56)

Sin embargo, aunque el consumo de proteínas sea el adecuado, algunos factores pueden limitar la utilización biológica de estas proteínas. Uno de estos factores, y talvez el más importante en prematuros es el consumo inadecuado de alguno de los aminoácidos esenciales para ellos, lo cual no permite la correcta formación de las cadenas peptídicas y, por lo tanto, la formación de las proteínas necesarias para el crecimiento. (Hay 1999:187)

Se ha utilizado un modelo de referencia del feto para determinar la cantidad de proteína que debe ser ingerida para igualar la cantidad de proteína que se deposita en el tejido fetal recién formado. Para lograr esta ganancia, se debe compensar por pérdidas intestinales y pérdidas obligatorias en la piel y orina. Basado en este modelo, se recomiendan ingestas de 3.5-4g/kg/día. Se ha observado que una ingesta de 3g/kg/día de proteína se requiere para apoyar la deposición de masa magra que se aproxime a la tasa intrauterina. (Battaglia 1967: 160)(Ziegler 1999:60)

b. **Energía.** Los estimados de utilización de energía por calorimetría indirecta en neonatos prematuros indican que diariamente gastan de 60-75kcal/kg/día. Este alto gasto de energía en prematuros se debe, en parte, a su alta tasa de crecimiento y gran necesidad de síntesis de nuevos tejidos. Los neonatos prematuros también pueden tener pérdidas altas de energía por calor e intercambios de vapor por su piel tan delgada y mayor área superficial expuesta. También existen otros factores que pueden aumentar el gasto energético como el estrés respiratorio, sepsis, medicamentos, etc. (Hay 1999:187)

Según la Academia Americana de Pediatría, el requerimiento energético de los recién nacidos prematuros y de muy bajo peso al nacer es variable dependiendo de factores biológicos y ambientales. Se ha estimado que se necesitan 50kcal/kg/día para el mantenimiento del neonato pero se necesitan de 105-130kcal/kg/día para lograr su crecimiento. (Battaglia 1967;161)

c. **Lípidos.** El recién nacido necesita una cantidad adecuada de grasa dietética para satisfacer sus necesidades de crecimiento, proveer ácidos grasos esenciales y ayudar en la absorción de otros nutrientes como las vitaminas liposolubles y calcio. Sin embargo, los recién nacidos de bajo peso al nacer y prematuros digieren y absorben ineficientemente las grasas. Los requerimientos de lípidos están limitados a los requerimientos de los ácidos grasos esenciales. Se recomienda 1-4% del total de consumo de energía como ácido linoleico y aproximadamente 1% de ácido linolénico. Sin embargo, se necesitan ingestas muy altas de lípidos para alcanzar el balance energético total del cuerpo y poder crecer normalmente. Los lípidos componen casi el 50% del contenido energético no proteico, tanto de las fórmulas como de la leche materna y los dos contienen ácido linolénico y linoleico. (Hay 1999:187)(Battaglia 1967:162)

La adición de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga a las fórmulas para prematuros es controversial ya que algunos estudios han demostrado que los neonatos pueden beneficiarse al tener un mejor desarrollo neurológico y visual que los neonatos alimentados con fórmulas que no contienen estos ácidos grasos. Sin embargo, otros estudios no han encontrado un beneficio de esta suplementación por lo que no consideran necesario que se realice. Es importante saber que la cantidad de estos ácidos en la leche materna se refleja en la sangre de la madre y depende de la dieta por lo que cambia constantemente y no se puede saber exactamente la cantidad necesaria para suplementar las fórmulas que se iguale a la de la leche materna. (Hay 1999:187)

La carnitina es un aminoácido sintetizado por el organismo, principalmente por el hígado, que funciona principalmente para facilitar el transporte de ácidos grasos de cadena mediana a través de la membrana mitocondrial hacia el interior de las células, lo que permite su oxidación para energía, en particular en corazón y músculo esquelético y la cetogénesis en el hígado a partir de las grasas. El European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition Committee recomendó que las fórmulas de lactantes deben contener, cuando menos 7.5micromol/100kcal. De esta manera un lactante que recibe

160 a 180mL/kg/día de leche, consigue aproximadamente 10micromol/kg/día de carnitina. (Cowett 2000:68)

d. Carbohidratos. Los requerimientos de glucosa de los prematuros son mayores que los de los neonatos a término que necesitan de 3-4mg/kg/min para prevenir la hipoglicemia. Sin embargo, el requerimiento absoluto casi siempre es menor que lo que se les provee por vía enteral o parenteral (más de 12-14mg/kg/min). La utilización de glucosa por un recién nacido prematuro es de aproximadamente 6-10mg/kg/min, lo cual es mayor que en un neonato a término, en parte por los mayores requerimientos de energía. (Hay 1999:187)

La hipoglicemia e hiperglicemia son problemas importantes y comunes en los neonatos prematuros. Se ha encontrado que en la segunda mitad del embarazo, la concentración de glucosa en el plasma del feto es mayor de 50-55mg/dL. Este se considera como el límite inferior que debe presentar un prematuro para evitar el riesgo de retraso en el desarrollo motor y mental del niño, por lo que se debe mantener las concentraciones de glucosa de los prematuros arriba de este nivel para promover el desarrollo neurológico. También la hiperglicemia es un problema común que puede darse por estrés o infusiones altas de lípidos. Las causas parecen ser: una secreción reducida de insulina en respuesta a la glucosa, característica de la extrema inmadurez, y una secreción reducida de insulina en respuesta a una caída de la concentración de aminoácidos en el plasma. Por lo tanto, se ha encontrado que la infusión temprana de aminoácidos puede disminuir la producción de glucosa, aumentar la secreción de insulina y su acción dentro del cuerpo, por lo que limita la necesidad de insulina exógena. (Hay 1999:187)(Ziegler 1999:165)

La leche materna y las fórmulas comerciales para recién nacidos contienen aproximadamente 40% del total de calorías como carbohidratos. El rango recomendado es de 40-45% de las calorías totales. El contenido de lactosa de la fórmula debe ser 3.2-12g/100kcal y no más de 8g/dL. (Battaglia 1967:162)

e. Minerales. La evidencia sugiere que los neonatos de muy bajo peso y los prematuros probablemente requieren más zinc que los neonatos a término. Se ha comprobado que incrementar los niveles de zinc en la alimentación durante el primer año de vida promueve el crecimiento y el desarrollo motor, así como el desarrollo y la función del sistema inmune. Sin embargo, los niveles muy altos de zinc no son recomendables ya que interfiere con el metabolismo del cobre. (Hay 1999:187)

Para obtener la mineralización ósea que ocurre en el feto, la Academia Americana de Pediatría recomienda 200mg/kg/día de calcio y 113mg/kg/día de fósforo. Con respecto al hierro, la recomendación es de 2-3mg/kg/día. Los recién nacidos que son alimentados con lactancia materna deben recibir gotas de sulfato ferroso. (Battaglia 1967:162)

Los requerimientos de sodio de los prematuros están aumentados por la velocidad de crecimiento acelerada, además que son susceptibles a hiponatremias y pueden tener pérdidas urinarias de sodio debido a una inmadurez renal. Una ingesta diaria de 4-8mEq/kg o más de sodio puede ser necesaria para evitar la hiponatremia. (Battaglia 1967: 162)

Existe un gran número de situaciones específicas del neonato nacido prematuro que debe tomar en cuenta el personal de salud para lograr metas apropiadas de crecimiento, aporte de nutrientes y desarrollo mental y fisiológico. Estas situaciones enfatizan las diferencias en los requerimientos de nutrientes entre los neonatos a término versus los neonatos pretérmino. Estas situaciones incluyen: inmadurez metabólica y gastrointestinal; inmadurez fisiológica; almacenamiento mínimo de nutrientes y condiciones medicas-quirúrgicas complicadas. Cada uno de estos aspectos, individualmente y colectivamente, complica e impide los intentos para definir los requerimientos de nutrientes del neonato prematuro. Así como es difícil definir y llenar las necesidades de macronutrientes del neonato prematuro, se sabe menos sobre los requerimientos de micronutrientes en estos neonatos. (Delange 2003:231)

La leche pretérmino varía en la composición de nutrientes de la leche de las madres de neonatos a término (menor contenido de proteínas, minerales y algunas vitaminas). Para algunos micronutrientes existen datos muy limitados en la composición de la leche pretérmino. Para asegurar que los neonatos prematuros alimentados con leche materna reciban un aporte adecuado de nutrientes de acuerdo a las

necesidades estimadas, se ha utilizado los fortificadores de leche humana que contienen proteínas, minerales y vitaminas. (Delange 2003:231)

El neonato pretérmino está en riesgo de deficiencias de hierro, zinc, cobre, selenio, yodo y manganeso, ya que sus depósitos y reservas sistémicas se acumulan al final de la gestación. Después del parto otros factores ponen en peligro el metabolismo de los oligoelementos. Estos comprenden reacciones de estrés posnatal y cualquiera catabólica posnatal. Como sucede con niños mayores que se recuperan de mala nutrición, es durante la fase anabólica cuando las infecciones son eliminadas, el estrés desaparece y se establece un aporte energético y de macronutrientes adecuado, que es probable que sucedan las deficiencias de los elementos catiónicos. Por tanto, los déficits pueden tener su origen en el periodo neonatal inicial, pero no manifestarse sino hasta el segundo o el tercer mes de vida. (Cowett 2000:132)

f. Vitaminas. Es muy difícil realizar estudios para conocer los requerimientos de vitaminas en prematuros y sobre todo en neonatos de extremadamente muy bajo peso al nacer por el estado en el que se encuentran y considerando que tomar una muestra de sangre representa casi el 1% de su volumen sanguíneo. Sin embargo, se conoce que las reservas bajas, la inmadurez fisiológica, la enfermedad y el crecimiento acelerado incrementan los requerimientos de vitaminas en los recién nacidos prematuros y de bajo peso. (Battaglia 1967: 162)(Cowett 2000:102)

El factor más importante de la vitamina D es que la concentración de esta vitamina en el prematuro depende de la alimentación de la madre. La leche materna contiene bajas concentraciones de vitamina D (10-80IU/L), los requerimientos de vitamina D para prematuros se estima entre 400 y 5000IU por día. (NCCPS 1995:1765)

La concentración de retinol de la leche temprana de las madres de niños prematuros (del día 6-37 de lactancia) varía, pero es usualmente más alta que de las madres de niños a término. Los recién nacidos prematuros presentan una cantidad reducida de retinol almacenado en el hígado al nacer y menores concentraciones de retinol en plasma y de proteína ligadora de retinol que en niños a término. Sólo las fórmulas que están suplementadas con 450 a 840µg por día de retinol mantienen niveles séricos de retinol aceptables. Se recomienda una ingesta de 450µg/kg por día en recién nacidos con peso menor de 1000 gramos y 200-450µg/kg por día en prematuros de 1000 a 2000 gramos. (NCCPS 1995:1766)

La vitamina E se ha encontrado en bajas concentraciones en el plasma de niños prematuros. No se ha encontrado beneficios clínicos de una suplementación con vitamina E en niños prematuros pero se debe mantener una concentración en plasma de 10-30mg/dL de vitamina E y mantener 1mg de alfa-tocoferol sérico por cada gramo de lípidos totales. Una ingesta de 4mg por día o más de vitamina E en la fórmula y manteniendo la relación 1:1 de vitamina E y lípidos es adecuado. (NCCPS 1995:1766)

Se ha recomendado que todos los recién nacidos prematuros reciban una inyección intramuscular de 1mg de vitamina K en las primeras seis horas de nacidos. No se ha comprobado cuáles son los beneficios exactos de esto; pero se sigue recomendando para evitar que los niños sufran deficiencias teniendo en cuenta la importancia de esta vitamina para la cicatrización. (NCCPS 1995:1766)

Los recién nacidos con bajo peso al nacer y prematuros alimentados con leche materna podrían recibir cantidades suficientes de vitamina C para llenar sus requerimientos. Sin embargo, debido a que el contenido de vitamina C de la leche materna, particularmente de la leche materna que es calentada, es muy variable, la suplementación de 20mg/día con ácido ascórbico está indicada. Las fórmulas deben contener, por lo menos 7mg/100kcal. Cuando se utilizan fórmulas predominantes en caseína o cuando los volúmenes ingeridos son tales que la ingesta de vitamina C es menor de 20mg/día, la suplementación está indicada. (NCCPS 1995:1766)

2. Características de las fórmulas lácteas para prematuros. Cuando no se cuenta con la leche de la madre, la fórmula para el lactante prematuro es la segunda preferida y tiene una ventaja a largo plazo para el neurodesarrollo, sobre la fórmula estándar para el lactante a término, en particular en los varones. Las fórmulas para prematuros se recomiendan para lactantes con peso aproximado de 2 a 2.5kg con valores normales de fosfatasa alcalina y de albúmina en suero. Actualmente, se están realizando varios estudios para hacer las fórmulas para neonatos pretérmino más semejantes a la leche materna. La adición de glutamato a los alimentos de fórmula da como resultado reducción en la tasa de sepsis y la complementación con nucleótidos se relaciona con mejoría en el crecimiento lineal y en la

circunferencia de la cabeza. Cuando se agrega cualquier soluto a las fórmulas lácteas, se debe tener cuidado de evitar la hiperosmolaridad, que predispone a la enterocolitis necrosante, es decir mantener la densidad de las fórmulas en menos de 1. (Cowett 2000:241)(Rombeau 1998:400)

Las fórmulas para prematuros proporcionan un equilibrio de calorías proteicas y no proteicas, y satisfacen las necesidades vitamínicas y minerales del lactante. La fuente de los carbohidratos debe ser lactosa y polímero de glucosa, y el aceite de TCM (Triglicéridos de cadena media) debe representar la mitad de las kilocalorías grasas. (Berseth 2002:296)

Se han hecho estudios del empleo de fórmulas para prematuros tras el alta hospitalaria. Uno de ellos es el de Cooke y cols (Cooke, 1998), en el que los niños fueron divididos de forma aleatoria en tres grupos: uno alimentado con fórmula para prematuro hasta los seis meses de edad corregida, otro sólo hasta la edad en que se habría producido el parto normalmente y el tercero alimentado con una fórmula para niños a término hasta los seis meses de edad corregida. Los análisis durante la prueba mostraron que no había ninguna ventaja para los que recibían fórmula para prematuro si se la suprimía, por lo que ya no se incorporaron más niños a este grupo. Los niños alimentados con fórmula para prematuro redujeron su ingesta de fórmula hasta alcanzar el mismo nivel energético que los niños del grupo con fórmula para niños a término. Sin embargo, siguieron teniendo una mayor ingesta de proteínas, zinc, vitaminas y minerales. El grupo con fórmula para niños a término tuvo ingestas de líquidos similares a las del grupo con fórmula para prematuros hasta llegar al momento teórico del parto, pero no aumentaron su ingreso hasta alcanzar el del grupo con fórmula para niños a término una vez cambiada una fórmula por otra. Como resultado de ello, su ingesta energética en el mes siguiente al de inicio de su alimentación con la segunda fórmula fue inferior a la de cualquiera de los otros grupos. El grupo con fórmula para prematuros tenía mayor nitrógeno ureico en sangre que el que recibía la fórmula para niños a término, pero no presentaba diferencias significativas respecto a calcio, fosfato, fosfatasa alcalina o proteínas totales en suero. En los niños del sexo masculino, tanto el peso como la longitud corporal y el perímetro cefálico fueron mayores en el grupo con fórmula para prematuros. Estos cambios persistían a los 18 meses. A los 12 meses de edad, los niños alimentados con fórmulas para prematuros tenían más masa corporal magra, masa lipídica y mineral óseo. No se observó diferencia en cuanto al porcentaje de grasa corporal. Tampoco se observaron diferencias en cuanto al crecimiento o la bioquímica en las niñas. La fórmula para prematuros no mejoró el desarrollo a los 18 meses de edad corregida. (Cooke 1998:355)

Es importante tomar en cuenta dentro de las características de las fórmulas para prematuros, la importancia de una preparación que asegure la inocuidad de las fórmulas. Estos niños son muy susceptibles a enfermedades porque no presentan muchas defensas en sus cuerpos, por esta razón, todas las fórmulas destinadas a ellos deben ser sometidas a algún proceso de esterilización por autoclave (en el caso de hospitales) o en una olla grande en la casa del paciente. Estos procesos unidos con la utilización de todas las medidas higiénicas posibles, como lavarse las manos al preparar las fórmulas, esterilizar pачas, mamones, tapones y utensilios a usar, utilizar redcillas, guantes, limpiar el lugar de trabajo, desinfectar, no tocarse la boca, nariz o pelo al preparar las fórmulas, etc., deben lograr que las fórmulas destinadas a los recién nacidos prematuros sean inocuas y que colaboren con su crecimiento y no con el empeoramiento de su situación.

3. Composición de las fórmulas. Las fórmulas para prematuros contienen una mayor proporción de proteínas, calorías, minerales como calcio y fósforo, vitaminas; y menor cantidad de lactosa que las fórmulas para el lactante a término. Con respecto a las proteínas, constituyen aproximadamente el 12% y predomina el suero de la leche. Se caracterizan por tener el 50% del aceite como TCM, que facilitan la absorción de las grasas y la ganancia de peso. Con respecto a los carbohidratos, el 50% lo conforman los polímeros de glucosa y el otro 50% la lactosa. (Hendricks 2000:519)(Rombeau 1998:400) Estas fórmulas especialmente diseñadas para los lactantes prematuros aportan los nutrientes adecuados si se utilizan como única fuente de alimentación. Las fórmulas contienen 24kcal/onza (0.8kcal/mL). Esta es una ventaja frente a la leche materna, la cual todavía no es adecuada para el recién nacido por lo que debe ser fortificada con otros nutrientes. (Rombeau 1998:400)

Los prematuros que han sido alimentados con proporciones de proteínas de suero/caseína de 60/40 (similar a la leche materna) presentan aminoácidos plasmáticos razonablemente balanceados y coeficientes de utilización de proteínas (ganancia de proteínas/consumo) de 0.7. Una proporción más alta de caseína no puede ser utilizada con la misma eficiencia, ya que se ha observado desarrollo de acidosis metabólica y concentraciones altas de tirosina y fenilalanina con fórmulas con 18/82 proporción de suero/caseína. Las fórmulas que han sido designadas para prematuros tienen un mayor contenido de

proteínas (1.8-2.4g/dL) y una mayor densidad de energía (75-85kcal/dL) que las fórmulas generalmente utilizadas para neonatos a término. Proveen de 2.8-3.2g de proteína/100kcal. (Ziegler 1999:168)

Las fórmulas disponibles para lactantes prematuros suministran de 25 a 45mg de vitamina C con un aporte de 150mL/kg. La siguiente tabla muestra un ejemplo de composición de una fórmula para prematuros. Esta fórmula es la que se utiliza en el Hospital Roosevelt para los lactantes internados dentro de las salas de alto y mínimo riesgo que tengan un peso menor a 2500gramos.

Cuadro 1: Composición de macronutrientes de Similac Neosure

Macronutrientes	
Nutriente	Cantidad
Energía	513kcal
Proteína	13.3g
Grasa	28.2g
Carbohidratos	52.8g
Humedad	2.5g
Taurina	34.4mg
Carnitina	27.6mg
Ácido linoleico	3847mg
Ácido linolénico	513mg

Composición de micronutrientes de Similac Neosure

Micronutrientes			
Vitaminas	Cantidad	Minerales	Cantidad
A	1900UI	Calcio	458.1mg
D	260UI	Fósforo	305.4mg
E	13UI	Yodo	60mg
C	50mg	Hierro	7.7mg
Acido fólico	70mcg	Magnesio	33mg
B ₁	400mcg	Zinc	3.3mg
B ₂	400mcg	Cobre	461.7mcg
Niacina	5.2mg	Manganeso	320.6mcg
B ₆	270mcg	Sodio	219.8mg
B ₁₂	0.9mcg	Potasio	551mg
Biotina	20mcg	Cloruro	328.9mg
Acido pantoténico	2.2mg	Selenio	6.6mcg
K	56.3mcg		
Colina	82mg		
Inositol	30.8mg		
Nucleótidos	49.7mg		

(Fuente: www.abbott.com)

4. Preparación de fórmulas lácteas: El equipo que se utilice es muy importante para la preparación de las fórmulas lácteas. Se necesitan pachas de vidrio resistente al calor o de plástico que pueda ser sometido a ebullición (se recomiendan las botellas de boca ancha porque son más fáciles de limpiar), mamones, tapaderas de las pachas, esterilizador de pachas (autoclave) o se puede improvisar una olla grande con un instrumento de metal para poner las pachas cuando éstas son pocas, picheles con labio para servir, de un tamaño de 2-3 cuartos para mezclar la leche, cucharitas y tazas medidoras, cucharas de mango largo y un embudo. Para la limpieza se necesita un cepillo especial para pachas con mango largo y cerdas duras. (Robinson 1967:349)

Antes de empezar a hacer las fórmulas se debe lavar vigorosamente las manos y se debe desinfectar completamente el área de trabajo. No se debe permitir que las personas con alguna enfermedad de la piel trabajen en el lugar. Se debe lavar con agua fría las pachas inmediatamente después de ser utilizadas. Se deben llenar las pachas con agua fría y dejarlas estar. Se lavan todas las pachas con agua y detergente y el cepillo de mango largo y cuerdas duras especial para pachas ya que se

puede llegar a todos los rincones de la pacha. Se desaguan las pachas con agua caliente o tibia. Se lavan también los mamones con el cepillo y se desaguan con agua tibia. Se debe probar cada mamón para verificar que el orificio no esté tapado. (Robinson 1967:350)

Para preparar las fórmulas se debe medir la cantidad de azúcar necesaria, la leche, el aceite y todo se mezcla bien. Se le agrega el agua necesaria. La mezcla de la leche se pone a hervir por cinco minutos, moviendo constantemente para evitar que se forme nata y deje enfriar por algunos minutos. Vierta la fórmula en las pachas dependiendo de la cantidad que esté especificado. Utilice el embudo para verter la fórmula en las pachas. Ponga los mamones en las pachas y pruebe si la leche fluye por el orificio del mamón. Se deben tapar superficialmente con las tapaderas de las pachas y se ponen en el esterilizador utilizándolo como lo especifica el manual. (Robinson 1967: 352)

a. Facilidades físicas. Se recomienda que para la preparación de las fórmulas se utilice un cuarto separado y especializado para este propósito, debe cumplir con los siguientes requisitos: que tenga una separación física apropiada de las áreas de atención de los pacientes y se utilice solamente para la preparación de las fórmulas infantiles y alimentación enteral con las técnicas asépticas correspondientes. El diseño del cuarto de preparación debe facilitar el trabajo y la utilización de técnicas de asepsia. Debe estar disponible un lavamanos aparte que cuente con controles que no utilicen las manos. (ADA 2003)

Las áreas de preparación y almacenamiento deben estar aseguradas para evitar cualquier tipo de adulteración de las fórmulas. Debe existir suficiente espacio para la preparación de éstas. Las superficies de los pisos, paredes y techo del cuarto de preparación debe estar hecha de un material que pueda ser mantenido en una condición sanitaria. El cuarto de preparación debe estar debidamente iluminado y ventilado y debe contar con suficientes tomacorrientes.(ADA 2003)

b. Equipos y utensilios. Todos los utensilios y el equipo pequeño del cuarto de preparación deben ser apropiados para ser sanitizados. Deben existir instrucciones escritas que especifiquen el cuidado y manejo del equipo y su respectivo mantenimiento periódico. No se recomienda que se utilicen hornos de microondas, batidoras y botes de basura en el cuarto de preparación, los utensilios de limpieza deben de almacenarse en un cuarto separado del de preparación. Se recomienda que se utilice para la preparación sólo agua fría y estéril. Todos los basureros deben estar cubiertos y deben tener un dispositivo para abrirlos con los pies. (ADA 2003)

c. Personal. La responsabilidad administrativa del cuarto de preparación de fórmulas debe ser asignada a un individuo calificado como un nutricionista. Los técnicos del cuarto de preparación debe cumplir con ciertos requisitos como saber leer y escribir y tener destrezas matemáticas de nivel medio o más. El personal debe utilizar uniforme que se mantenga limpio, deben utilizar buenas prácticas de manufactura y debe existir un informe escrito que especifique el comportamiento dentro del cuarto de preparación. (ADA 2003)

d. Preparación y manejo de las fórmulas. Debe existir una guía escrita que especifique el recibo y almacenamiento de las fórmulas infantiles (ordenamiento, transmisión de órdenes al cuarto de preparación, mantenimiento de los récords de órdenes de fórmulas), para mantener su integridad, los productos que hayan expirado deben descartarse de tal manera que se prevenga el consumo humano. Las órdenes de fórmulas deben incluir el nombre del paciente, expediente médico, locación, nombre de la fórmula, densidad calórica/volumen/frecuencia de alimentación, nombre del médico responsable y fecha de la orden. (ADA 2003)

Se recomienda la utilización de autoclave o procesos térmicos para la limpieza del equipo utilizado para la preparación de las fórmulas; sin embargo, no se recomienda la utilización de esterilización terminal de las fórmulas. Se recomienda que no se agreguen medicamentos incluyendo electrolitos en el cuarto de fórmulas, no se deben agregar colorantes a alimentación infantiles y las fórmulas ya preparadas no deben congelarse. Las latas abiertas de fórmulas deben ser cubiertas y etiquetadas con fecha de expiración; deben almacenarse en un lugar seco y seguro.(ADA 2003)

e. Repartición de las fórmulas. Las fórmulas no deben ser almacenadas en la misma refrigeradora en la que se guarda comida, cualquier instrumento que sea llevado a las salas de atención de

pacientes no debe regresar al área de almacenamiento o ser utilizado por otro paciente. Idealmente, todas las botellas, mamones y alimentadores deben utilizarse una sola vez para evitar infecciones. Nunca se deben utilizar microondas para calentar las alimentaciones infantiles. Para los infantes que son alimentados con mamón, cualquier remanente de fórmula debe descartarse después de una hora. (ADA 2003)

f. Control microbiológico y de infecciones. Procedimientos de control de infecciones deben seguirse por todo el proceso de alimentación enteral, desde la preparación hasta la administración. Se debe utilizar el Análisis de Puntos y Riesgos Críticos de Control (HACCP), en todos los aspectos del proceso de alimentación. Los elementos del plan incluyen: prevención de contaminación exógena de productos infantiles durante el recibo, preparación, almacenamiento, repartición y administración; prevención de crecimiento de microorganismos presentes en la fórmula preparada durante los pasos anteriores y detección de cualquier infección o toxina que sea debida a contaminación de la fórmula. (ADA 2003)

5. Esterilización de vapor o autoclave. El procesamiento térmico es uno de los métodos más importantes desarrollados por el hombre para alargar la vida de anaquel de productos alimenticios. El término estéril se refiere a una condición en la que no se encuentra presente ningún microorganismo que sea capaz de reproducirse en condiciones óptimas para su crecimiento. Por lo tanto, el término esterilización se aplica a cualquier proceso que reduce completamente todos los microorganismos y produce una condición estéril en los alimentos; además busca parar la actividad enzimática en el producto con el menor efecto posible en el valor químico y nutritivo del producto. Esto tiende a incrementar las temperaturas de procesamiento y reducir los tiempos de procesamiento. (Harris 1977:205)(Hoyem 1977:263)

La esterilización por autoclave significa un tratamiento térmico a 115-120°C por 15-20 minutos. Se utiliza para leche evaporada, cremora y fórmulas infantiles, entre otros usos. Este procedimiento es muy importante porque se utiliza comúnmente para asegurar la inocuidad de productos como las fórmulas infantiles, las cuales pueden causar consecuencias fatales para los neonatos si presentan microorganismos patógenos. El proceso es bien conocido y da excelentes resultados, sobre todo los autoclaves hidrostáticos continuos. Sin embargo, muchas veces los productos adquieren un sabor a cocido, color café-amarillo y el proceso es relativamente caro. (Hoyem 1977:263)

Existen dos tipos de esterilizadores por autoclave: los continuos y los de grupo (batch). La preservación por calor de alimentos líquidos y sólidos en equipos de autoclave de grupo o continuos se realizan dentro de su contenedor final, que en el caso de las fórmulas infantiles son las pachas. El producto que va a ser esterilizado se prepara, precocina si es necesario y algunas veces se pre-esteriliza. Después se pone en el contenedor bajo condiciones estrictas de higiene, se sella herméticamente y se transporta al esterilizador.

El equipo de autoclave de grupo se caracteriza por un instrumento de presión en el cual se lleva a cabo todo el proceso. Los contenedores se ponen en una especie de canasta ordenados y luego se mete adentro del autoclave, el cual se cierra. Luego se puede comenzar el proceso. Los autoclaves antiguos se operaban manualmente, pero los modernos poseen un programa de control que realiza todos los procedimientos de llenado de vapor o agua caliente, control de presión y temperatura, tiempo de calentamiento y de enfriamiento, automáticamente. El equipo de autoclave de grupo es simple y puede ser utilizado para pequeñas cargas y una gran variedad de tipos de contenedor. La principal preocupación que se debe tener con estos autoclaves es asegurarse que la temperatura se distribuya de igual forma para todos los contenedores durante la esterilización. Esto puede asegurarse al agitar o mezclar bien el medio de calentamiento durante el procesamiento. Otro punto importante de estos autoclaves es que presentan un alto consumo de vapor y agua para el enfriamiento, además que todavía es muy difícil cargar y descargar el autoclave manualmente. (Hoyem 1977:42) Este tipo de autoclaves son los que nos interesan para los fines de la investigación porque son los que se utilizan en los hospitales públicos para la esterilización de las fórmulas lácteas.

Un punto importante de los autoclaves de grupo es que inclusive después de mezclar profundamente el medio de esterilización, tomando en cuenta ya sea vapor, mezclas de vapor-aire o agua bajo presión, es inevitable que durante los primeros minutos después de alcanzar las condiciones de esterilización; todavía se encuentren diferencias considerables en la temperatura entre las locaciones dentro del autoclave. Esto es más serio cuando se procesan productos con alta transferencia interna de

calor, y estos son justo los productos que necesitan ser esterilizados a las temperaturas más altas posibles en los periodos de tiempo más cortos. Por lo tanto, la rotación del producto adentro del autoclave puede ser muy útil en este tipo de productos. (Hoyem 1977:44)

Los autoclaves continuos son los que se utilizan en grandes plantas de alimentos puesto que están diseñados para capacidades muy altas de producción, pero tiene una limitada variedad de tipos de contenedores. Se caracterizan por dos o más llaves mecánicas o de presión en cada terminación del compartimiento de esterilización. Una de las mayores ventajas de estos autoclaves continuos es que las diferencias en la temperatura dentro de los compartimientos de esterilización es mínima. Todos los contenedores siguen el mismo camino, por lo que es suficiente mantener control de la temperatura sólo en algunos lugares. La instalación de los autoclaves continuos es muy complicada por lo que las ventajas de este tipo de esterilización sólo se pueden gozar con capacidades de producción muy altas. Entre los autoclaves continuos se encuentra el esterilizador hidrostático, llamado de esta manera por las columnas de agua que tiene adentro y funcionan como válvulas. Este tipo de autoclave tiene cuatro zonas: precalentamiento, esterilización, preenfriamiento y enfriamiento. Las columnas de agua ayudan a hacer estas transiciones graduales para evitar un shock de temperatura o presión. Este sistema hidrostático puede soportar botellas de vidrio, aluminio o plástico y latas. (Lingle 1990:73) (Hoyem 1977:43)

A pesar de la esterilización, es posible hallar esporas de resistencia térmica diferente. En la leche, existen células cuya resistencia térmica práctica es muy diferente de la de otras. Las células más resistentes son las menos abundantes en las condiciones ordinarias. Para poder acabar con todas las esporas y microorganismos se necesitarían procesos más violentos a mayores tiempos, lo cual en el caso de la leche no es posible puesto que se alterarían sus propiedades organolépticas. Por lo tanto, la esterilidad absoluta de grandes volúmenes de leche es, prácticamente, imposible. (Burton 1965:36)

a. Efectos del procesamiento térmico en la leche. A pesar que el procesamiento térmico es beneficioso para asegurar la inocuidad de los alimentos en riesgo de presentar bacterias patógenas para el hombre, también tiene otros efectos, produce un efecto negativo ya que se lleva a cabo una degradación térmica de los nutrientes contenidos en los alimentos, también puede que se aumente la biodisponibilidad de algunos nutrientes de ciertos alimentos; sin embargo, estos alimentos tienen un menor contenido de nutrientes que los productos frescos. La estructura química de estos alimentos puede quedar alterada hasta el punto de que desaparezcan sus efectos fisiológicos específicos. La estabilidad de los nutrientes (aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos, minerales y vitaminas) es diferente. En la esterilización térmica de la leche se puede esperar la pérdida de alguno de estos nutrientes ya que es un alimento que contiene casi todos los nutrientes. Las fórmulas infantiles combinan una serie de factores que las hacen altamente sensitivas a reacciones de Maillard, como sus altos contenidos de lactosa y lisina, las altas temperaturas aplicadas y almacenamiento por largos periodos de tiempo. Además, debido al enriquecimiento con ciertos compuestos como vitamina A, hierro y lactosa. (Burton 1965:37)(Ferrer 2000:1817) Por lo tanto, es importante conocer cuánto se pierde de estos nutrientes y su efecto para la nutrición humana, sobre todo la de lactantes o niños, en la que la leche ocupa un lugar primordial, como lo es en los recién nacidos prematuros. La reducción del contenido de nutrientes de los alimentos como resultado del procesamiento térmico depende de la severidad del proceso. (Harris 1977:205)

Ya que la destrucción de los nutrientes durante el procesamiento térmico depende del tiempo y la temperatura utilizada se ha dado un aumento gradual de las temperaturas de procesamiento, ya que a una mayor temperatura y un menor tiempo de procesamiento se aumenta la retención de nutrientes en los alimentos. (Harris 1977:227)

1) Efectos en los carbohidratos y proteínas. Los carbohidratos son afectados por las altas temperaturas, pero actúan diferente ya que hay muchos tipos de carbohidratos. El calor tiene efectos sobre las propiedades físicas de los azúcares como en las formas tautoméricas de los azúcares reductoras y la tendencia a cristalizarse. También tiene efectos sobre las propiedades químicas como el sabor, ya que la dulzura puede aumentar o disminuir por el calor; la caramelización, ya que el calor provoca que se forme una sustancia café con un olor característico y composición incierta producidas por el rompimiento térmico de los carbohidratos; la pirólisis que son uniones carbono-carbono y la interacción con otros componentes alimenticios como con proteínas y lípidos. (Hoyem 1977:168)

La reacción de Maillard es un grupo complejo de transformaciones que traen consigo la producción de melanoidinas coloreadas que van desde amarillo claro hasta café oscuro o incluso negro; para que se lleve a cabo esta reacción es necesario que esté presente un azúcar reductor (cetosa o aldosa)

y un grupo amino libre proveniente de un aminoácido o de una proteína. Esta reacción es indeseable para algunos productos como la leche. Esta reacción está principalmente influenciada por los siguientes parámetros: A pH alcalino se incrementa la velocidad y alcanza un máximo a pH 10, sin embargo, hay que recordar que existen muy pocos alimentos en forma natural con pH mayor de 7, y el mecanismo se inhibe en condiciones muy ácidas que normalmente no se encuentran en los alimentos; las temperaturas elevadas también aceleran las reacción, pero debido que su energía de activación es baja, también se observa hasta en condiciones de refrigeración, por cada 10°C de aumento, la velocidad se incrementa de dos a tres veces; otro factor importante es la actividad acuosa por lo que los alimentos de humedad intermedia son los más propensos, una actividad acuosa baja no permite la movilidad de los reactantes y se inhibe el mecanismo y una actividad alta produce el mismo efecto ya que el agua tiene una acción inhibitoria; el tipo de aminoácido es decisivo, puesto que éstos serán más reactivos en la medida en que se incremente el tamaño de la cadena y tenga más de un grupo amino, por esta razón la lisina, con su amino en la posición ϵ es el más activo, también pueden intervenir otros como la arginina, histidina y el triptófano; los azúcares reductores que más favorecen la reacción son en primer lugar, las pentosas y en segundo lugar las hexosas, las aldosas actúan más fácilmente que las cetosas y los monosacáridos son más efectivos que los disacáridos. Por lo tanto, la xilosa es el azúcar más activo, seguido de la arabinosa, galactosa, la glucosa, la fructosa, la lactosa y la maltosa; por su parte, la sacarosa no es azúcar reductor, por lo que no interviene a menos que se hidrolice previamente, lo cual es muy sencillo. Los ácidos nucleicos también intervienen porque contienen ribosa que es altamente reactivo. Otro factor que influye en las reacciones de Maillard es el contenido de metales como el cobre y el hierro ya que tienen un efecto catalizador sobre la formación de las melanoidinas. (Badui 1999:75)(Hoyem 1977:169)(Lowry 1989:1024)(Tomarelli 1985:316)

La reacción de Maillard se lleva a cabo de una manera muy compleja mediante un gran número de mecanismos que incluyen la posible producción de radicales libres. La reacción se divide en cuatro etapas: la primera es la condensación del azúcar reductor con el grupo amino, que consiste en que el grupo carbonilo libre de un azúcar reductor se condensa con el grupo amino libre de un aminoácido y se forma la base de Schiff (ver anexo 1 parte 1), luego la base de Schiff se cicla y genera una glucosilamina que puede ser, según intervenga una aldosa o una cetosa, alsosamina o cetosamina, respectivamente (ver anexo 1 parte 2), estos compuestos no pueden ser digeridos por las enzimas digestivas. Hasta este momento no hay producción de sustancias coloreadas ni de compuestos insaturados que absorban radiaciones. Después de esto se da una transposición de los productos de condensación ya que los productos son inestables. Por lo tanto, las aldosaminas se isomerizan a cetosas por el mecanismo de Amadori y las cetosaminas se transforman en aldosas por la transposición de Heyns (ver anexo 1 parte 3). Después de esto, los compuestos formados pueden sufrir modificaciones muy profundas, en esta fase aparecen algunos olores, se incrementa el poder reductor, se observan ligeramente tonalidades amarillas y aumenta la absorción de las radiaciones ultravioleta.

Las principales reacciones que suceden son de deshidratación de los azúcares por isomerización enólica, con lo cual se sintetiza furfural y sus derivados, así como reductonas y dehidroreductonas, ambas con alto poder reductor. Además de la deshidratación, se presentan igualmente mecanismos de fragmentación de los azúcares enólicos, con lo cual se favorece la síntesis de un gran número de compuestos de peso molecular bajo, como aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes de dos a cuatro átomos de carbono. Por último, la fase final de esta reacción es la polimerización de un gran número de compuestos insaturados que trae consigo la síntesis de las sustancias coloreadas llamadas melanoidinas; a pesar de que su concentración es baja, ejercen un efecto muy marcado en la apariencia del alimento. (Badui 1999; 77)(Rudloff 1992:26)

La lisina es el aminoácido más afectado por la reacción de Maillard después de un tratamiento térmico porque tiene dos grupos amino que pueden ser atacados. La metionina también puede sufrir destrucción de Maillard y también puede involucrarse en otras reacciones con azúcares reductores que reducen su biodisponibilidad. Otros aminoácidos que pueden ser afectados son la histidina, treonina, fenilalanina y triptófano. Se ha demostrado en algunos estudios que la disponibilidad de la lisina en los alimentos y por lo tanto la calidad de las proteínas disminuye con tratamientos térmicos violentos en algunos alimentos que tienen alto contenido de proteínas y carbohidratos. Se ha asumido que la principal forma de bloqueo de la lisina son los productos de amadori, que sugiere que sólo se llevan a cabo los primeros pasos de la reacción de Maillard; sin embargo, ahora es evidente que reacciones de Maillard avanzadas también se llevan a cabo tempranamente durante un tratamiento térmico (Tomarelli 1985:317)(Lowry 1989:1024)(Harris 1960:525)(Leclere 2001:4682)

Según los resultados obtenidos en otros estudios, se ha observado que para una concentración de proteína de soya, la pérdida de lisina disponible pasó por tres etapas. La primera etapa de la disminución de lisina disponible se caracteriza por una pérdida rápida donde de 30-60% de la ésta se vuelve no disponible. La fase número dos muestra un aumento significativo estadísticamente cuando se mide con el método del dinitrofluorobenceno (FDNB). La tercera fase se caracteriza por una estabilización de la lisina disponible, medida con el FDNB. Ya que los resultados de este estudio son diferentes a otros se pudo establecer que los diferentes tipos de proteínas pueden tener diferentes resultados después del tratamiento térmico. (Wolf 1977:1542)

Otro estudio realizado con fórmulas infantiles demostró que los tratamientos térmicos no sólo disminuyen la disponibilidad de la lisina en las fórmulas, sino que también se observó que las proteínas quedan atrapadas en la capa de lípidos de los alimentos, lo cual fue demostrado por procedimientos de cromatografía y electroforesis y confirmado por el método de Kjeldahl para obtención de proteínas. Estas interacciones entre proteínas y lípidos causados por tratamiento térmico extenso puede afectar la digestión de las proteínas, en particular, porque estas interacciones se dan más fuertes al pH que normalmente se encuentra en los estómagos de los niños lactantes (pH de 4-5). Este estudio también encontró que las fórmulas pasadas por un esterilizador fueron más afectadas que las que fueron deshidratadas o pasadas por tratamiento UHT. (Rudlof 1992:30)

Varios estudios de este tipo se han realizado con alimentos para bebés y fórmulas enterales en general que son sometidos a procesamientos térmicos de esterilización. Entre los resultados observados, se puede ver que todavía existe controversia si los cambios en la disponibilidad de la lisina y por lo tanto la calidad de la proteína son significativos. En el estudio de Grün, *et al.* (1991) que fue realizado con alimentos para bebés de “banano” y “vegetales y carne”, se encontró que sí hay una pérdida de lisina durante el procesamiento pero no es significativa para no proporcionar los requerimientos de lisina en el cuerpo. Según los resultados de Lowry y Baker (1989), la calidad de las proteínas de las fórmulas enterales no se ven afectadas por la cantidad de carbohidratos presentes ni por el tratamiento térmico. Sin embargo, explica que ya que sólo los azúcares reductores pueden participar en la reacción de Maillard, se esperaría que al aumentar las concentraciones de estos azúcares en las fórmulas estudiadas, se aumentara también la destrucción proteica por Maillard.

Además en este estudio, la severidad del tratamiento térmico pudo no ser suficiente para causar una reducción cuantificable de la calidad de la proteína, ya que otros estudios han observado disminución de la calidad de la proteína hasta que la mezcla de caseína-carbohidrato se calienta a 180°C. La fórmula utilizada en este estudio sólo se calentó hasta 127°C y por un tiempo corto. Sin embargo, Castillo, *et al.* (2002) realizó un estudio con varios tipos de fórmulas enterales, justificándose en que las fórmulas son muy susceptible a la reacción de Maillard por su alto contenido de carbohidratos y proteínas, las cuales siempre deben ser de la mejor calidad para garantizar una buena nutrición del paciente y por lo tanto contener cantidades substanciales de lisina reactiva. Los resultados obtenidos difieren de los del estudio de Lowry ya que encontró que la lisina sí perdió su disponibilidad considerablemente sobre todo en fórmulas líquidas en comparación con las fórmulas en polvo y en las fórmulas poliméricas en comparación con las hidrolizadas. (Grün 1991:104)(Lowry 1989:1024)(Castillo 2002:333)

Algunos estudios han recomendado cambiar el tipo de azúcares utilizadas en las fórmulas enterales. La lactosa fácilmente puede participar en reacciones de Maillard, sin embargo, la maltodextrina no participa fácilmente en estas reacciones. (Evangelisti 1994:337)

2) Grasas. Las grasas son afectadas por el procesamiento a altas temperaturas ya que al ser utilizadas para frituras varias veces, se producen cambios desagradables. Esto incluye un incremento de la viscosidad, oscurecimiento del color y la formación de materiales poliméricos. Durante estos tratamientos, se disminuye el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en los triglicéridos y el valor nutricional de tales aceites. Las reacciones con oxígeno lleva a la formación de hidroperóxidos, epóxidos, hidróxidos y cetonas. (Hoyem 1977:136)

3) Vitaminas. El tratamiento térmico, relativamente prolongado y drástico, trae consigo cambios específicos en el valor nutritivo. Con respecto a las vitaminas, algunas sufren cambios considerables y otras no se ven afectadas por el tratamiento térmico. Entre las vitaminas liposolubles, la vitamina A y el caroteno pierden su actividad cuando los alimentos son calentados en la presencia de oxígeno, pero son considerablemente estables al cocinarlas ordinariamente. Se han encontrado pérdidas insignificantes en la leche que ha sido sometida a pasteurización, esterilización y deshidratación. Al freír

los aceites y grasas, se pierde considerablemente la vitamina A y carotenos. La vitamina D y E también sufren pérdidas insignificantes durante el tratamiento térmico, la vitamina E en los productos alimenticios se pueden ver de forma de tres tocoferoles, los cuales son sensibles a oxidación por oxígeno atmosférico. (Hoyem 1977:188)(Burton 1965:38).

Las vitaminas hidrosolubles son las más afectadas por el tratamiento térmico. Dentro de las vitaminas del complejo B, la tiamina es la más termolábil. De los estudios realizados se ha visto que una esterilización prolongada de leche en botellas puede conducir una pérdida del 25 al 50% de esta vitamina. Cuando la duración de la esterilización puede reducirse por medio de un procedimiento UHT, las pérdidas son menores. La vitamina B₆ también puede verse afectada por el tratamiento térmico, se han reportado pérdidas de hasta 30-50% de esta vitamina durante la cocción y fritura de carnes y vegetales. Durante la esterilización de leche en botella se puede llegar a destruir hasta 50% de esta vitamina y durante el proceso de UHT y pasteurización un 10%. La vitamina B₁₂ se ve destruida casi en su totalidad por los procedimientos de esterilización, un 70% a 110°C durante 20 minutos, un 80% a 120°C durante 30 minutos y de un 90-100% a 115°C durante 15 minutos. La vitamina B₂ no se ve afectada significativamente, según algunos investigadores, a la esterilización las pérdidas no exceden el 5%. (Burton 1965:40)(Hoyem 1977:198)

La vitamina C (L-ácido ascórbico) es uno de los ácidos orgánicos más importantes en frutas y vegetales, en relación con su valor nutritivo. Su contenido se utiliza no sólo como un índice nutricional, sino también para evaluar efectos de procesamientos ya que esta vitamina es muy inestable. Las pérdidas de la vitamina C se dan en mayor parte cuando se cocina a vapor o presión que cuando se pone a hervir en agua, debido a la oxidación. En la leche, las pérdidas de vitamina C han sido de hasta 20% después de ser sometidas a pasteurización o UHT y de hasta un 50% después de ser sometida a esterilización en la botella. Otros autores afirman que se pierde de un 40-60% de esta vitamina durante la esterilización en la botella. (Burton 1965:42)(Hoyem 1977:193)(Melendez 2004:80)

B. Métodos de determinación de nutrientes

1. Lisina disponible. No se puede asumir que todos los aminoácidos liberados de una proteína mediante una digestión ácida (o alcalina) son absorbidos y utilizados por el organismo al ingerir los alimentos. Las temperaturas excesivamente altas pueden causar cierta destrucción del contenido total de lisina, como se explicó anteriormente. Este daño de la proteína no puede ser detectado a través de los métodos usuales para determinar estos aminoácidos, ya que dichos procedimientos involucran la oxidación previa de los aminoácidos azufrados, convirtiéndolos en ácido cisteico y sulfonato de metionina. (Pellet 1980:17)

La lisina desempeña un papel esencial en la alimentación, particularmente en todos los organismos en fase de crecimiento; por otra parte, este aminoácido está especialmente expuesto a bloqueos por los azúcares reductores tanto en las fases de conservación (leche en polvo), como en los procesos tecnológicos (calentamientos). (Adrian 2000: 180)

El daño que sufre la leche en polvo durante su procesamiento puede explicarse por la reacción entre la lactosa y los grupos epsilon-NH₂ libres de las moléculas de lisina contenidas en la proteína, hecho cuyo resultado es que estas unidades de lisina ya no sufren la reacción de Van Slyke y no forman derivados de dinitrofenilo (DNF) con el fluorodinitrobenzoceno (FDNB), transformándose en moléculas de lisina "no disponible" nutricionalmente, tal como se ha demostrado en experimentos biológicos con animales. (Pellet 1980:19)

El análisis de la lisina disponible por un método químico corresponde, prácticamente, al análisis de los grupos ε-amino que permanecen libres. Estas funciones amino libres reaccionan fácilmente con muchos reactivos: el 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB), el ácido trinitrobenzoceno sulfónico, la o-metil isourea, la fluorescamina, etc. (Adrian 2000:181)(Linden 1996:521)

La técnica que más se ha utilizado durante el tiempo es la del DNFB. Este reactivo reacciona con todos los aminoácidos que poseen grupos amino libres, dando dinitrofenil-aminoácido (DNP-aminoácido). La muestra a analizar se pone en contacto con el DNFB, en medio alcohólico, durante dos horas; una vez formados los DNP-aminoácidos, se efectúa una hidrólisis clásica con HCL 6M durante 16 horas. Los DNP-aminoácidos distintos a la DNP-lisina se eliminan por extracción con éter. Finalmente, la

DNP-lisina se cuantifica colorimétricamente a 435nm; su purificación, a través de una columna de amberlita CG 120, mejora el método y resulta más específica. (Adrian 2000:181)

Este método es aplicable a numerosos productos alimentarios, especialmente a los que poseen un porcentaje elevado de lisina y pequeño de glucidos y que no han sido sometidos a procesos tecnológicos severos. Por el contrario, en los productos vegetales ricos en glúcidos, se observan discordancias con los métodos biológicos: en este caso, durante la hidrólisis química de la muestra, una fracción de la DNP-lisina corre el riesgo de ser destruida por los productos de la hidrólisis de los glúcidos. Estos generan sustancias reductoras que reaccionan con la DNP-lisina. Las pentosas son, en gran medida, responsables de este hecho porque dan furfural en medio ácido. La reacción con los glúcidos puede ser minimizada hidrolizando la muestra en un gran volumen de HCL 6M y por adición de ácido tioglicólico. Sin embargo, el método de determinación basado en el DNFB está cada vez más restringido por los efectos cancerígenos del DNFB. Por esta razón en esta investigación se decidió utilizar el método de enlace de colorante (dye-binding). (Adrian 2000:182)(Linden 1996:522)(Nollet 1996:1687)

Se prefiere el término “lisina reactiva” que el de “lisina disponible” desde que en las proteínas parcialmente no digeribles, la porción ni digerible incluye “lisina reactiva” la cual es claramente no disponible nutricionalmente. La lisina reactiva es un estimado más cercano de la cantidad de lisina biológicamente disponible que lo que es el estimado de “lisina total” después de la hidrólisis ácida. El procedimiento de lisina por enlace de colorante requiere dos mediciones de capacidad de enlace de colorante (CEC), una en la muestra no modificada y la otra en la muestra después de ser tratada con anhídrido propiónico, el cual neutraliza la parte básica de los grupos libres de NH_2 en las unidades de lisina en las proteínas por propilación, es decir inactiva los grupos de lisina pero no afecta la arginina ni la histidina. La primera medida determina histidina+arginina+lisina y la segunda medida determina solamente histidina+arginina. De esta manera, la diferencia entre estas dos medidas sirve para determinar la medida de lisina presente. (Hurrell 1979:221)(Pellet 1980:24)

El análisis se realiza generalmente con el equipo comercial de Pro-Meter MK II, el cual da la medida de lisina en 40 minutos. La CEC de una muestra es la cantidad de colorante enlazado dividido el peso bajo condiciones particulares. Cuando una solución de ácido naranja 12 se agita con una material que contiene proteínas, el colorante se enlaza covalentemente con los grupos amino básicos independientemente de que la proteína se encuentre en solución y ésta se precipita como un complejo colorante-proteína. Después de agitar hasta el punto de que la reacción ha llegado al equilibrio, la cantidad de colorante enlazado se calcula al medir la extinción del colorante que queda en la solución. (Hurrell 1979:221)

Los procedimientos de enlace de colorante que utilizan colorantes como el ácido naranja 10 y el ácido naranja 12 determinan rápidamente la cantidad de todos los grupos básicos en las proteínas de los alimentos. Han sido utilizados para proveer estimaciones indirectas de la proteína total en muestras alimenticias, como la leche, la cual tiene proporciones constantes de cada aminoácido y también para estudios de cereales con un contenido alto de lisina. También se ha utilizado como indicadores de la calidad en proteínas en ciertos materiales procesados que han sufrido ciertos daños en lisina, lo cual causa una reducción en la capacidad enlace de colorante de las proteínas. Las reacciones tempranas de Maillard con azúcar reducidos no causan una reducción en la capacidad de ácido naranja. (Hurrell 1979: 221)

Se debe tener cuidado en la realización de estos procedimientos ya que se debe asegurar que la mezcla de la reacción tenga suficiente colorante para saturar las proteínas (de otra manera puede que no se forme el coágulo de proteína coagulada). También se debe asegurar que no haya demasiado colorante ya que puede causar una pérdida de sensibilidad en el conteo de los cambios de la concentración en contra de mucho color. (King 1978:58)

2. Método del 2,6-diclorofenolindofenol para determinar vitamina C. Las frutas y vegetales son los alimentos que tienen una mayor concentración de vitamina C. Esta vitamina se encuentra naturalmente como dos vitameros activos biológicamente, el L-ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico. Estos isómeros están normalmente ligados a proteínas en los productos animales. La vitamina C se utiliza como un indicador de la estabilidad de las vitaminas en los alimentos, ya que es muy lábil. Las propiedades de óxido-reducción del ácido ascórbico son utilizadas como una reacción fundamental para la determinación de la vitamina C. En tales métodos, se prepara extractos de ácidos de alimentos u otros materiales que se estén utilizando. La capacidad reducida del extracto se mide por el tratamiento con un agente oxidante como el 2,6-diclorofenolindofenol, yoduro, ferricianuro, azul de

metileno, etc. De todos estos agentes, se ha encontrado que el 2,6-diclorofenolindofenol es el más satisfactorio.(Nollet 1996:651)(King 1978:20)

Este método se basa en la reducción de la sal de sodio del colorante azul, resultando en una formación de un derivado sin color y el ácido dehidroascórbico. El punto final de la titulación es indicado por la persistencia del color rosado en la solución. El primer paso de la prueba es la extracción del ácido ascórbico, la cual se realiza utilizando algunos ácidos como el ácido oxálico, ácido tricloroacético, ácido metafosfórico y una mezcla del ácido metafosfórico y acético. El más popular es el ácido metafosfórico, el cual se va a utilizar para las pruebas a realizarse en esta investigación, ya que es un buen extractor y puede estabilizar la vitamina por un periodo limitado al minimizar la tasa de oxidación. (King 1978:20)(Meléndez 2004:81)(Strohecker 1967:276)

Los problemas encontrados en el análisis de la vitamina C en alimentos se relacionan mayormente en la eliminación de varias sustancias que interfieren. Estas sustancias pueden ser compuestos sulfidrilos, fenoles, sulfitos e iones de cobre, hierro y estaño. También los pigmentos de las plantas pueden oscurecer las reacciones de color y un grupo de sustancias reductoras, que son llamadas colectivamente “reductonas”, que son cocinadas y procesadas en los alimentos también pueden ser problemáticas. Se han sugerido algunas modificaciones para eliminar algunas de estas interferencias como el uso de acetona al 20%, que remueve los sulfitos, o la adición de formaldehído para minimizar la interferencia de las reductonas. (King 1978:19)

3. Análisis proximal de las fórmulas

a. Método Kjeldahl para determinación de proteínas. Se trata del método clásico para determinar la cantidad de proteína de un producto a partir de su contenido de nitrógeno. Se asume que la totalidad del nitrógeno está en forma proteica, aún cuando la realidad es que, según la naturaleza del producto, una fracción considerable del nitrógeno procede de otros compuestos nitrogenados (bases púricas y pirimídicas, creatina y creatinina, urea, amoniaco, etc.) (Adrian 2000:41)

La muestra se introduce en un matraz. Para una alícuota de muestra inferior a 5g, la mineralización se realiza adicionando de 15 a 25mL de ácido sulfúrico concentrado y un catalizador mineral constituido por una mezcla de sales de cobre, óxido de titanio o/y óxido de selenio. En el caso del laboratorio de la universidad se utiliza el óxido de mercurio para la reacción, sin embargo, este reactivo ya no se está utilizando por razones de protección del medio ambiente. (Adrian 2000:42)

Se añade de 3 a 5 gramos de sulfato potásico o sódico para aumentar el punto de ebullición de la mezcla reaccionante y también aumentar la velocidad de la conversión de las materias nitrogenadas en sulfato amónico. La ebullición se debe mantener 30 minutos más después que la mezcla se ha decolorado ya que la mineralización no ha terminado del todo (la función amina de los aminoácidos y de las bases nucleicas no ha sido convertida cuantitativamente en amonio). (Adrian 2000:42)(Nollet 1996:867)

Después de enfriar, el tubo se lleva al soporte del destilador y se adiciona solución de hidróxido sódico en cantidad suficiente para alcalinizar fuertemente el medio y así desplazar el amoniaco de las sales amónicas para que pueda ser arrastrado por el vapor de agua inyectado en el contenido del tubo. El destilado se recoge en un volumen, en exceso, de una solución de ácido bórico (del 4-10%) para fijar el amoniaco. La cuantificación del nitrógeno se realiza por medio de una titulación usando como indicador una solución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno. (Adrian 2000:42)(Nollet 1996:867)

b. Método de Babcock para determinar grasas. En la leche, los glóbulos de grasa están presentes como una emulsión de aceite en agua y están rodeados de un film delgado de proteínas. La emulsión debe romperse y se debe remover el film de proteína antes de que la grasa sea separada y determinada volumétricamente. Esto se llega a realizar con la ayuda de ácido sulfúrico por el método de Babcock. En el método de Babcock 17.6mL de leche se mezclan con 17.5mL de ácido sulfúrico de gravedad específica de 1.8-1.83 en una botella especial, el cual se agita hasta que esté homogéneo, se centrifuga y se sumerge en agua a 63°C. La grasa que se levanta se calcula midiendo la altura que se forma en un cuello graduado. (Pomeranz 2000, 691)

Uno de los problemas de la utilización de esta prueba de Babcock es la utilización del ácido sulfúrico, el cual es desagradable y corrosivo. Para solucionar estos problemas se recomienda la

utilización de detergentes. El fosfato dioctyl de sodio, el cual es un detergente aniónico, dispersa la capa de proteínas alrededor del glóbulo de grasa y libera la grasa. Después el monolaurato de polietileno sorbitan, un detergente hidrofílico muy fuerte, completa la separación. (Pomeranz 2000:691)

c. **Determinación de humedad.** La determinación del contenido de agua responde a diversas necesidades. La primera es comercial: en una transacción, es preferible comprar de acuerdo a la materia seca que sobre el producto entero. La segunda necesidad es reglamentaria: la ley fija, por razones higiénicas y comerciales, los contenidos máximos de agua para un gran número de productos alimentarios. La tercera razón es tecnológica: la realización de numerosos procesos de transformación, como el secado, necesita el conocimiento de este valor. La cuarta razón es de orden analítico: la composición de un producto alimentario se expresa, en general, respecto a la materia seca para facilitar la comparación entre las muestras. Por esta última razón se realiza este procedimiento en esta investigación, ya que ayudará a realizar el análisis proximal de las muestras que se están comparando y del contenido total de nutrientes. (Adrian 2000:32)

Por la importancia de estos fines, es necesario disponer de métodos analíticos que posean las cualidades de precisión, fiabilidad, reproducibilidad, rapidez, etc. En el caso de la medida del contenido en agua surgen dos dificultades específicas. La primera es definir el agua que se desea cuantificar, tarea difícil por las especiales propiedades de la misma. Se ha definido el contenido de agua como la cantidad de agua que se ha perdido por una sustancia cuando alcanza un equilibrio verdadero frente a una presión de vapor de agua nula y en condiciones en que las posibles reacciones perturbadoras sean evitadas. En la industria agroalimentaria sólo se usan métodos de referencia prácticos para la determinación de la cantidad de agua. La segunda dificultad es la inexistencia de patrones de contenido de agua ya que el contenido de agua de cualquier producto depende de la humedad y de la temperatura de la atmósfera del entorno. Esto hace indispensable la participación del laboratorio de análisis entre laboratorios para detectar posibles errores experimentales y corregirlos. (Adrian 2000:33)

Los métodos de determinación de humedad pueden ser clasificados de dos maneras: una forma es por los cuatro mayores métodos analíticos (secado, destilación, químico y físico); la otra manera es por procedimientos directos e indirectos basados en una teoría científica. Con los métodos directos, la humedad es removida normalmente de muestras sólidas de alimentos por medio de secado, destilación, etc., y la cantidad es medida por el peso, titulación, etc. Con los métodos indirectos, la humedad no es removida de la muestra, sino que en lugar de esto, se miden las propiedades de un sólido que dependen de la cantidad de agua o número de hidrógenos. Los métodos indirectos usualmente presentan resultados muy acertados del contenido de humedad; pero son manuales y consumen mucho tiempo. Por otro lado, los métodos indirectos son rápidos, no destructivos y ofrecen la posibilidad de automatización para determinaciones continuas. (Mollet 1996: 66)

d. **Determinación de cenizas.** Las cenizas son los residuos inorgánicos de la incineración de materia orgánica. La cantidad y composición de cenizas en un producto alimenticio depende de la naturaleza de los alimentos al los que se le prendieron fuego y del método de determinación de cenizas. (Pomeranz 2000:602)

Muchos productos lácteos contienen de 0.5-1.0% de cenizas. El contenido de cenizas aumenta a 1.5% en leche evaporada, y a casi 8% en leche descremada en polvo. Las cenizas en el queso depende del contenido de agua y de la presencia de aditivos minerales. Los diversos minerales que componen las cenizas en los alimentos también dependen del tipo de alimento. El calcio está presente en altas concentraciones en los productos lácteos y los productos que contienen lácteos, cereales, nueces, pescado, huevos y ciertos vegetales. Los productos lácteos también son ricos en fósforo, sodio, sulfuro, etc. En el caso de las fórmulas para recién nacidos pretérmino, se adicionan especialmente con cantidades mayores de minerales por la carencia y requerimientos aumentados de estos pacientes, como se explicó anteriormente. Por esta razón se espera obtener una mayor cantidad de minerales. (Pomeranz 2000:602)

Para la determinación de las cenizas se han utilizado dos procedimientos más importantes, estos son: cenizas en seco y cenizas en mojado. Para determinar cenizas en productos secos, se debe oxidar la materia orgánica de la muestra por medio de una incineración completa a una temperatura elevada (alrededor de 550°C) en la presencia de oxígeno. Para determinar cenizas en productos que contienen agua se debe oxidar la muestra con una mezcla de ácido concentrado. Esto se utiliza para determinar el contenido total de cenizas y también antes de determinar los minerales por separado. La cantidad de cenizas totales se utiliza como un indicativo de propiedades funcionales en algunos productos, también se

utiliza como un parámetro del valor nutricional de algunos alimentos. (Pomeranz 2000:604)(Mollet 1996: 86)

Al realizar las pruebas de determinación de cenizas se debe tener cuidado de evitar que la muestra se contamine utilizando todas las medidas higiénicas desde la toma de la muestra hasta el almacenamiento de ésta. Ya que todos los alimentos pueden ser sujetos a contaminación, se deben remover todas las impurezas. Los alimentos deben mezclarse muy bien. Los lípidos son prácticamente libres de minerales y como los productos animales pueden variar en su contenido de lípidos, también varía el contenido de minerales. Los productos líquidos o húmedos son usualmente secados en hornos. Las condiciones para la corrosión son ideales en estos hornos y pueden ser una fuente de contaminación. Para prevenirlo, usualmente se cubren con vidrio agujereado para no interferir con el secado. Se prefiere pequeñas cámaras de vidrio individuales. La contaminación de los reactivos y contenedores también pueden causar resultados erróneos, así como también la contaminación del interior de las paredes de la mufla. (Pomeranz 2000:610)

Para la determinación de cenizas en muestras líquidas se puede utilizar algún ácido, el ácido nítrico es un buen oxidante, pero usualmente llega a ebullición antes de que la muestra esté completamente oxidado. La mezcla de ácidos son los reactivos usuales para la descomposición de material orgánico en procedimientos de determinación de cenizas en líquidos. El uso de una mezcla de ácido sulfúrico y ácido nítrico se recomienda. (Pomeranz 2000:614)

e. **Determinación del color.** El color es un aspecto cualitativo en muchos alimentos, tanto procesados como no procesados; es un atributo de calidad y junto con el sabor y la textura juegan un papel muy importante en la aceptabilidad de los productos alimenticios. Adicionalmente, el color puede proveer una indicación de los cambios químicos que ha sufrido el alimento durante el calentamiento, el tostado o la caramelización. Generalmente el color de los alimentos se determina por reflectancia. Existen varios sistemas para la clasificación del color. Entre ellos, los más utilizados son: el Sistema de la Comisión Internacional de Iluminación (CIE), el Munsell y el Hunter. (Demman 1982:189)

Hunter Lab es una fábrica que ofrece a la industria diversidad de instrumentos para la medición de color en textiles, alimentos, plásticos, químicos y muchos otros productos. El colorímetro Hunter Lab Color Quest II es un equipo capaz de realizar análisis de color en alimentos y en otros productos similares. Este tipo de instrumentos ofrece las siguientes ventajas; combina el hardware y software apropiados para el producto a analizar, es duradero, puede emplearse muchas veces al día, acomodan dispositivos para el manejo de muestras, lo cual hace que el método para la medición del color sea rápido y eficiente. Además, a pesar de ser sofisticado, es fácil de utilizar. El sistema Hunter L,a,b se utiliza ampliamente en la colorimetría de alimentos. La escala utilizada se basa en la teoría de los colores opuestos de la visión. En esta teoría, las respuestas rojas se comparan con las verdes y los amarillos con los azules. Estas dos dimensiones de color se asocian con los símbolos a y b. La tercera dimensión del color es la claridad (L). (Demman 1982:189)

C. Análisis microbiológico

1. **Determinación de bacterias coniformes.** El término coliforme no es una clasificación taxonómica sino una definición de trabajo que se utiliza para describir un grupo de bacterias entéricas que se caracterizan por fermentar lactosa para producir ácido y gas en 48 horas a 35°C, ser gram negativas, bacterias anaeróbicas facultativas de forma redonda y son indicadores de contaminación fecal; entre éstos se encuentran la *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. (Feng 1998)

Aunque los coliformes eran fáciles de detectar, su asociación con la contaminación fecal era cuestionable porque algunos coliformes son encontrados naturalmente en el ambiente. Por lo tanto se llegó a la introducción del término coliformes fecales como indicador de contaminación. Los coliformes fecales son un grupo de los coliformes totales que crecen y fermentan lactosa a una temperatura de incubación elevada, por lo que también se les llama coliformes termotolerantes. Los análisis de coliformes fecales se realizan a 45.5°C para pruebas de alimentos, a excepción del agua y moluscos, en los cuales se utiliza 44.5°C. El grupo de coliformes fecales consiste en su mayoría de *E. coli*, pero algunas otras bacterias entéricas como *Klebsiella* también pueden fermentar lactosa a estas temperaturas y por lo tanto se considera también coliforme fecal. (Feng 1998)

La detección de coliformes es utilizada como un indicador de calidad sanitaria del agua o como un indicador general de cualquier condición sanitaria en el ambiente de procesamiento de alimentos. Los coliformes fecales permanecen como el indicador estándar para los alimentos y la determinación de *E. coli* también se utiliza para indicar contaminación fecal reciente o procesamiento antihigiénico de alimentos. Casi todos los métodos para determinar *E. coli*, coliformes totales o coliformes fecales son métodos de enumeración que se basan en la fermentación de lactosa. El método del Número Más Probable (NMP) es un procedimiento estadístico, de múltiples pasos que consiste de fases presuntas, confirmadas y completadas. (Feng 1998)

Se utiliza un medio sólido para coliformes que necesita Agar de Bilis rojo violeta, VRBA, por sus siglas en inglés Violet Red Bile Agar, que contiene un indicador de pH rojo neutro, por el cual la fermentación de lactosa resulta en la formación de colonias de color rosado. (Feng 1998)

Para obtener resultados uniformes se recomienda emplear, ya sea los componentes deshidratados de los medios de cultivo, de calidad uniforme y grado químico analítico, o bien, los medios deshidratados completos. Las sustancias orgánicas y los medios deshidratados completos deben ser grado bacteriológico. Si se usan medios deshidratados completos, deben ser preparados y usados como lo recomiendan los proveedores de dichos medios. (ICAITI 1991)

Cuadro 2: Componentes del agar rojo violeta bilis (VRBA)

Componente	Cantidad
Extracto de levadura	3.0g
Peptona de carne o de gelatina	7.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Mezcla de sales biliares	1.5g
Lactosa	10.0g
Rojo neutro	0.03g
Cristal violeta	0.002g
Agar	15.0g
Agua de calidad microbiológica	1.0 L

Fuente: Icaiti 34 046 h23

La Placa Petrifilm de 3M(MR), es un medio de cultivo en formato listo para usar. Estas placas pueden ser usadas para el monitoreo microbiológico de alimentos, ambientes y superficies vivas e inertes.

La Placa Petrifilm de 3M(MR) para Recuento el Recuento Rápido de Coliformes, contiene los nutrientes del medio de cultivo VRB (bilis rojo violeta) más un acelerador de crecimiento, lo que sirve para obtener información rápida sobre coliformes. Los niveles elevados de contaminación por coliformes (> 1,000/placa) pueden comenzar a detectarse de 4 a 6 horas. Niveles presuntivos de 6 a 14 horas y niveles confirmados de 8 a 24 horas. Por su diseño y facilidad de manejo, Placas Petrifilm(MR) permite eficientar su trabajo de laboratorio y aumentar su productividad.

III. JUSTIFICACIÓN

Los recién nacidos prematuros presentan necesidades aumentadas de nutrientes ya que muchos de sus órganos no han terminado de desarrollarse y no han tenido tiempo para producir reservas, por esta razón es necesario que las fórmulas lácteas para prematuros tengan diferente proporción de nutrientes a las de una fórmula para un lactante nacido a término. Estas diferencias son más notables con respecto a los aminoácidos que contienen como la lisina, carnitina, histidina, tirosina, cisteína y taurina, cuya síntesis es insuficiente en los prematuros.

En los hospitales, las fórmulas lácteas pasan por un proceso de autoclave, que involucra altas temperaturas y permite asegurar la inocuidad de las mismas. Sin embargo, después de llevar a cabo este procedimiento dentro del Hospital Roosevelt, se ha observado que se pierde una cantidad de volumen de las pajas, por lo que es importante conocer si después de este procedimiento, las fórmulas conservan la cantidad de nutrientes concentrándose en el volumen restante o se pierden con el volumen que, según se ha observado, se pierde de la fórmula. A la vez, es de suma importancia conocer si a menor o mayor tiempo de esterilización, se pierden menos nutrientes, pero las fórmulas conservan su inocuidad.

La lisina es un aminoácido esencial para los neonatos prematuros. Su disponibilidad puede verse afectada por el tratamiento a altas temperaturas, como lo es la esterilización, a la cual son sometidas las fórmulas lácteas en los hospitales. La importancia de conocer la lisina disponible en las fórmulas lácteas, es que cuando ésta pierde su calidad para ser utilizada por el organismo, indica que los demás aminoácidos también han perdido su calidad nutricional, por lo que es un buen instrumento para conocer la condición de las proteínas en general.

La vitamina C es también un micronutriente esencial en recién nacidos prematuros que sirve para la formación de neurotransmisores e interviene en el metabolismo de la tirosina, además que de todas las vitaminas, es la más inestable y lábil, por lo que se puede utilizar su contenido residual en los alimentos como un índice de retención de nutrimentos, ya que si resiste el procesamiento, quiere decir que todos los demás nutrimentos se verán poco afectados.

La nutrición de la población de los prematuros de la sala de Recién nacidos de alto riesgo del Hospital Roosevelt es de suma importancia por la cantidad de fórmula que se les administra. Por las diversas patologías que presentan, el bajo peso, medicamentos y soluciones que se les prescriben, los prematuros de alto riesgo generalmente tienen restricciones de líquidos y los volúmenes de las fórmulas son normalmente de 10 a 30 cc; por lo tanto, las pérdidas de nutrientes pueden ser más significativas que en volúmenes grandes de líquido.

Esta investigación ayudará a determinar si a pesar del tratamiento térmico recibido, las fórmulas para prematuros conservan la calidad nutricional y microbiológica, como se espera que sea para permitir una óptima nutrición del neonato y promover su crecimiento.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivos generales

Determinar el tiempo óptimo de esterilización de las fórmulas para prematuros desde el punto de vista nutricional y microbiológico.

B. Objetivos específicos

1. Determinar la calidad nutricional de las fórmulas esterilizadas a diferentes tiempos
2. Determinar la calidad microbiológica de las fórmulas esterilizadas a diferentes tiempos.
3. Obtener el tiempo adecuado para la esterilización.

V. HIPÓTESIS

A. H_0 : La cantidad promedio de nutrientes de las fórmulas es igual antes y después de haber sido sometidas a un proceso de esterilización o autoclave

H_1 : La cantidad promedio de nutrientes de las fórmulas es mayor antes de haber sido sometidas a un proceso de esterilización o autoclave.

1. Variable independiente: La esterilización de vapor o autoclave a la que se someten las fórmulas

2. Variable dependientes: La pérdida de la calidad de amino ácidos como la lisina y la vitamina C.

B. H_0 : La cantidad promedio de microorganismos en las fórmulas para prematuros es la misma para los tres diferentes tiempos de esterilización.

H_1 : La cantidad promedio de microorganismos en las fórmulas para prematuros es diferente para los tres diferentes tiempos de esterilización.

1. Variable independiente: El tiempo de esterilización de vapor o autoclave de las fórmulas

2. Variable dependiente: Menos pérdida de nutrientes e inocuidad de las fórmulas

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

A. MATERIALES

1. **Universo.** El universo son todas las pachas de prematuros que se preparan durante el día en el lactario del área de pediatría del Hospital Roosevelt, cuyo procedimiento de preparación se detalla en el anexo 2. El trabajo de campo se realizará en los laboratorios de la Universidad del Valle de Guatemala.

2. **Muestra.** Se utilizó una población de 100 muestras en total de las cuales se tomaron 30 muestras de manera aleatoria, que se prepararon en los laboratorios de la Universidad del Valle de Guatemala, recreando exactamente el procedimiento utilizado en el Hospital Roosevelt de preparación y esterilización de las fórmulas para evitar errores.

3. Equipo

a. Físico

- 1) **Lisina disponible**
 - a) 1 balanza analítica
 - b) 4 erlenmeyers 150mL
 - c) 1 agitador
 - d) 1 centrifugador
 - e) 1 espectrofotómetro
 - f) equipo individual.

- 2) **Vitamina C**
 - a) 1 beaker de 250mL
 - b) 1 balanza analítica
 - c) 2 papel filtro whatman No. 1
 - d) 6 erlenmeyer de 50mL
 - e) 1 pipeta para titulación
 - f) 1 frijol magnético
 - g) 1 agitador
 - h) equipo individual.

- 3) **Determinación de coliformes**
 - a) 1 pipeta estéril
 - b) 1 incubadora
 - c) 30 placas Petrifilm 3M
 - d) equipo individual.

- 4) **MicroKjeldahl**
 - a) 2 balones Micro Kjeldahl de 30 mL
 - b) 1 digestor eléctrico micro
 - c) 1 microdestilador al vapor por calentamiento eléctrico con reóstato
 - d) balanza analítica
 - e) equipo individual.

- 5) **Método de Babcock**
 - a) 2 balones Babcock estándar para pruebas de leche

- b) 2 pipetas de 17.6mL
- c) centrifugador
- d) 1 estufa de baño de maría
- e) equipo individual.

6) Humedad

- a) 2 cajas de metal
- b) 1 horno a 80°C
- c) 1 secador
- d) 1 balanza analítica
- e) 1 par de guantes

7) Cenizas

- a) 2 crisoles de porcelana
- b) 1 estufa
- c) 1 mufla
- d) equipo individual.

8) Color

- a) Instrumento Color Quest Sphere II.

b. Recurso humano: Investigadora, personal de laboratorio de la Universidad del Valle de Guatemala.

4. Reactivos

a. Lisina disponible

- 1) 1.76g ácido naranja 12
- 2) 20g de ácido oxálico dihidratado
- 3) 3.4g de fosfato de potasio dihidrogenado
- 4) 60 mL de ácido acético glacial.
- 5) 164g de acetato de sodio anhidro

b. Vitamina C

- 1) 3g de ácido metafosfórico
- 2) 8 mL de ácido acético
- 3) 0.025g de ácido ascórbico
- 4) 0.0625g 2,6-diclorofenolindofenol Na
- 5) 5.2mg NaHCO₃.

c. Determinación de Coliformes:

- 1) 34 gramos de KH₂PO₄.

d. Microkjeldahl:

- 1) 3mL H₂SO₄ concentrado
- 2) 0.1g de HgO
- 3) 1.5g de Na₂SO₄ pulverizado
- 4) 13mL de NaOH al 10N
- 5) 5mL de tiosulfato de sodio al 8%
- 6) 10mL de ácido bórico al 4%
- 7) 3 gotas de rojo de metilo.

e. Método de Babcock:

- 1) Hexametafosfato de Sodio
- 2) Triptón x100
- 3) Metanol

B. METODOS

1. Tipo de investigación. Éste es un estudio de tipo experimental y comparativo.

2. Selección de la muestra. Se rotularon todas las pachas de prematuros que se prepararon en las fechas calendarizadas y se utilizó una tabla de números aleatorios para asegurarse que todas las fórmulas tuvieran la misma probabilidad de ser escogidas. El autoclave que se utiliza en el Hospital Roosevelt es un modelo estático de canasta del año 1955, el cual se utiliza siempre a 121°C y a 20 libras de presión. El tiempo durante el cual se esterilizan las pachas cambia, dependiendo del número de pachas que se vayan a necesitar, desde 7 a 15 minutos.

3. Diseño experimental. Se utilizaron para todos los procedimientos de esterilización la misma temperatura de 121°C y la misma presión de 20 libras. Los tiempos de esterilización que se utilizaron fueron de 10, 15 y 20 minutos. Después de autoclavar las fórmulas, se tomaron cinco muestras para cada tiempo, utilizando la pacha antes de someterla al proceso de autoclave y esa misma fórmula después de haber sido sometida al proceso de esterilización. Se realizaron las pruebas a las muestras obtenidas ese mismo día para evitar pérdidas o errores en la medición por almacenamiento. Se realizaron los siguientes métodos para cada muestra (los pasos para la realización de los métodos se presenta en el anexo 3)

- a. Método de enlace de colorante
- b. Método del 2,6-diclorofenolindofenol
- c. Método de Kjeldahl
- d. Método de Babcock
- e. Determinación de Humedad
- f. Determinación de cenizas
- g. Obtención de carbohidratos
- h. Determinación de color
- i. Determinación de coliformes totales y E. coli.

Al obtener las mediciones, se calcularon los resultados como lo especifica cada prueba y luego se analizaron estos resultados para discutirlos y obtener conclusiones. Se prosiguió a la elaboración de recomendaciones para mejorar los resultados.

4. Tabulación de datos. Se tabularon los datos utilizando cuadros que presentaban el resultado antes y después del procesamiento térmico en sus respectivos duplicados. Se presentan todos los procedimientos realizados para cada tiempo de autoclave en comparación con los resultados obtenidos antes y después del procesamiento térmico.

5. Análisis estadístico. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizaron las siguientes pruebas: para comprobar la hipótesis número uno se utilizó una prueba t pareada por diferencias de medias entre las muestras, esto mostró si el cambio de los resultados antes y después de las pruebas fue significativo. Para comprobar la hipótesis número dos se pretendía utilizar una prueba simple de análisis de varianza (ANOVA) para la comparación de los tres tiempos; y determinar en cual de los tiempos se observó una mayor cantidad de bacterias.

VII. CRONOGRAMA

Fecha	Pruebas a realizar
Semana del 16-20 mayo	Prueba de lisina y microbiología para todas las muestras
Semana del 23-27 mayo	Prueba de vitamina C, Babcock y Humedad
Semana del 30-3 junio	Prueba de proteínas, cenizas y color
Semana del 6-10 junio	Tabulación de resultados, discusión y conclusiones

VII. PRESUPUESTO

Instrumento	Precio por unidad	Unidad	Cantidad a utilizar	Precio total
Hojas de papel bond			100	Q. 35.00
Tinta para impresora			1	Q. 150.00
Fotocopias				Q. 100.00
Acido naranja 12	Q. 532.00	25 gramos	4.4 gramos	Q. 93.63
Acetato de sodio anhidro	Q. 700.00	1000 gramos	492 gramos	Q. 344.40
Fosfato de potasio dihidrogenado	Q. 260.42	250 gramos	20.4 gramos	Q. 21.25
Acido acético	Q. 293.71	2.5 litros	420 ml	Q. 49.34
Ácido metafosfórico	Q. 659.09	100 gramos	22.5 gramos	Q. 148.29
2,6-diclorofenolindofenol	Q. 923.16	5gramos	0.0625 gramos	Q. 11.54
Bicarbonato de sodio	Q. 183.15	500 gramos	10.4 mg	Q. 0.06
Ácido sulfúrico	Q. 207.39	1 litro	90 ml	Q. 18.66
Óxido de mercurio	Q. 488.35	50 gramos	3 gramos	Q. 29.30
Sulfato de sodio pulverizado	Q. 275.10	500 gramos	45 gramos	Q. 24.76
Hidróxido de sodio	Q. 224.55	1 kilogramo	160 gramos	Q. 35.93
Tiosulfato de sodio	Q. 348.63	500 gramos	12 gramos	Q. 8.37
Acido bórico	Q. 314.20	100 gramos	12 gramos	Q. 37.70
Pruebas petrifilm			30	Q. 265.00
Pipetas desechables				Q. 15.00
Total				Q. 1388.23

VIII. RESULTADOS

C. Volumen de las fórmulas

Todos los resultados que se presentan son el promedio de cinco determinaciones, se utilizó un total de 30 muestras. A continuación se muestran los cambios de volumen que sufrieron las fórmulas después de haber sido sometidas al autoclave a una temperatura de 121° C y 15 psi. Los volúmenes iniciales fueron diferentes para recrear fielmente el método que se utiliza en el hospital porque no todas las pajas que se someten a la esterilización tienen el mismo volumen.

Cuadro 3: Cambio de volumen con respecto al tiempo de esterilización

Tiempo	Volumen inicial (mL)	Volumen final (mL)	% de pérdida de volumen	Pérdida de volumen (mL)
10 minutos	60.0	56.6	5.7	1.4±0.5
15 minutos	66.8	65.4	2.1	1.4±1.1
20 minutos	67.8	66.6	1.8	1.2±0.4

Cuadro 4: Resultados estadísticos del cambio de volumen a diferentes tiempos de esterilización:

10 minutos		
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	60	58,6
Varianza	104	114,3
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	5,715476066	
P(T<=t) una cola	0,00231792	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
15 minutos		
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	66,8	65,4
Varianza	5,7	4,3
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	2,745625892	
P(T<=t) una cola	0,025802979	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
20 minutos		
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	67,8	66,6
Varianza	5,2	5,3
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	6	
P(T<=t) una cola	0,001941269	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	

Se puede observar en el cuadro 4, que los resultados estadísticos de la prueba t realizados para conocer el cambio de volumen de las fórmulas antes y después del proceso de esterilización en autoclave

indican que si existe una diferencia entre las medias sometidas al tratamiento térmico para todos los tiempos, utilizando un nivel de confianza del 5%, por lo que el volumen antes del procesamiento es mayor que el volumen después del procesamiento. Se observó que la pérdida de volumen fue de un mililitro según el promedio de los resultados.

D. Calidad nutricional de las fórmulas

En el cuadro 5 se pueden observar los resultados de las pruebas de proteína realizadas antes y después del tiempo de procesamiento (autoclave) que se indica.

Cuadro 5: Contenido de proteína según los diferentes tiempos de esterilización

Tiempo	Proteína inicial (gramos)	Proteína final (gramos)	Pérdida de proteína (gramos)
10 minutos	12.5	11.8	0.78±1.3
15 minutos	12.5	12.1	0.44±0.8
20 minutos	12.5	12.1	0.40±0.8

Según los resultados estadísticos del cambio de la cantidad de proteína (ver cuadro 6), se puede observar que el valor del estadístico t se encuentra en la zona de no rechazo a un nivel de confianza del 5%, por lo que no existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

Cuadro 6: Resultados estadísticos del cambio de proteína

10 minutos

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	12,54	11,76
Varianza	0,063	1,258
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1,51749824	
P(T<=t) una cola	0,10187226	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184649	

15 minutos

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	12,54	12,1
Varianza	0,063	0,36
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	1,51275116	
P(T<=t) una cola	0,08439869	
Valor crítico de t (una cola)	1,85954832	

20 minutos

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	12,54	12,14
Varianza	0,063	0,503
Observaciones	5	5

Diferencia hipotética de las medias	0
Grados de libertad	5
Estadístico t	1,1888766
P(T<=t) una cola	0,14393401
Valor crítico de t (una cola)	2,01504918

En el siguiente cuadro se pueden observar los promedios de los resultados de las determinaciones de grasa antes y después de someter las fórmulas al proceso de autoclave, al igual que los promedios de la pérdida de grasa.

Cuadro 7: Contenido de grasa con respecto al tiempo de esterilización

Tiempo	Grasa inicial (gramos)	Grasa final (gramos)	Pérdida de grasa (gramos)
10 minutos	25.4	25.3	0.12±0.04
15 minutos	25.4	25.2	0.24±0.05
20 minutos	25.4	25.3	0.12±0.04

En el cuadro 8 se puede observar que para los tiempos de 10, 15 y 20 minutos de procesamiento no hubo diferencias en la cantidad de grasas de las fórmulas antes ni después del procesamiento térmico, ya que el valor del estadístico t se encuentra en la zona de no rechazo para un nivel de confianza del 5%.

Cuadro 8: Resultados estadísticos del cambio de grasa

10 minutos

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	25,4	25,28
Varianza	0	0,072
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1	
P(T<=t) una cola	0,18695048	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184649	

15 minutos

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	25,4	25,16
Varianza	0	0,108
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1,632993162	
P(T<=t) una cola	0,088903903	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846486	

20 minutos

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	25,4	25,28
Varianza	0	0,072
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1	

P(T<=t) una cola	0,18695048
Valor crítico de t (una cola)	2,13184649

En el siguiente cuadro se muestran los resultados del promedio de cinco observaciones del porcentaje de humedad de las muestras después de ser sometidas a los diferentes tiempos de esterilización.

Cuadro 9: Contenido de humedad a diferentes tiempos de esterilización

Tiempo	Humedad inicial (%)	Humedad final (%)	Pérdida de humedad (%)
10 minutos	85.1	84.7	0.36±0.5
15 minutos	85.1	86.1	-1.02±1.1
20 minutos	85.1	85.3	-0.28±0.2

Se puede observar que no existe evidencia de que haya diferencia en la humedad antes que después del procesamiento para el tiempo de 10 y 15 minutos. Para los 20 minutos de procesamiento fue rechazada la hipótesis; ya que el valor de t se salió de la zona de no rechazo. Por lo tanto existe diferencia entre la humedad antes y después de 20 minutos de procesamiento.

Cuadro 10: Resultados estadísticos del cambio de humedad

10 minutos

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	85,06	84,7
Varianza	0,003	0,18
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1,88175014	
P(T<=t) una cola	0,06650597	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184649	

15 minutos

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	86,08	85,06
Varianza	1,162	0,003
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	2,11311052	
P(T<=t) una cola	0,05106586	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184649	

20 minutos

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	85,34	85,06
Varianza	0,043	0,003
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	2,9192018	
P(T<=t) una cola	0,01652218	
Valor crítico de t (una cola)	2,01504918	

El cuadro 11 muestra los resultados de la determinación de cenizas después de los diferentes tiempos de esterilización. Se puede observar que según los promedios, la cantidad de cenizas después del procesamiento se comportó de forma similar, por lo que las pérdidas fueron mínimas.

Cuadro 11: Contenido de cenizas según el tiempo de esterilización

Tiempo	Cenizas inicial (gramos)	Cenizas final (gramos)	Pérdida de ceniza (gramos)
10 minutos	3.1	3.3	-0.2±0.3
15 minutos	3.1	3.3	-0.2±0.4
20 minutos	3.1	3.2	-0.1±0.3

Los resultados estadísticos de la determinación de cenizas (ver cuadro 12) indican que no existe una pérdida significativa de cenizas por el procesamiento ya que no se observó una gran diferencia entre las medias.

Cuadro 12: Resultados estadísticos del cambio de cenizas

10 minutos		
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	3,28	3,08
Varianza	0,002	0,092
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1,45864991	
P(T<=t) una cola	0,10920893	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184649	
15 minutos		
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	3,3	3,08
Varianza	0,02	0,092
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	0,056	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	1,46993683	
P(T<=t) una cola	0,08988895	
Valor crítico de t (una cola)	1,85954832	
20 minutos		
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	3,2	3,08
Varianza	0,005	0,092
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0,86154979	
P(T<=t) una cola	0,21875989	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184649	

En el siguiente cuadro se presentan todos los resultados del análisis proximal completo. Se muestra la cantidad de carbohidratos de las fórmulas por medio de la diferencia del cien por ciento con los resultados de los demás elementos obtenidos por medio de los análisis especificados anteriormente. Se

puede observar que el comportamiento de los nutrientes a los diferentes tiempos de esterilización fue parecida a los resultados antes del procesamiento.

Cuadro 13: Resultados del análisis proximal

Tiempo	Antes del procesamiento				Después del procesamiento				Total
	Proteína (g)	Grasa (g)	Carbohidratos	Cenizas	Proteína (g)	Grasa (g)	Carbohidratos	Cenizas	
10 minutos	12.5	25.4	63.8	3.1	11.8	25.3	64.5	3.3	100
15 minutos	12.5	25.4	63.8	3.1	12.1	25.0	64.3	3.3	100
20 minutos	12.5	25.4	63.8	3.1	12.1	25.3	64.2	3.2	100

El cuadro 14 muestra los resultados obtenidos de la determinación de lisina disponible por el método de enlace de colorante. Por medio de estos resultados y las pruebas estadísticas se infiere que no hay diferencia significativa entre la lisina disponible antes y después del tratamiento térmico en los diferentes tiempos de esterilización. Se observa que los resultados fueron aumentando conforme el tiempo, pero todavía permaneció dentro de la zona de no rechazo por lo que no se le dio mucha importancia.

Cuadro 14: Lisina disponible antes y después de la esterilización a diferentes tiempos

Tiempo	Lisina inicial (gramos)	Lisina Final (gramos)	Pérdida de lisina (gramos)
10 minutos	3.55	2.98	0.09±0.7
15 minutos	3.55	3.26	-0.19±0.6
20 minutos	3.55	3.88	-0.81±1.0

Cuadro 15: Resultados estadísticos del cambio de lisina disponible

10 minutos

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	3,0678	2,9806
Varianza	0,3406052	0,8257103
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	0,18054832	
P(T<=t) una cola	0,43060602	
Valor crítico de t (una cola)	1,85954832	

15 minutos

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	3,0678	3,2608
Varianza	0,3406052	0,1646347
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-0,60714649	
P(T<=t) una cola	0,28029332	
Valor crítico de t (una cola)	1,85954832	

20 minutos

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	3,8782	3,0678
Varianza	1,0996167	0,3406052
Observaciones	5	5

Diferencia hipotética de las medias	0
Grados de libertad	8
Estadístico t	1,5099749
P(T<=t) una cola	0,0847454
Valor crítico de t (una cola)	1,85954832

En el siguiente cuadro se pueden observar los resultados obtenidos de la determinación de vitamina c en las fórmulas para los diferentes tiempos de esterilización antes y después del procesamiento, así como también el promedio de la pérdida de esta vitamina debido a el mismo.

Cuadro 16: Contenido de vitamina C en fórmulas esterilizadas a diferentes tiempos de esterilización

Tiempo	Vitamina C inicial (mg/100g)	Vitamina C final (mg/100g)	Pérdida de Vitamina C (mg/100g)
10 minutos	100.7	73.9	26.8±4.4
15 minutos	100.7	74.9	25.7±2.8
20 minutos	100.7	84.4	16.3±7.0

Según los resultados del cuadro 16 y el cuadro 17 se puede observar que si existe una diferencia significativa entre la vitamina c antes del procesamiento térmico que después de éste. Esto se cumple para todos los tiempos de esterilización ya que el valor de t se encuentra en la zona de rechazo.

Cuadro 17: Resultados estadísticos de la vitamina C

10 minutos		
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	100,7	73,938
Varianza	6,29865	5,15452
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	5,726585	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	17,6823798	
P(T<=t) una cola	5,35E-08	
Valor crítico de t (una cola)	1,85954832	
15 minutos		
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	100,7	74,952
Varianza	6,29865	8,59367
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	7,44616	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	14,9192614	
P(T<=t) una cola	2,009E-07	
Valor crítico de t (una cola)	1,85954832	
20 minutos		
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	100,7	84,438
Varianza	6,29865	26,69542
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	16,497035	
Diferencia hipotética de las medias	0	

Grados de libertad	8
Estadístico t	6,33054373
P(T<=t) una cola	0,00011263
Valor crítico de t (una cola)	1,85954832

En el cuadro 18 se presentan los resultados obtenidos de las pruebas de cambio de color por medio del colorímetro de Hunter. Se presentan los resultados de las tonalidades L: de negro a blanco, las tonalidades “a” de rojo a verde y las tonalidades “b” de azul a amarillo, los resultados de los tonos “a” y “b” no se presentan por no ser de relevancia para el producto utilizado.

Cuadro 18: Resultados de color a diferentes tiempos de esterilización

Tiempo	Color inicial	Color final	Pérdida de color
10 minutos	85.5	85.52	2.59±0.28
15 minutos	85.5	85.58	2.53±0.18
20 minutos	85.5	83.48	4.63±1.42

En el cuadro 19 se pueden observar los resultados de los diferentes tiempos para los tonos L, los cuales determinan la cercanía de la muestra a los colores negro o blanco. Se confirmó que existe diferencia entre el color antes de someter la muestra a autoclave que después de haberlo sometido, demostrándose que se oscurece la fórmula.

Cuadro 19: Resultados estadísticos del cambio de color para los tonos L (negro-blanco)

10 minutos		
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	88,11	85,52
Varianza	0,00185	0,09185
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	18,9197316	
P(T<=t) una cola	2,2983E-05	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184649	
15 minutos		
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	88,11	85,584
Varianza	0,00185	0,02373
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	35,3157211	
P(T<=t) una cola	1,7128E-07	
Valor crítico de t (una cola)	2,01504918	
20 minutos		
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Media	88,11	83,478
Varianza	0,00185	2,12557
Observaciones	5	5
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	7,10112135	
P(T<=t) una cola	0,00103866	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184649	

E. Análisis microbiológico

Al realizar las pruebas microbiológicas por medio de las placas de petrifilm 3M, no se obtuvo resultados numéricos puesto que no se observó ningún crecimiento bacteriano, ni de coliformes totales, ni de E. coli. Esto significa que las fórmulas se encontraron inocuas para todos los tiempos de esterilización determinados.

X. DISCUSIÓN

Al realizar las pruebas antes mencionadas, se obtuvo resultados interesantes, las cuales se explican a fondo a continuación.

Se pudo observar que el volumen de las fórmulas antes y después de someterse al proceso de autoclave sufrió cambios significativos. Esto se explica por la forma en que se usa el autoclave, ya que luego de colocar las pajas para ser autoclaveadas, se permite que el autoclave llegue a la temperatura deseada y se deja 15 minutos a esa temperatura, luego se apaga y se espera 10 minutos para liberar el vapor y se abre el autoclave. Este procedimiento permite que la presión dentro del autoclave cambie bruscamente y se pierda el volumen. Esta pérdida fue significativa en cuanto a cantidad de líquido, pero conforme a los resultados presentados anteriormente, se puede ver que la fórmula tiende a evaporarse y a perder cierta cantidad de nutrientes que no es significativa para comprometer la nutrición del prematuro.

Al determinar la cantidad de proteína, grasa y ceniza de las fórmulas, se pudo observar que no existen cambios significativos antes y después de ser sometidas al proceso de esterilización por autoclave en los diferentes tiempos. Este resultado coincidió con lo que se esperaba, ya que el tratamiento térmico a periodos relativamente cortos de tiempo no debería afectar la cantidad de estos elementos en los alimentos. Sin embargo; según Rudlof (1992:30), mediante su estudio se comprobó que los tratamientos térmicos provocan que las proteínas queden atrapadas en la capa de lípidos de los alimentos. Esta interacción entre proteínas y lípidos causados por el tratamiento térmico puede afectar la digestión de las mismas; en especial, porque estas interacciones se dan más fuertemente al pH que normalmente se encuentra en los estómagos de niños lactantes. Por lo tanto, se demostró que la cantidad de proteína no se pierde significativamente, pero esto no indica que se encuentra totalmente disponible para utilizarse biológicamente.

La cantidad de proteína de las fórmulas no se perdió de manera tal que ponga en riesgo las recomendaciones de proteína diaria para un neonato prematuro según Hay, (1999; 187), ya que aún el valor más bajo encontrado después del tratamiento térmico provee la cantidad necesaria para lograr un balance protéico positivo (más de 2g/kg diario) De la misma manera, la cantidad de lípidos de las fórmulas tampoco presentó pérdidas que comprometieran las recomendaciones para los neonatos prematuros, ya que según Hay (1999; 187), la fórmula debe proveer del 40-50% de las calorías en forma de grasa. En promedio las fórmulas después de ser sometidas a los tratamientos proveen entre un 42-43% de las calorías. Esto también se cumple para los carbohidratos que aportan en promedio un 48% de las calorías totales, después de la esterilización. La recomendación de carbohidratos es de 40% de las calorías.

La determinación de humedad de las muestras es un factor muy importante para la demostración de los resultados, ya que se pudo observar que el porcentaje de la misma fue disminuyendo conforme se aumentó el tiempo de esterilización de las fórmulas. A los 20 minutos, la hipótesis nula fue rechazada, que indica que sí existe una diferencia significativa entre la humedad antes, que después del tratamiento térmico. Se confirma así, que la pérdida de volumen especificada pudo deberse a la disminución de éste dentro del autoclave, sin que hubiera una pérdida significativa de los nutrientes de la fórmula. Esto se puede relacionar con el volumen de las fórmulas ya que al disminuir el volumen y el porcentaje de humedad simultáneamente, se infiere que se concentró la fórmula.

Con respecto al método de enlace de colorante utilizado para determinar la lisina disponible de las fórmulas antes y después de los procesos de autoclave, no se encontró una pérdida significativa en ningún tiempo de esterilización. Según los estudios realizados, se ha encontrado que el tratamiento térmico, produce pérdidas en la disponibilidad de la lisina, sobre todo en los productos enterales. Inclusive durante un tratamiento corto y a bajas temperaturas se observan reacciones de Maillard avanzadas, que comprometen la calidad nutricional de las fórmulas, ya que la lisina se enlaza con los azúcares reductores de la misma, impidiendo la utilización de las proteínas. (Leclère 2001:4682). En el estudio se esperaba encontrar estas reacciones por varias razones: por las características de las fórmulas que contienen alta cantidad de carbohidratos (sobre todo azúcares reductores como lactosa) y aminoácidos disponibles, por la severidad del tratamiento a la que se someten, y el pH de ésta que es alcalino, lo que las hacen más susceptibles a reacciones químicas durante el procesamiento.

También se cuenta con ciertos factores que podrían disminuir el avance de las reacciones de Maillard como el porcentaje de humedad de las fórmulas, las cuales se encontraron en su mayoría a más de 85% y se ha demostrado que la tasa de reacciones de Maillard disminuye cuando los niveles de

humedad aumentan a más de 70%. (Lowry 1989: 1024) Esto indica que la calidad nutricional de las fórmulas con respecto a la lisina, no se ve comprometida en comparación con los resultados encontrados antes del procesamiento.

Por medio de la determinación de color de las muestras y su comparación antes y después de someterlas al proceso de esterilización (ver gráfica 4), se pudo demostrar que se llevó a cabo la reacción de Maillard puesto que los resultados mostraron cierto grado de oscurecimiento. Esto no se pudo observar a simple vista, pero si lo detectó el colorímetro de Hunter. Se esperaría por lo discutido anteriormente, que sólo se llevan a cabo reacciones tempranas de Maillard en las cuales se da la formación de productos de amadori y se incrementa el poder reductor de los productos, sin llegar a la última etapa de la reacción en donde se forman los compuestos coloreados llamados melanoidinas. Sin embargo; teóricamente, la principal forma de bloqueo de la lisina se da con los productos de amadori en los primeros pasos de la reacción de Maillard (Tomarelli 1985;317), pero los resultados obtenidos de la lisina disponible no demostraron este hecho.

Según los resultados obtenidos de la determinación de lisina disponible, se podría decir que no se perdió la cantidad de proteína de las fórmulas y la calidad de sus aminoácidos tampoco se vio afectada. Esto indica que no se alteró la proteína a pesar de los tratamientos térmicos a los que fue sometida.

Para determinar la vitamina C de las fórmulas se utilizó el método del 2,6-diclorofenolindofenol. Por medio del cual se pudo encontrar que sí existe una pérdida significativa de vitamina C durante el procesamiento, inclusive en el menor tiempo de esterilización (10 minutos). Esto se debe a que esta vitamina es una de las más termolábiles de todas y se ve afectada por los tratamientos de esterilización a los que se ven sometidas las fórmulas en el hospital. Ésta se usa como un índice del impacto del tratamiento térmico sobre todas las vitaminas. Su pérdida fue de un máximo de 27% por lo que se puede inferir que las demás (vitaminas) se perdieron en menor grado. Al realizar el método se contempló con anterioridad las fuentes de error que pudieron llevarse a cabo durante la utilización de este método fue la presencia de reductonas en las muestras sometidas al procesamiento térmico, que se forman durante la reacción de Maillard, ya que éstas interfieren con los métodos de oxidación-reducción para la determinación de vitamina C.

Según el comité de Nutrición de la Sociedad Pediátrica Canadiense, una fórmula para prematuro debe contener por lo menos 7mg/100kcal de vitamina C (NCCPS 1995:1766). A pesar de las pérdidas de esta vitamina durante el procesamiento térmico, inclusive el menor valor encontrado de vitamina C por el procedimiento del 2,6-diclorofenolindofenol, cumple con este requerimiento, tomando en cuenta la dilución estándar de la fórmula. Por lo que no se considera necesaria una suplementación adicional de ácido ascórbico aunque se haya perdido cierta cantidad durante el procesamiento.

Microbiológicamente, al utilizar bacterias coliformes y E. coli como referencia, no se pudo encontrar formación de colonias después de ningún tiempo de esterilización a pesar de las condiciones higiénicas con las que se preparan las fórmulas. Lo que indica que la esterilización en autoclave por la temperatura, la presión y la técnica utilizada es adecuada para preparar fórmulas inocuas para los recién nacidos prematuros del Hospital Roosevelt (sin tomar en cuenta las prácticas de manufactura después de que las fórmulas salen del autoclave, son distribuidas, almacenadas en los servicios y administradas a los prematuros).

Según los resultados anteriores, se puede indicar que tanto en cantidad de nutrientes como de microorganismos coliformes, los procedimientos utilizados por el Hospital Roosevelt en la preparación de las fórmulas estándar para prematuros del servicio de mínimo riesgo, es adecuado, para 10, 15 y 20 minutos de esterilización por autoclave. Sin embargo, ya que no se producen pérdidas significativas de nutrientes, se sugiere que se persista con los 15 minutos de esterilización que se utilizan en dicho hospital para proveer de un margen de error por colocación incorrecta de las pajas en el autoclave, prácticas higiénicas inadecuadas en la preparación, errores en el manejo del mismo, etc.; ya que los recién nacidos prematuros son más vulnerables a infecciones nosocomiales, por la inmadurez de su sistema inmune.

XI. CONCLUSIONES

1. La calidad nutricional en cuanto a los nutrientes básicos (proteína, grasa y carbohidratos), disponibilidad de lisina, vitamina C y color de las fórmulas; no se vio afectada por los tratamientos térmicos a los que fueron sometidas en los diferentes tiempos.
2. La calidad microbiológica, utilizando bacterias coliformes y E. coli como referencia, de las fórmulas preparadas y esterilizadas por los métodos y condiciones higiénicas con las que se preparan las fórmulas en el Hospital Roosevelt es muy buena, ya que no se encontró formación de colonias.
3. Según los resultados obtenidos, se puede concluir que la esterilización en autoclave bajo la temperatura, la presión y la técnica utilizada es adecuada a 15 minutos para preparar fórmulas inocuas y nutritivas para los recién nacidos prematuros del servicio de Mínimo Riesgo del Hospital Roosevelt.

IX. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la utilización de otros métodos para la determinación de calidad proteínica de alimentos que sean sometidos a procesos de esterilización a temperaturas y presiones altas que no tomen en cuenta la cantidad de lisina disponible para demostrar la veracidad de los resultados de esta investigación.
2. Se recomienda ampliar este estudio, monitoreando las probabilidades de pérdidas de nutrientes y contaminación de las fórmulas enterales durante el transporte, manejo, almacenamiento y distribución de las fórmulas en los servicios.
3. Se recomienda que se realicen capacitaciones frecuentes para las personas que trabajan en el lactario acerca de buenas prácticas de manufactura y verificar que se cumplan las normas higiénicas necesarias.

X. BIBLIOGRAFÍA

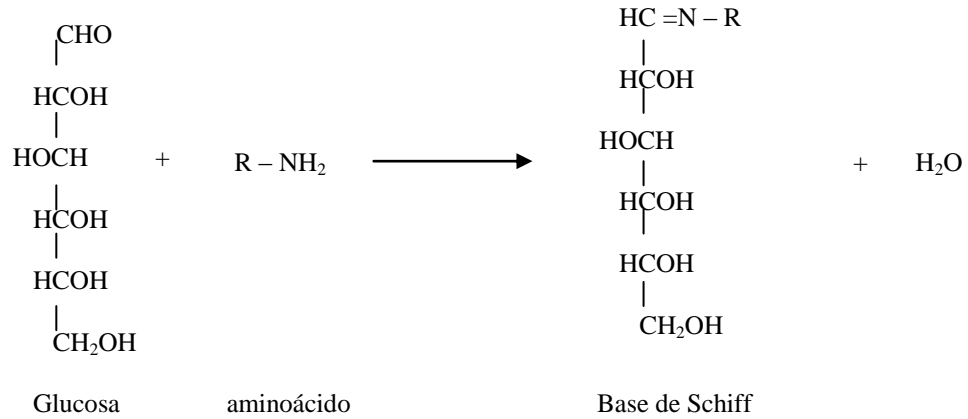
1. Atherton, Henry y J. Newlander. 1977. *Chemistry and testing of dairy products*. 4a ed. Estados Unidos, AVI publishing company, Inc. 396 págs.
2. Battaglia, Frank y L. Lubchenco. 1967. "A practical classification of newborn infants by weight and gestational age" *Journal of Pediatrics*. 71: 159-163.
3. Behrman, Richard; R. Kliegman y H. Jenson. 2000. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 16a ed. Estados Unidos, W.B. Saunders Company. 2414 págs.
4. Berseth, Carol Lynn. 2002. *Clínicas de Perinatología, Recientes adelantos en la alimentación del recién nacido*. España, McGraw-Hill Interamericana. 330 págs.
5. Burton, H.; J. Pien y G. Thieulin. 1965. *La esterilización de la leche*. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 287 págs.
6. Castillo, G, *et al.* 2002. "Influence of protein source, type, and concentration, and product form on the protein quality of commercial enteral formulas" *Journal of Food Science*. 67 (1): 328-334
7. Cooke, Richard, *et al.* 1998. "Feeding preterm infants after hospital discharge: effect of dietary manipulation on nutrient intake and growth" *Pediatr Res*. 43: 355-360.
8. Cowett, Richard. 2000. *Clínicas de Perinatología, Nutrición y metabolismo del prematuro extremo*. México, McGraw-Hill Interamericana. 267 págs.
9. Delange, Frank y K. West. 2003. *Nutrient deficiencies in the first months of life*. Estados Unidos, Nestlé Nutrition Workshop Series Paediatric Programme volume 52, 302 págs.
10. *Manual de bacteriología*. 1978. DIFCO Laboratorios. Madrid. 395 págs.
11. Evangelisti, Filippo; C. Calcagno y P. Zunin. 1994. "Relationship between blocked lysine and carbohydrate composition of infant formula". *Journal of Food Science*. 59 (2): 335-337.
12. Feng, Peter; S. Weagant y M. Grant. 1998. *Bacteriological Analytical Manual*. 8a edición, Capítulo 4. Estados Unidos, FDA.
13. Ferrer, Emilia; *et al.* 2000. "Effects of thermal processing and storage on available lysine and furfural compounds contents of infant formulas". *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48 (5): 1817-1822.
14. Grün, Ingolf; *et al.* 1991. "Determination of vitamin B6, available lysine, and E-pyridoxyllysine in a new instant baby food product" *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 39 (1): 102-108.
15. Harris, Karmas. 1977. *Nutritional evaluation of food processing*. 2a ed. Estados Unidos, The AVI Publishing Company, Inc. 670 págs.
16. Harris, Robert y H. Von Loesecke. 1960. *Nutritional evaluation of food processing*. Estados Unidos, John Wiley & sons, Inc. 612 págs.
17. Hay, William, *et al.* 1999. "Workshop summary: Nutrition of the extremely low birth weight infant- Statistical data included" *Pediatrics*.
18. Hendricks, Kristy; C. Duggan y W. Walker. 2000. *Manual de Nutrición Pediátrica, Tomo 2*. 3ª ed. México, Intersistemas. 598 págs.
19. Hoyem, Tore y O. Kvale. 1977. *Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing*. Londres, Applied science publishers limited. 398 págs.
20. Hurrell, R.; P. Lerman y J. Carpenter. 1979. "Reactive lysine in foodstuffs as measured by a rapid dye-binding procedure". *Journal of Food Science*. 44. 1221-1225.
21. King, R.D. 1978. *Developments in food analysis techniques-1*. Londres, Applied Science Publishers Ltd. 323 págs.
22. Leclere, Juliette y I. Birlouez-Aragon. 2001. "The fluorescence of advanced maillard products is a good indicator of lysine damage during the maillard reaction" *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 49 (10): 4682-4687.
23. Lingle, Rick. 1990. "What's cooking in sterilizers?" *Prepared Foods*.
24. Lowry, Karen y D. Baker. 1989. "Effect of storage, carbohydrate composition, and heat processing on protein quality and amino acid bioavailability of a commercial enteral product" *Journal of food science*. 54 (4): 1024-1029.

25. Melendez, A.J.; *et al.* 2004. "Vitamin C in orange juices determined by HPLC: influence of the wavelength of detection". *Italian Journal of Food Science*. 16 (1):80-85.
26. Nollet, L. 1996. *Handbook of Food Analysis volume I y II*. Estados Unidos, Marcel Dekker, Inc. 2041 págs.
27. Nutrition Committee, Canadian Paediatric Society. 1995. "Nutrient needs and feeding of premature infants" *Canadian Medical Association Journal*. 152 (11): 1765-1785.
28. Pellet, Peter y V. Young. 1980. *Evaluación nutricional de alimentos proteínicos*. España, Universidad de las Naciones Unidas. 175 págs.
29. Pomeranz, Yeshajahu y C. Melona. 2000. *Food Analysis, theory and practice*. 3a ed. Estados Unidos, Aspen publication. 778 págs.
30. Robinson, Corinne. 1967. *Proudfit-Robinson's normal and therapeutic nutrition*. 13a ed. Londres, The Macmillan Company. 891 págs.
31. Rombeau, John y R. Rolandelli. 1998. *Nutrición Clínica, alimentación enteral*. 3ª ed. México, McGraw-Hill Interamericana. 745 págs.
32. Rudlof, Silvia y B. Lönnerdal. 1992. "Solubility and digestibility of milk proteins in infant formulas exposed to different heat treatments" *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 15 (1): 25-33.
33. Strohecker, Rolf y H. Henning. 1967. *Análisis de vitaminas, métodos comprobados*. Madrid, Editorial Paz Montalvo. 428 págs.
34. Tomarelli, Rudolph; *et al.* 1985. "An HPLC method for the determination of reactive (available) lysin in milk and infant formulas". *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 33 (2): 316-318
35. Wolf, JC; R. Thomson y G. Reineccius. 1977. "Initial losses of available lysin in model systems" *Journal of Food Science*. 42 (6) 1540-1544.
36. Ziegler, Ekhard; A. Lucas y G. Moro. 1999. *Nutrition of the very low birthweight infant*. Estados Unidos, Nestlé Nutrition Workshop Series Paediatric Programme volume 43. 270 págs.

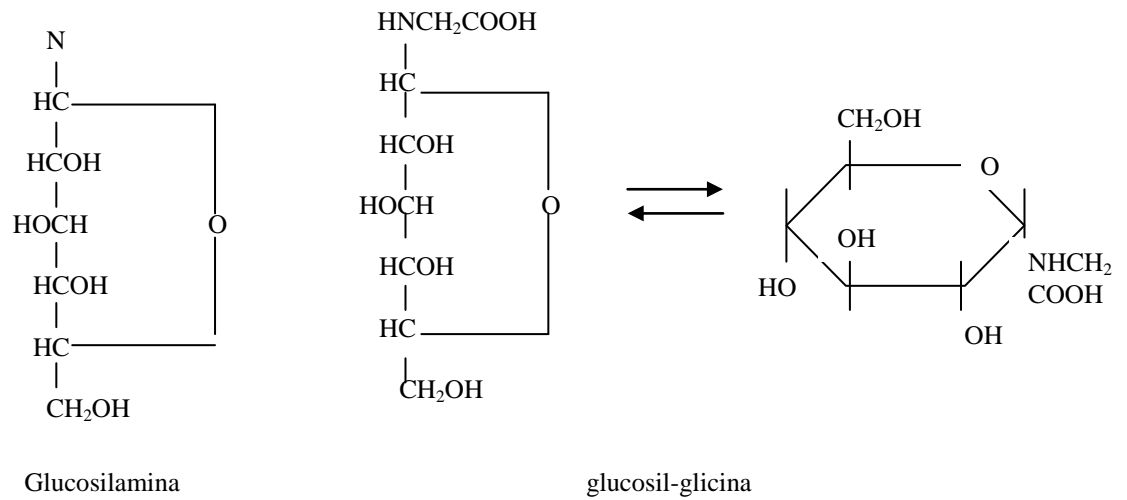
XIV. ANEXOS

D. Anexo 1

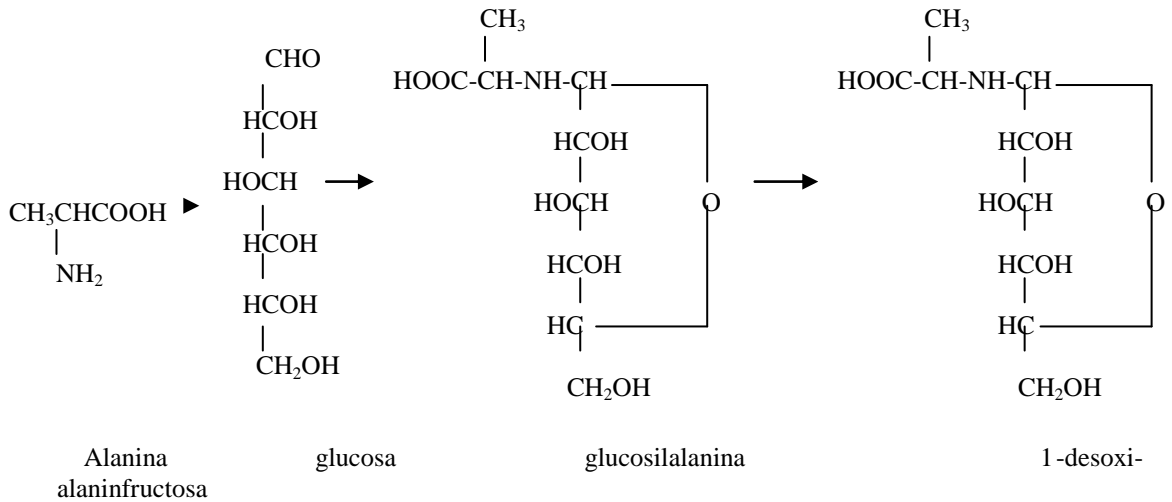
Parte 1:



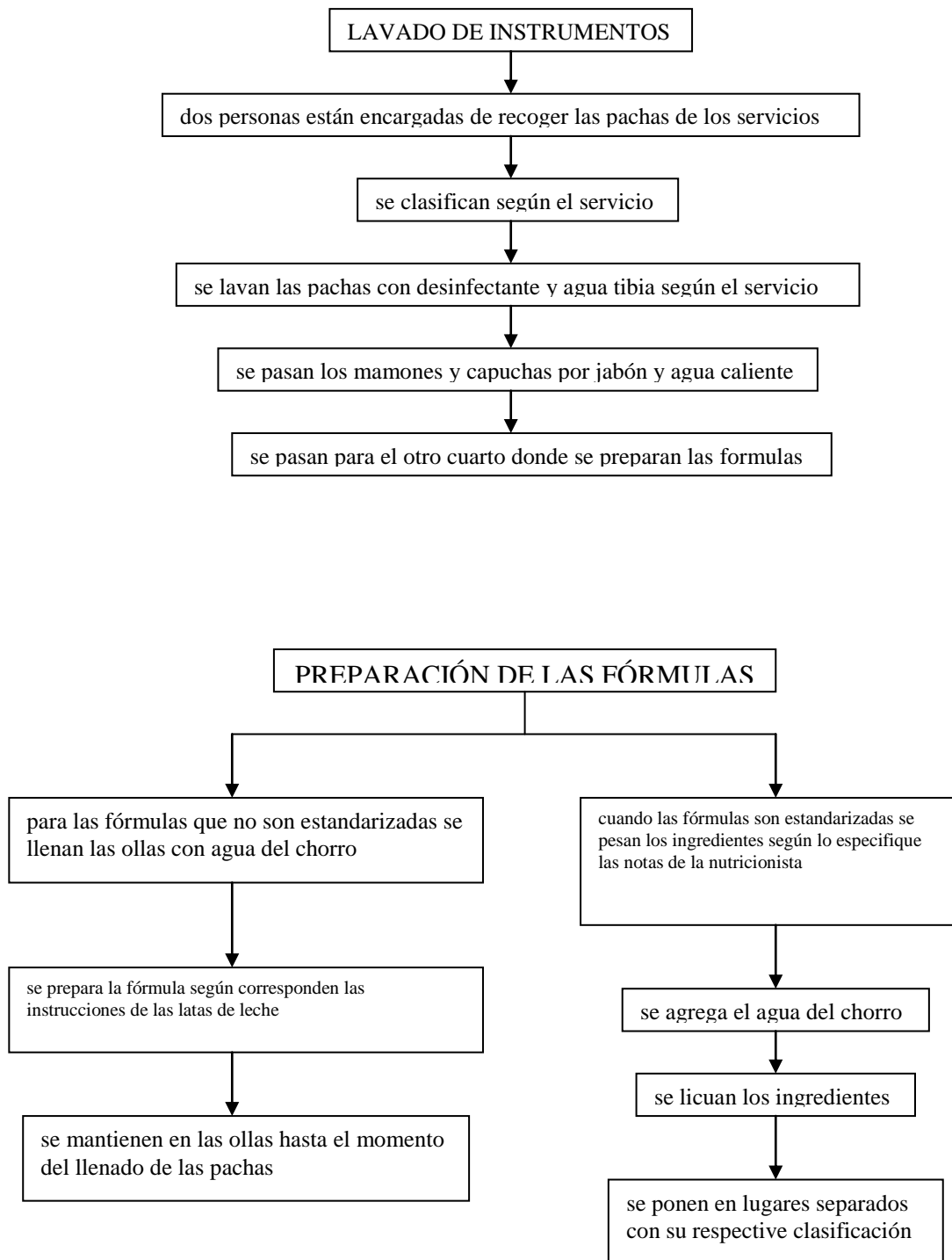
Parte 2:



Parte 3:



B. Anexo 2: “Procedimiento de preparación de fórmulas en el Hospital Roosevelt”



LLENADO DE LAS PACHAS

después de lavadas las pachas se rotulan y se clasifican según el servicio

se llenan

se tapan

se ponen en canastas

se meten en el autoclave

se llevan a los servicios donde se refrigeran y se calientan cuando se van a utilizar

C. Anexo 3: “Métodos utilizados”

1. Método de enlace de colorante

- a. Se preparó una solución de colorante con 1.76g de ácido naranja 12, 20g de ácido oxálico di-hidratado, 3.4g de fosfato de potasio di-hidrogenado, 60mL de ácido acético glacial y agua hasta llegar a un litro. También se preparó una solución de acetato de sodio.
- b. Se realizaron dos mediciones: para la medición A, se empezó por pesar 0.5g de muestra y se puso en un erlenmeyer de 150mL, el cual se rotuló con una “A”
- c. Se agregó 40mL de la solución de colorante y 2mL de la solución de acetato de sodio previamente preparadas.
- d. Se preparó la medición B: pesando la misma cantidad de muestra y colocándola también en un erlenmeyer de 150mL, el cual se rotuló con una “B”
- e. Se agregó 0.2mL de anhídrido propiónico y 2mL de la solución de acetato de sodio.
- f. Se agitó por 15 minutos para que se llevara a cabo la protonación en un agitador de laboratorio.
- g. Se agregaron 40mL de la solución de colorante.
- h. Después se pusieron las dos mediciones a agitar vigorosamente por 5 horas.
- i. Se tomaron 25mL de cada medición A y B a centrifugar por 10 minutos a 5000 rpm, y del sobrenadante se tomaron 10mL y se diluyó 1mL a 100mL con una solución buffer.
- j. Se midió la absorbancia en una celda de 1cm a 475nm
- k. Se realizó una curva de calibración para determinar la cantidad de colorante por diferencia. Se hizo una dilución de 5mL a 50mL, de 1mL a 100mL, 2mL a 100mL, 3mL a 100mL y 2mL a 50mL. Se midió la absorbancia a 475nm.

2. Método del 2,6-diclorofenolindofenol

- j. Se preparó una solución de extracción disolviendo con agitación 3g de ácido metafosfórico en 8mL de ácido acético y 40mL de agua. Se diluyó a 100mL de agua y se filtró en un frasco oscuro.
- k. Se preparó una solución estándar de ácido ascórbico 1mg/ml, pesando 0.025g de ácido ascórbico. Se transfirió a un balón de 25mL y se diluyó con la solución de extracción.
- l. Se preparó una solución de diclorofenolindofenol, disolviendo 0.0625g de 2,6-diclorofenolindofenol Na en 50mL de agua. Se adicionó 5.2mg de NaHCO₃. Se agitó vigorosamente y se diluyó en 250mL de agua. Se filtró en un frasco oscuro.
- m. Luego se preparó una curva de titulación con 50mL de la solución de ácido ascórbico midiendo alícuotas de 0.5, 1, 2 y 3mL a erlenmeyers de 50mL que contenían 5mL de la solución de extracción. Se titularon las alícuotas con la solución de diclorofenolindofenol hasta un color rosado pálido que permaneciera 5 segundos. Se anotaron los resultados.
- n. Luego se pesaron 5g de la muestra y se les agregó 25mL de la solución de extracción y se tituló. Se anotaron los resultados.

3. Método de Kjeldahl

- a. Se pesó 0.25g de la muestra y se puso en un balón de kjeldahl.
- b. Se agregó 1.5g de sulfato de sodio, 0.1g de óxido de mercurio y 3mL de ácido sulfúrico.
- c. Se encendió el aparato en LO y cada cierto tiempo se le dio vuelta a los balones. Se sacaron del horno cuando la muestra se tornó transparente.
- d. Se colocaron los 10mL de ácido bórico en beakers de 100mL y se le agregaron 3 gotas del indicador rojo de metilo poniendo los beakers al final del destilador para que reciba la muestra.
- e. Al balón con la muestra se le agregó agua desmineralizada, los 13mL de NaOH y los 5mL de tiosulfato de sodio. Se esperó a que el beaker llegue a 100mL
- f. Se tituló la muestra con una solución de HCL 0.1N, se anotó la cantidad de solución HCL utilizada para la titulación.
- g. Se realizó el cálculo:

$$\frac{\text{Gasto de HCL(mL)} \times \text{Normalidad (0.1)} \times \text{factor de nitrógeno (0.014)} \times 638}{\text{Peso inicial de muestra}}$$

4. Método de Babcock

- a. Se preparó la solución Babcock, disolviendo 7g de hexametáfosfato de sodio en 60mL de agua, agregar 3mL de trítón x 100 y 0.5mL de metanol. Se aforó a 100mL con agua.
- b. Se agregaron 17.6mL de leche en un balón de babcock.
- c. Se adicionó 17.6mL de la solución babcock.
- d. Se colocó la mezcla en un baño de maría hirviendo hasta que la grasa se separó.
- e. Se puso a centrifugar durante 5 minutos.
- f. Después, se agregó una solución de metanol:agua (1:1) hasta la parte superior del balón y se centrifugó por 3 minutos.
- g. Se midió la columna de grasa formada.

5. Método de Humedad

- a. Primero se lavaron bien las cajas de metal y se pusieron a secar durante aproximadamente una hora. Se colocaron en la disecadora por 30 minutos y se pesaron sin su tapadera para tararlas.
- b. Se pesaron 5 gramos de muestra líquida y se anotó.
- c. Se pusieron en el horno a 80°C con la tapadera media puesta durante 6 horas.
- d. Después de este tiempo se taparon bien y se colocaron en la disecadora por 30 minutos.
- e. Se tomó el peso final sin la tapadera.
- f. Se calculó el porcentaje:

$$\frac{\text{Peso muestra húmeda} - \text{peso seco} \times 10}{\text{Peso muestra húmeda}}$$

6. Método de Cenizas

- a. Primero se lavaron los crisoles y se pusieron al horno a 80°C aproximadamente una hora.
- b. Se dejaron enfriar en la disecadora por 30 minutos.
- c. Se pesaron para obtener la tara y se apuntaron los resultados.
- d. Se pesaron de 1-2 gramos de muestra.
- e. Se puso en el crisol y se puso en la estufa a que se queme bien y que no saque humo.
- f. Luego se puso en la mufla por 8 horas.
- g. Se calcula el porcentaje:

$$\frac{\text{Peso de ceniza} \times 100}{\text{Peso inicial}}$$

7. Obtención de carbohidratos. Se toman todos los resultados del análisis proximal y se restan a la cantidad original para obtener los carbohidratos.

8. Volumen inicial, volumen final

- a. Se tomó el volumen antes de ser sometido al autoclave
- b. Se tomó el volumen del líquido después de ser sometido al autoclave
- c. Se reportaron los resultados en mL.

9. Determinación de color

- a. Se prendió el Color Quest Sphere II y se configuró el software para leer las muestras utilizando la escala de color deseado.
- b. Se colocó el instrumento en el modo de reflectancia.
- c. Se estandarizó el instrumento, utilizando la trampa de luz y los estándares grises y blancos
- d. Se instaló la repisa para colocar la celda que contiene la muestra.
- e. Se llenó la celda de vidrio de 55mm con el producto a analizar.
- f. Se colocó la celda que se llenó contra el puerto de reflectancia para que la fórmula se lea a través de la clara ventana de vidrio de la celda.
- g. Se cubrió la celda de muestra con la cobertura opaca.

10. Determinación de coliformes

- a. Se preparó una solución de KH₂PO₄ pesando 34 gramos de reactivo y llevándolo a 1000mL con agua destilada. Se llevó a pH de 7.2
- b. Se esterilizó por 15 minutos a 121°C
- c. Se tomó una alícuota de 1.25mL y se llevó a 1000mL con agua destilada.

- d. Se esterilizó por 15 minutos a 121°C
- e. Se hizo una dilución de leche:solución a 50mL en 450mL de solución.
- f. Se tomó una alícuota de 1mL de muestra y se agregó en el centro de las plaquitas petrifilm 3M a temperatura ambiente.
- g. Se rotuló y se puso a incubar a 35°C por 48 horas
- h. Se contó el número de bacterias presentes bajo luz ultra violeta. Los coliformes se presentan como puntos rosados y los E. coli, se presentan como puntos azules.

C. Anexo 4: Cuadros de resultados

Cuadro 20: Resultados del cambio de volumen después del procesamiento térmico

Tiempo	Volumen inicial (mL)	Volumen final (mL)
10 minutos	50	48
	50	48
	74	73
	62	61
	64	63
15 minutos	67	65
	68	65
	70	69
	64	64
	65	64
20 minutos	70	69
	65	64
	68	66
	70	69
	66	65

Cuadro 21: Resultados de la proteína después del procesamiento térmico

Tiempo	Proteína inicial (gramos)			Proteína final (gramos)		
10 minutos	11.6	12.9	12.3	13.4	13.3	13.3
	13.1	12.6	12.9	10.1	12.5	11.3
	12.4	12.9	12.7	9.4	11.6	10.5
	13.9	10.8	12.4	9.8	12.6	11.2
	10.7	13.5	12.4	13.0	12.1	12.5
15 minutos	11.6	12.9	12.3	11.2	12.0	11.6
	13.1	12.6	12.9	12.5	10.8	11.6
	12.4	12.9	12.7	11.6	12.0	11.8
	13.9	10.8	12.4	12.6	12.8	12.7
	10.7	13.5	12.4	12.9	12.8	12.8
20 minutos	11.6	12.9	12.3	13.2	11.7	12.5
	13.1	12.6	12.9	11.9	13.1	12.5
	12.4	12.9	12.7	13.1	9.3	11.2
	13.9	10.8	12.4	12.3	13.4	12.9
	10.7	13.5	12.4	12.0	11.2	11.6

Cuadro 22: Resultados de la grasa después del procesamiento térmico

Tiempo	Antes (gramos)			Gramos en 100g	Después (gramos)			Gramos en 100g
10 minutos	3.7	3.7	3.7	20.6	3.6	3.6	3.6	20.1
	3.6	3.7	3.7	20.6	3.7	3.7	3.7	20.6
	3.6	3.7	3.7	20.6	3.7	3.6	3.7	20.6
	3.7	3.7	3.7	20.6	3.7	3.7	3.7	20.6
	3.7	3.7	3.7	20.6	3.6	3.7	3.7	20.6
15 minutos	3.7	3.7	3.7	20.6	3.7	3.7	3.7	20.6
	3.6	3.7	3.7	20.6	3.6	3.6	3.6	20.1
	3.6	3.7	3.7	20.6	3.6	3.6	3.6	20.1
	3.7	3.7	3.7	20.6	3.6	3.6	3.6	20.1
	3.7	3.7	3.7	20.6	3.6	3.7	3.7	20.6
20 minutos	3.7	3.7	3.7	20.6	3.6	3.6	3.6	20.1
	3.6	3.7	3.7	20.6	3.6	3.7	3.7	20.6
	3.6	3.7	3.7	20.6	3.7	3.7	3.7	20.6
	3.7	3.7	3.7	20.6	3.6	3.7	3.7	20.6
	3.7	3.7	3.7	20.6	3.7	3.7	3.7	20.6

Cuadro 23: Resultados de ceniza después del procesamiento térmico

Tiempo	Ceniza inicial (gramos)			Ceniza final (gramos)		
10 minutos	3.2	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3

	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3
	2.7	2.7	2.7	3.3	3.3	3.3
	2.9	2.7	2.8	3.3	3.2	3.3
	3.3	3.3	3.3	3.2	3.2	3.2
15 minutos	3.2	3.3	3.3	3.4	3.4	3.4
	3.3	3.3	3.3	3.3	2.8	3.1
	2.7	2.7	2.7	3.4	3.4	3.4
	2.9	2.7	2.8	3.3	3.4	3.4
	3.3	3.3	3.3	3.2	3.2	3.2
20 minutos	3.2	3.3	3.3	3.1	3.2	3.2
	3.3	3.3	3.3	3.2	3.2	3.2
	2.7	2.7	2.7	3.3	3.2	3.3
	2.9	2.7	2.8	3.1	3.0	3.1
	3.3	3.3	3.3	3.1	3.2	3.2

Cuadro 24: Resultados de Humedad después del tratamiento térmico

Tiempo	Humedad inicial (%)			Humedad final (%)		
10 minutos	85.1	85.1	85.1	83.8	85.4	84.6
	85.1	85.1	85.1	85.1	84.9	85.0
	85.0	85.1	85.0	85.0	84.9	85.0
	85.0	85.1	85.0	84.5	85.3	84.9
	85.1	85.1	85.1	83.8	84.1	84.0
15 minutos	85.1	85.1	85.1	86.9	86.9	86.9
	85.1	85.1	85.1	86.9	86.8	86.9
	85.0	85.1	85.0	86.8	86.8	86.8
	85.0	85.1	85.0	84.9	84.8	84.9
	85.1	85.1	85.1	84.9	84.8	84.9
20 minutos	85.1	85.1	85.1	85.2	85.3	85.3
	85.1	85.1	85.1	85.2	85.2	85.2
	85.0	85.1	85.0	85.4	85.2	85.3
	85.0	85.1	85.0	85.2	85.2	85.2
	85.1	85.1	85.1	85.6	85.8	85.7

Cuadro 25: Resultados de Lisina después del procesamiento térmico:

	Antes					Después				
	Lectura		Resultado		Lisina	Lectura		Resultado		Lisina
	A	B	A	B		A	B	A	B	
10 minutos	0.18	0.18	0.30	0.13	2.4357	0.158	0.185	0.2549	0.1383	1.7132
	0.24	0.22	0.41	0.17	3.4891	0.242	0.164	0.4116	0.1205	4.2764
	0.25	0.22	0.43	0.17	3.8533	0.203	0.175	0.3388	0.1298	3.0708
	0.19	0.17	0.31	0.13	2.7389	0.198	0.173	0.3295	0.1281	2.9585
	0.21	0.21	0.35	0.15	2.8233	0.198	0.179	0.3295	0.1332	2.8841
15 minutos	0.18	0.18	0.30	0.13	2.4357	0.193	0.186	0.3202	0.1391	2.6601
	0.24	0.22	0.41	0.17	3.4891	0.212	0.157	0.3556	0.1146	3.5409
	0.25	0.22	0.43	0.17	3.8533	0.209	0.188	0.3500	0.1408	3.0739
	0.19	0.17	0.31	0.13	2.7389	0.247	0.223	0.4209	0.1704	3.6810
	0.21	0.21	0.35	0.17	2.8233	0.219	0.188	0.3987	0.1408	3.3480
20 minutos	0.18	0.18	0.30	0.13	2.4357	0.252	0.217	0.4302	0.1652	3.8926
	0.24	0.22	0.41	0.17	3.4891	0.248	0.198	0.4228	0.0372	5.6698
	0.25	0.22	0.43	0.17	3.8533	0.250	0.246	0.4265	0.1898	3.4722
	0.19	0.17	0.31	0.13	2.7389	0.209	0.167	0.4023	0.0381	3.3324
	0.21	0.21	0.35	0.16	2.8233	0.237	0.202	0.4265	0.1898	3.0254

Cuadro 26: Resultados de la vitamina C después del procesamiento térmico

Tiempo de procesamiento	Antes				Después			
	Muestra A	Muestra B	mL de diclorofenol indofenol	Vitamina C	Muestra A	Muestra B	mL de diclorofenol indofenol	Vitamina C
10 minutos	6.2	6.1	6.2	100,36	4.7	4.6	4.7	74,95

	6.1	5.9	6.0	96,98	4.7	4.6	4.7	74,95
	6.4	6.2	6.3	102,05	4.7	4.4	4.5	71,57
	6.3	6.5	6.4	103,75	4.4	4.5	4.5	71,57
	6.3	6.0	6.2	100,36	4.8	4.7	4.8	76,65
15 minutos	6.2	6.1	6.2	100,36	4.6	4.6	4.6	73,26
	6.1	5.9	6.0	96,98	4.6	4.5	4.6	73,26
	6.4	6.2	6.3	102,05	4.8	5.1	5.0	80,03
	6.3	6.5	6.4	103,75	4.8	4.5	4.7	74,95
	6.3	6.0	6.2	100,36	4.7	4.4	4.6	73,26
20 minutos	6.2	6.1	6.2	100,36	5.5	5.0	5.3	85,12
	6.1	5.9	6.0	96,98	5.1	6.0	5.6	90,2
	6.4	6.2	6.3	102,05	5.4	5.6	5.5	88,5
	6.3	6.5	6.4	103,75	4.8	5.0	4.9	78,34
	6.3	6.0	6.2	100,36	5.0	5.0	5.0	80,03