

DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA I SALUT
PÚBLICA

ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA
DE PRODUCTOS DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN
INFANTIL DURANTE EL ALMACENAMIENTO

GUADALUPE GARCÍA LLATAS

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 10 d'abril de 2008 davant un tribunal format per:

- D^a. Iciar Astiasaran Anchía
- D^a. M^a Teresa Rodríguez Estrada
- D. Francesc Guardiola Ibarz
- D^a. Monica Flores Llovera
- D^a. Amparo Alegría Toran

Va ser dirigida per:

D^a. M^a Jesús Lagarda Blanch

D^a. Rosaura Farré Rovira

©Copyright: Servei de Publicacions
Guadalupe García Llatas

Depòsit legal:

I.S.B.N.: 978-84-370-7224-1

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia



**ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA
DE PRODUCTOS DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN
INFANTIL DURANTE EL ALMACENAMIENTO**

*STUDY ON THE EVOLUTION OF THE LIPID FRACTION OF
PRODUCTS FOR INFANT FEEDING DURING STORAGE*

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Guadalupe García Llatas

Dirigida por:

Dra. M^a Jesús Lagarda Blanch

Dra. Rosaura Farré Rovira

Dr. Pedro Abellán Ballesta

Valencia, Septiembre de 2007



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,
Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal
Àrea de Nutrició i Bromatologia

M^a JESÚS LAGARDA BLANCH y ROSAURA FARRÉ ROVIRA, profesora titular y catedrática, respectivamente, del área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, de la Universitat de València y PEDRO ABELLÁN BALLESTA, director de Investigación y Desarrollo de Hero España S.A.,

INFORMAN QUE: la licenciada en Farmacia GUADALUPE GARCÍA LLATAS ha realizado, bajo su dirección y en los laboratorios del área de Nutrición y Bromatología, un trabajo que lleva por título: **“ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA DE PRODUCTOS DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN INFANTIL DURANTE EL ALMACENAMIENTO”** y autorizan su presentación para optar al Grado de Doctor en Farmacia.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe, en Valencia, Septiembre de 2007.

Fdo: M^a Jesús Lagarda Blanch

Fdo: Rosaura Farré Rovira

Fdo: Pedro Abellán Ballesta

Este trabajo forma parte del Contrato de Investigación BI02-26 entre la Universitat de València y Hero España S.A., para el estudio "Estabilidad de las papillas listas para el consumo/leches de crecimiento. Búsqueda de indicadores de rutina para su evaluación y estudio durante el período de vida útil".

La doctoranda Guadalupe García Llatas ha disfrutado de una Beca de Investigación de la Universitat de València adscrita al mencionado contrato.

Grupo de investigación *Bionutest* (03/003).

Me lo contaron y lo olvidé,
lo ví y lo entendí, lo hice y lo aprendí.

Confucio

A mis abuelos,
a mis padres,
a mis tíos,
porque me enseñaron que tan importante es conocer de dónde
viene uno, como adónde quiere llegar.

ÍNDICE - CONTENTS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO – INTRODUCTION AND OBJECTIVE	3
PLAN DE TRABAJO - WORK PLAN	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA - LITERATURE REVIEW	10
A. Necesidades nutricionales en la infancia	11
B. Etapas de la alimentación en la primera infancia	13
C. Productos dietéticos utilizados en la alimentación del lactante	15
C.1. Leche humana y leche de vaca	15
C.2. Fórmulas para lactantes	17
C.3. Papillas de cereales	18
D. Los lípidos en la alimentación durante la infancia	21
D.1. Triglicéridos	22
D.2. Fosfolípidos y glicolípidos	22
D.3. Ácidos grasos	22
D.4. Esteroles	30
D.5. Recomendaciones relativas a la composición de la fracción grasa en los preparados para lactantes	33
E. Oxidación lipídica	35
E.1. Ácidos grasos	35
E.2. Esteroles	55
E.3. Indicadores de la oxidación lipídica	74
F. Evaluación de la oxidación lipídica en alimentos infantiles	105
PARTE EXPERIMENTAL - EXPERIMENTAL SECTION	111
A. Muestras	112
A.1. Relación de muestras	112
A.2. Descripción de las papillas de cereales con leche	112
A.3. Descripción de las fórmulas para lactantes	117

B. Métodos de análisis seleccionados	121
B.1. Extracción y determinación de la fracción lipídica	121
B.2. Determinación del perfil lipídico	123
B.3. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	126
B.4. Determinación de compuestos volátiles	142
B.5. Determinación de esteroides y óxidos de esteroides	158
B.6. Análisis estadístico	164
RESULTADOS, EVALUACIÓN ESTADÍSTICA Y DISCUSIÓN -	
<i>RESULTS, STATISTICAL EVALUATION AND DISCUSSION</i>	166
A. <i>Fat content</i>	167
B. <i>Fatty acid profile</i>	168
B.1. <i>Milk and cereal-based infant foods</i>	168
B.2. <i>Infant formulas</i>	172
C. <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>	176
D. <i>Volatile compounds</i>	180
D.1. <i>Milk and cereal-based liquid infant foods</i>	180
D.2. <i>Infant formulas</i>	192
E. <i>Sterol and sterol oxidation products</i>	197
E.1. <i>Synthesis of phytosterol oxidation products</i>	197
E.2. <i>Contents of sterols and sterol oxidation products</i>	201
CONCLUSIONES - CONCLUSIONS	215
BIBLIOGRAFÍA – LITERATURE CITED	222
ANEXOS - ANNEXES	267
Anexo I.- Abreviaturas - <i>Abbreviations</i>	268
Anexo II. Instrumentación - <i>Apparatus</i>	273
Anexo III. Material - <i>Materials</i>	274
Anexo IV. Reactivos – <i>Reagents</i>	276
Anexo V. Difusión de resultados – <i>Results dissemination</i>	280

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

INTRODUCTION AND OBJECTIVE

La alimentación durante las primeras etapas de la vida es fundamental para asegurar un buen desarrollo y crecimiento del lactante y por influir en su futuro estado de salud. Los alimentos para lactantes constituyen el primer alimento para el recién nacido, cuando la lactancia materna no es posible, o como alimentación complementaria cuando aumentan sus necesidades nutritivas. La fracción lipídica de estos alimentos tiene importancia no sólo por la contribución al valor energético, sino también por sus efectos sobre el desarrollo, estructura y función de órganos, en especial de los tejidos cerebrales y de la retina.

En la actualidad, se comercializa una amplia variedad de productos para la alimentación infantil. La calidad de las materias primas, los tratamientos tecnológicos y las condiciones de almacenamiento de los mismos pueden modificar el valor nutritivo de la fracción lipídica e influir en su seguridad por la formación de compuestos tóxicos. Este hecho tiene mayor importancia en este tipo de alimentos por el grupo de población a quien va dirigidos (más sensibles) y a que su consumo es cada vez mayor.

El conocimiento de la estabilidad de la fracción lipídica en alimentos infantiles permite evaluar los efectos que el procesado y/o almacenamiento ejercen sobre ella y optimizar los procesos tecnológicos empleados en su elaboración.

Por todo ello, el objeto del presente trabajo es:

- **Conocer la evolución de la fracción lipídica en papillas listas para el consumo destinadas a la alimentación infantil a lo largo de su vida útil.**

En concreto se estudiará la influencia del tiempo y temperatura de conservación sobre dicha fracción lipídica.

Este trabajo se encuadra dentro de un proyecto más amplio cuyo objeto es la búsqueda de indicadores de rutina que permitan evaluar y estudiar la estabilidad durante el período de vida útil de las fracciones proteica y lipídica de alimentos para lactantes (fórmulas para lactantes y papillas de cereales con leche).

In first stages of life feeding is fundamental in order to ensure a good development and growth of babies and because it has influence on their future health state. Infant foods are the first foodstuffs for newborns when mother's lactation is not possible, or as a complementary feeding when their nutritional necessities increase. Lipid fraction of these products has significance not only because of its contribution to energetic value, but also due to its effects on development, structure and function of organs, especially brain and retina tissues.

Nowadays, a wide range of products for infant feeding is available. The quality of raw materials, technological treatments and storage conditions can modify the nutritional value of the lipid fraction and have influence on their safety due to formation of toxic compounds. This aspect is of great importance in this kind of foodstuffs because of the population group to which is intended for (more sensitive) and because its consumption increases.

To know the stability of the lipid fraction in infant foods allows to evaluate the effects exerted on it by the processing and/or storage and optimize the technological processes used in their manufacture.

For which reason, the objective of the present work is:

- ***To know the evolution of the lipid fraction in ready-to-eat foodstuffs for infant feeding throughout their shelf-life.***

Specifically, the influence of time and temperature of storage on the mentioned lipid fraction will be studied.

This work is framed in a wider project whose objective is to search routine indicators to evaluate and study the stability during shelf-life of the protein and lipid fractions of infant foods (infant formulas and milk and cereal-based infant foods).

PLAN DE TRABAJO

WORK PLAN

Para alcanzar el objetivo mencionado se propone un plan de trabajo que consta de los siguientes puntos:

- Actualización bibliográfica de todos los aspectos relativos a la fracción lipídica de los alimentos destinados a la alimentación infantil.
- Adaptación a las muestras problema de métodos de determinación del perfil lipídico de ácidos grasos puestos a punto y validados en fórmulas para lactantes y productos cárnicos en trabajos previos.
- Optimización y validación de métodos para la determinación de compuestos indicadores de la evolución de la oxidación lipídica en papillas de cereales con leche:
 - Puesta a punto y validación de un método de determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.
 - Puesta a punto y validación de un método de determinación de compuestos volátiles procedentes de la oxidación lipídica por microextracción en fase sólida y cromatografía gaseosa.
 - Adaptación, a las muestras problema, de un método de determinación de productos de oxidación de los esteroides puesto a punto y validado en margarinas y grasas para untar enriquecidas con fitosteroides en trabajos previos.
- Diseño experimental del muestreo: selección de las muestras, temperaturas y tiempos de muestreo durante el almacenamiento.
- Aplicación de los métodos a las muestras objeto de estudio.
- Tratamiento estadístico y evaluación de los resultados.
- Discusión de los resultados.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

LITERATURE REVIEW

A. NECESIDADES NUTRICIONALES EN LA INFANCIA

(Hernández y Sastre, 1999; Cervera, 2000; Bueno, Sarriá y Pérez-González, 2002)

El hecho fisiológico que define al niño y lo diferencia del adulto es el crecimiento, que consiste básicamente en un aumento de la masa corporal que se acompaña de un proceso de remodelación morfológica y maduración funcional. Para que se realice con normalidad es necesario un aporte adicional de energía y nutrientes esenciales para la síntesis y aposición de nuevas moléculas. Por otra parte, en la infancia se adquieren los hábitos dietéticos que van a mantenerse en la edad adulta. Una situación nutricional adecuada en las primeras etapas de la vida –desde la vida intrauterina hasta el final de la primera infancia – es fundamental, por los efectos que tiene sobre el desarrollo físico, mental, emocional y psicomotor y la influencia de todo ello en el futuro desarrollo del niño.

La alimentación infantil debe cumplir un triple objetivo:

- Cubrir las necesidades energéticas y plásticas para permitir un crecimiento y desarrollo normales.
- Evitar carencias y desequilibrios entre los distintos nutrientes.
- Contribuir a la prevención de una serie de enfermedades del adulto relacionadas con la nutrición.

Los dos primeros años de vida del niño, se caracterizan por un crecimiento rápido, que se desacelera de forma progresiva ya desde el nacimiento. Durante estos dos años, el ser humano experimenta una serie de cambios antropométricos y en la composición de sus tejidos con disminución del contenido de agua, aumento de grasa, de proteínas y de algunos iones intracelulares, como potasio, y

extracelulares, como calcio que se deposita mayoritariamente en el tejido óseo.

Las proteínas constituyen aproximadamente el 11% de la masa corporal del recién nacido y aumentan hasta el 15% al año de edad. Los aminoácidos se utilizan para sintetizar las proteínas corporales y, además, aportan nitrógeno para la síntesis de otros compuestos fisiológicos importantes. La ingestión de grasas durante la infancia es fundamental, no sólo para satisfacer las necesidades energéticas sino también como fuente de nutrientes esenciales. Debido a su reducida capacidad gástrica, el recién nacido necesita una dieta de elevada densidad energética por lo que la contribución de las grasas al aporte energético total debe ser superior al 40%, a diferencia del adulto, en cuya dieta las grasas deberían contribuir como máximo en un 30% al aporte energético total (Ronayne de Ferrer, 1998).

El modelo para establecer la contribución de los distintos principios inmediatos al aporte energético total es la leche de mujer, por lo que las grasas deben contribuir en un 50-54%, los hidratos de carbono en un 36-40% y las proteínas en un 7%.

En el cuadro nº 1 se resumen las recomendaciones de energía y nutrientes propuestas por el "Food and Nutrition Board" de la Academia Nacional de Ciencias de los EE.UU.

Cuadro n° 1. Necesidades nutricionales en la infancia. Recomendaciones de los principales nutrientes durante los primeros tres años de vida.

Necesidades		0 - 6 meses	7 - 12 meses	1-3 años
Agua ^a	l/día	0.7	0.8	1.3
Energía ^a	kcal/día	438-645	608-844	837-1184
Proteínas ^a	g/día	9.1	11.0	13
Hidratos de carbono ^a	g/día	60	95	130
Grasas ^a	g/día	31	30	n.d.
Calcio ^b	mg/día	210	270	500
Fósforo ^b	mg/día	100	275	460
Magnesio ^b	mg/día	30	75	80

(Food and Nutrition Board RDA ^a2002/2005, ^b1997; n.d: no determinado)

B. ETAPAS DE LA ALIMENTACIÓN EN LA PRIMERA INFANCIA

(Hernández y Sastre, 1999; Cervera, 2000; Bueno, Sarriá y Pérez-González, 2002)

Teniendo en cuenta las necesidades nutricionales, la capacidad digestivo-absortiva y la maduración de los sistemas orgánicos que intervienen en la nutrición, en la alimentación durante la infancia pueden distinguirse tres periodos:

- **Lactancia** (0 a 6 meses): la leche materna constituye el elemento nutricional esencial y único. Cuando la lactancia natural no es posible se utilizan fórmulas para lactantes (FL). Su composición es adecuada para satisfacer los requerimientos de energía y nutrientes del lactante. La lactancia natural proporciona al niño una protección pasiva a través de su contenido de anticuerpos, células viables y otras

sustancias que impiden la colonización por microorganismos patógenos y el paso de antígenos. Además, el calostro tiene una acción trófica sobre el crecimiento y maduración de la mucosa que contribuye a mejorar su función de barrera y la resistencia a la infección y a otros agentes patógenos.

- **Transición o diversificación progresiva** (6 a 12 meses): tradicionalmente denominado *Beikost* o alimentación complementaria, en la que se introducen de forma paulatina otros alimentos – aparte de la leche que se debe mantener – con el fin de cubrir las necesidades nutritivas crecientes del niño e iniciar el paso a la alimentación omnívora propia del adulto. El niño comienza a conocer los alimentos básicos, los sabores fundamentales y las distintas texturas.

- **Adaptación a la alimentación del adulto** (1 a 3 años): las funciones digestivas y metabólicas del lactante han alcanzado un grado de madurez suficiente para que la tolerancia a la alimentación variada se aproxime a la del adulto; el niño puede recibir la misma dieta que el adulto, aunque ajustada a sus particularidades fisiológicas y a las variaciones en el gasto energético por actividad física.

C. PRODUCTOS DIETÉTICOS UTILIZADOS EN LA ALIMENTACIÓN DEL LACTANTE

(Hernández y Sastre, 1999; Cervera, 2000; Bueno, Sarriá y Pérez-González, 2002)

C.1. LECHE HUMANA Y LECHE DE VACA

Las condiciones anatómicas y fisiológicas del lactante exigen que el alimento utilizado en esta época de la vida tenga unas determinadas características.

La leche humana es el alimento ideal durante los 4 ó 6 primeros meses, ya que cubre todas las necesidades nutritivas del lactante y evita riesgos innecesarios; por ello constituye el modelo óptimo para la composición de las FL. Puesto que éstas se elaboran a partir de leche de vaca, de composición sensiblemente diferente, es necesario modificarla para hacerla similar a la leche materna (OMS, 1981).

La leche de mujer tiene un menor contenido proteico y mineral que la leche de vaca, lo que está relacionado con la menor velocidad de crecimiento del recién nacido. La mayor relación proteínas del suero/ caseína, en la leche humana que en la leche de vaca, asegura una mejor digestibilidad de la leche, asimismo, la leche materna tiene un mayor contenido de nitrógeno no proteico (ácidos nucleicos, nucleósidos y nucleótidos), que interviene en la maduración del intestino y el desarrollo inmunitario (Kunz y Lönnerdal, 1992; Blanco y Tellería, 1995).

Las leches de mujer y de vaca difieren en la composición cualitativa y cuantitativa de su fracción grasa, lo que tiene importantes consecuencias nutricionales. En comparación con la leche de vaca, la leche de mujer es más rica en ácidos grasos esenciales

(AGE), en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) (oleico y palmitoleico) y contiene menos ácidos grasos saturados (AGS) de cadena larga, además difiere en la estructura de los triglicéridos (TG). Estos factores condicionan la digestibilidad y la biodisponibilidad de los AGE en el lactante, ya que la grasa de la leche materna se absorbe en más del 90%, siendo menor la absorción de la correspondiente a la leche de vaca.

La lactancia materna incrementa los contenidos séricos de colesterol total y de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol) durante la infancia, pero a largo plazo, en la etapa adulta, éstos son menores, lo que sugiere que la lactancia materna podría tener una acción beneficiosa sobre la salud cardiovascular (Owen *et al.*, 2002).

La leche humana tiene un mayor contenido de lactosa que la leche de vaca para mantener el equilibrio osmótico y hacerla isotónica con el plasma sin aumentar la concentración de sales minerales; además contiene otros hidratos de carbono que apenas existen en la de vaca.

Los contenidos de vitaminas de la leche de mujer dependen del estado nutricional de la misma, pero todas las que contiene se transfieren, en principio, al niño, mientras que las presentes en la leche de vaca pueden sufrir pérdidas, más o menos importantes, en el curso de su recogida, en las diferentes etapas del tratamiento de higienización, conservación y almacenamiento.

La leche humana es un líquido dinámico, los contenidos de algunos de sus componentes pueden presentar un coeficiente de variación de hasta un 30%. La composición del calostro (primeros 4-6 días de vida), difiere de la correspondiente a la leche de transición (6º-15º día de vida) y ésta de la leche madura. Además, la composición se modifica a lo largo de la toma, siendo al comienzo

más rica en hidratos de carbono y agua y al final más abundante en lípidos y pobre en agua.

C.2. FÓRMULAS PARA LACTANTES

Los preparados industriales destinados a la alimentación del lactante son útiles cuando la lactancia materna no es posible o resulta insuficiente. En las directivas publicadas por la Comunidad Europea (CE) relativas a los productos utilizados para la alimentación de los lactantes (91/321/CE, de 14 de mayo, 96/4/CE, de 16 de febrero, 99/50/CE, de 25 de mayo, 2003/14/CE, de 10 de febrero y 2006/141/CE de 22 de diciembre), se denominan "preparados para lactantes" a los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes durante los primeros 4 a 6 meses de vida, que satisfacen por sí mismos las necesidades nutritivas de este grupo de personas; "preparados de continuación" a productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes de más de 4 meses, que constituyen el principal alimento líquido de una dieta progresivamente diversificada de esta categoría de personas; "leche para lactantes" y "leche de continuación" cuando los preparados son elaborados exclusivamente a partir de proteínas procedentes de leche de vaca. La composición de las fórmulas comercializadas en España debe ajustarse a lo indicado por la Reglamentación Técnico-Sanitaria (RTS) específica relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación (Real Decreto (RD) 72/1998, de 23 de enero, modificado por RD 1446/2000, de 31 de julio, estando actualmente en vigor el RD 500/2004, de 1 de abril).

C.3. PAPILLAS DE CEREALES

Son el primer integrante del *Beikost* que suele ofrecerse al lactante en muchos países, debido a su consistencia fluida, su buena aceptación y su fácil deglución.

Los cereales son alimentos ricos en hidratos de carbono, que aportan a la dieta no sólo energía, sino también proteínas, minerales y vitaminas (especialmente tiamina). Los lípidos proporcionan a los recién nacidos y lactantes la mayor parte de la energía dietética, pero el bebé que consume papillas de cereales ya está más desarrollado, tiene un estómago con una mayor capacidad, por lo que disminuye la importancia de la contribución de los lípidos al aporte energético, por lo tanto, el contenido de grasa es bajo, pero son relativamente ricos en ácidos grasos esenciales.

Los alimentos destinados a la alimentación infantil que contienen cereales, pueden estar constituidos por un solo tipo de cereal o por una mezcla de varios, y pueden estar enriquecidos con leche, vegetales, miel, frutos secos, cacao o frutas. Los cereales destinados a niños de corta edad deben recibir un tratamiento tecnológico (dextrinación) que permita su rápida dispersión en agua, leche u otro líquido, y facilite su digestión. Para ello, los cereales pueden tratarse de dos maneras: por calor o con enzimas; las dos acortan el tiempo de cocción o pueden, incluso, eliminar por completo la necesidad de ésta. Los cereales pueden incorporarse al biberón a partir del 5º o 6º mes, en una concentración de un 3-5%, aumentando ésta de forma progresiva hasta un 10-12%, que es la consistencia usual de una papilla, comenzando por cereales sin gluten y administrando cereales con gluten a partir del 8º mes.

Los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes (niños menores de 12 meses) y niños de

corta edad (niños entre 1 y 3 años) están regulados por la Directiva 2006/125/CE, de 5 de diciembre de 2006, que deroga la anterior, modificada en diversas ocasiones (Directiva 96/5/CE, de 16 de febrero (RD 490/1998, de 27 de marzo), actualizada mediante la Directiva 98/36/CE de 2 de junio (Orden de 14 de julio de 1999) y modificada por la Directiva 99/39/CE, de 6 de mayo (RD 1445/2000, de 31 de julio) y la Directiva 2003/13/CE, de 10 de febrero (RD 480/2004, de 26 de marzo)).

Son productos alimenticios destinados a una alimentación especial, que satisfacen las necesidades específicas de los lactantes y niños de corta edad en buen estado de salud, destinados a los lactantes durante el período de destete y a los niños de corta edad, como complemento de su dieta y/o para su progresiva adaptación a los alimentos normales. Se clasifican en dos grupos:

1. "Alimentos elaborados a base de cereales", que se dividen en las cuatro categorías siguientes:
 - a). Cereales simples reconstituidos o que deben reconstituirse con leche u otro líquido alimenticio adecuado.
 - b). Cereales con adición de otro alimento rico en proteínas reconstituidos o que deben reconstituirse con agua u otro líquido que no contenga proteínas.
 - c). Pastas que se deben cocer en agua hirviendo o en otros líquidos apropiados antes de su consumo.
 - d). Bizcochos y galletas que pueden consumirse directamente o, una vez pulverizados, con adición de agua, leche u otro líquido adecuado.

Los alimentos elaborados a base de cereales se prepararán a partir de uno o varios cereales o raíces feculentas, previamente

triturados. La cantidad de cereal y/o raíz feculenta será como mínimo del 25% en peso de la mezcla final seca.

2. "Alimentos infantiles" distintos de los alimentos elaborados a base de cereales.

Los alimentos elaborados a base de cereales y los alimentos infantiles se fabrican con ingredientes cuya adecuación a la alimentación especial de los lactantes y niños de corta edad haya sido determinada mediante datos científicos generalmente aceptados. La Directiva regula la composición de estos alimentos, las sustancias nutritivas que pueden adicionarse en su fabricación y el límite máximo, así como el etiquetado.

No pueden contener ninguna sustancia en cantidad tal que ponga en peligro la salud de los lactantes y niños de corta edad. Así, se especifican los límites máximos de plaguicidas y de residuos de plaguicidas en el producto listo para el consumo o reconstituido conforme a las instrucciones del fabricante.

La edad a partir de la cual pueden consumirse estos alimentos es de 4 meses.

Las papillas de cereales con leche, objeto de esta Tesis Doctoral, se integran en la categoría 1.b (alimentos elaborados a base de cereales con adición de otro alimento rico en proteínas). Su composición en proteínas, hidratos de carbono y lípidos, debe adaptarse a los siguientes criterios:

- El contenido en proteínas será como máximo de 5.5 g/100 kcal. Se deberán añadir como mínimo 2 g de proteínas/100 kcal. El índice químico de las proteínas añadidas será equivalente como mínimo al 80% de la proteína de referencia (caseína) o el coeficiente

de eficacia proteica de la mezcla será equivalente como mínimo al 70% de la proteína de referencia.

- Hidratos de carbono: si se añade al producto sacarosa, fructosa, glucosa, jarabes de glucosa o miel, la cantidad de hidratos de carbono procedente de estas fuentes no será superior a 5 g/100 kcal. La cantidad de fructosa añadida no será superior a 2.5 g/100 kcal.

- El contenido de lípidos será como máximo 4.5 g/100 kcal. Si es superior a 3.3 g/100 kcal, la cantidad de ácido láurico y ácido mirístico serán como máximo del 15% del total del contenido en lípidos y la cantidad de ácido linoleico deberá estar entre 300 y 1200 mg/100 kcal.

Debido a que el objetivo de esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de la fracción lipídica de las papillas, en este apartado se hace especial referencia al aporte lipídico en la alimentación durante la infancia.

D. LOS LÍPIDOS EN LA ALIMENTACIÓN DURANTE LA INFANCIA

Existe un interés creciente en la calidad de los lípidos de la dieta en la infancia, puesto que es un factor importante en el crecimiento, desarrollo y salud a largo plazo. La elección de los lípidos de la dieta durante los primeros años de vida se considera ahora de gran importancia (Uauy y Castillo, 2003).

Los lípidos de los alimentos están constituidos en su mayor parte por TG de ácidos grasos (AG), en su mayoría (90%) de cadena larga, y una pequeña proporción por mono y diglicéridos, AG libres,

esteroles y compuestos más complejos, como fosfolípidos y glicolípidos.

D.1. TRIGLICÉRIDOS

Los TG constituyen una fuente concentrada de energía prácticamente insustituible. Además contribuyen a hacer los alimentos más agradables al paladar y son el vehículo de las vitaminas más liposolubles y el órgano de protección y aislamiento térmico (Hernández y Sastre, 1999).

D.2. FOSFOLÍPIDOS Y GLICOLÍPIDOS

Los fosfo y glicolípidos cumplen importantes funciones estructurales en las membranas celulares y en los órganos intracelulares (mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi), vainas de mielina, y forman parte de sistemas enzimáticos importantes. Los fosfolípidos, junto con el colesterol, se encuentran en las membranas biológicas y modulan importantes funciones fisiológicas como, por ejemplo, la fluidez y permeabilidad de las membranas, la actividad de los enzimas y receptores fijados a la membrana, y la respuesta eléctrica a la excitación (Hernández y Sastre, 1999).

D.3. ÁCIDOS GRASOS

Los AG de los alimentos son compuestos de cadenas hidrocarbonadas lineales y monocarboxiladas, de longitud variable desde 4 hasta 22-24 átomos de carbono. Los AG de los alimentos son mayoritariamente de número par de átomos de carbono, aunque se

pueden encontrar AG de número impar, pero sus contenidos son extraordinariamente bajos. Sólo los primeros son utilizados por el organismo (Hernández y Sastre, 1999). Los AG no se encuentran en la naturaleza como tales, sino que forman parte de los TG, ésteres de esteroides y fosfolípidos (Jensen, 1995; Hamosh, 1995).

En función de su grado de saturación los AG se clasifican en: saturados (AGS), AGMI y poliinsaturados (AGPI).

D.3.1. Ácidos grasos saturados

Una elevada ingesta de AGS favorece el aumento de LDL-colesterol en sangre, debido especialmente a los AGS de entre 12 y 16 átomos de carbono. El ácido esteárico no tiene efecto alguno sobre el LDL-colesterol, aunque presenta un efecto perjudicial al disminuir el colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol). La ingesta de AGS está directamente relacionada con la incidencia de enfermedad cardiovascular (Dwyer, 1995; Hu, 2001).

D.3.2. Ácidos grasos monoinsaturados

Los AGMI de las series n-7 y n-9 pueden ser sintetizados *de novo* por los seres humanos y los animales a partir de los AGS, por lo que no se consideran AGE. La $\Delta 9$ -desaturasa es la responsable de la síntesis de los principales AGMI: a partir del ácido palmítico se obtiene el palmitoleico (16:1 n-7) y del esteárico se obtiene el ácido oleico (18:1 n-9) (Uauy y Castillo, 2003). El ácido oleico, presente en elevada proporción en la leche materna, se absorbe mejor que los AGS, es menos sensible a la oxidación que los AGPI y parece tener efectos favorables frente al riesgo aterosclerótico (Aggett *et al.*, 1991).

D.3.3. Ácidos grasos poliinsaturados

Los más usuales en los alimentos presentan una serie de características comunes, tales como: número de insaturaciones comprendido entre 1 y 6, posiciones preferentes en lo que concierne a los dobles enlaces, que permite clasificar a los AG en tres series: n-3, n-6 y n-9, y todos ellos con una configuración espacial (isomería geométrica) en forma *cis*.

La calidad y la composición de la grasa de la dieta suministrada a los niños tienen efectos estructurales y funcionales en el desarrollo de los órganos, especialmente en el enriquecimiento lipídico de los tejidos neuronales como el cerebro y la retina (Decsi y Koletzko, 1994). El desarrollo neuronal perinatal se caracteriza por una rápida multiplicación de las células neuronales, la arborización dendrítica y la mielinización. Estos procesos requieren lípidos, en especial, AGPI en membranas, por lo tanto el aporte de lípidos puede modificar el crecimiento y el desarrollo del sistema nervioso.

En estados de malnutrición, el ácido oleico es elongado en los tejidos animales por la $\Delta 6$ -desaturasa y la $\Delta 5$ -desaturasa hasta los derivados de cadena larga. Estos derivados poliinsaturados de cadena larga son fisiológicamente muy importantes en el cerebro, por ser componentes estructurales de la mielina.

Los AGPI de 18 átomos de carbono de las series n-3 y n-6 no pueden ser sintetizados *de novo* por el ser humano debido a que éste no puede insertar dobles enlaces por la falta de enzimas $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasas, responsables de la introducción de dobles enlaces en las posiciones n-6 y n-3. Por lo tanto, se consideran nutrientes esenciales

y se deben obtener a partir de la dieta (Burr, 1929). Los precursores de ambas familias son los ácidos linoleico (18:2 n-6) y α -linolénico (18:3 n-3) que se consideran AGE.

La importancia de los AGE (ácidos linoleico y α -linolénico) radica en que son precursores de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL), tanto de la serie n-6, como de la serie n-3 (ver figura nº 1). Ambos AG se transforman, en los tejidos animales, en sus derivados de cadena larga por procesos alternativos de elongación y desaturación, que aumentan la longitud de la cadena de carbonos e introducen nuevos dobles enlaces a los AG precursores (Sprecher *et al.*, 1995; Ferdinandusse *et al.*, 2001; Innis, 2003).

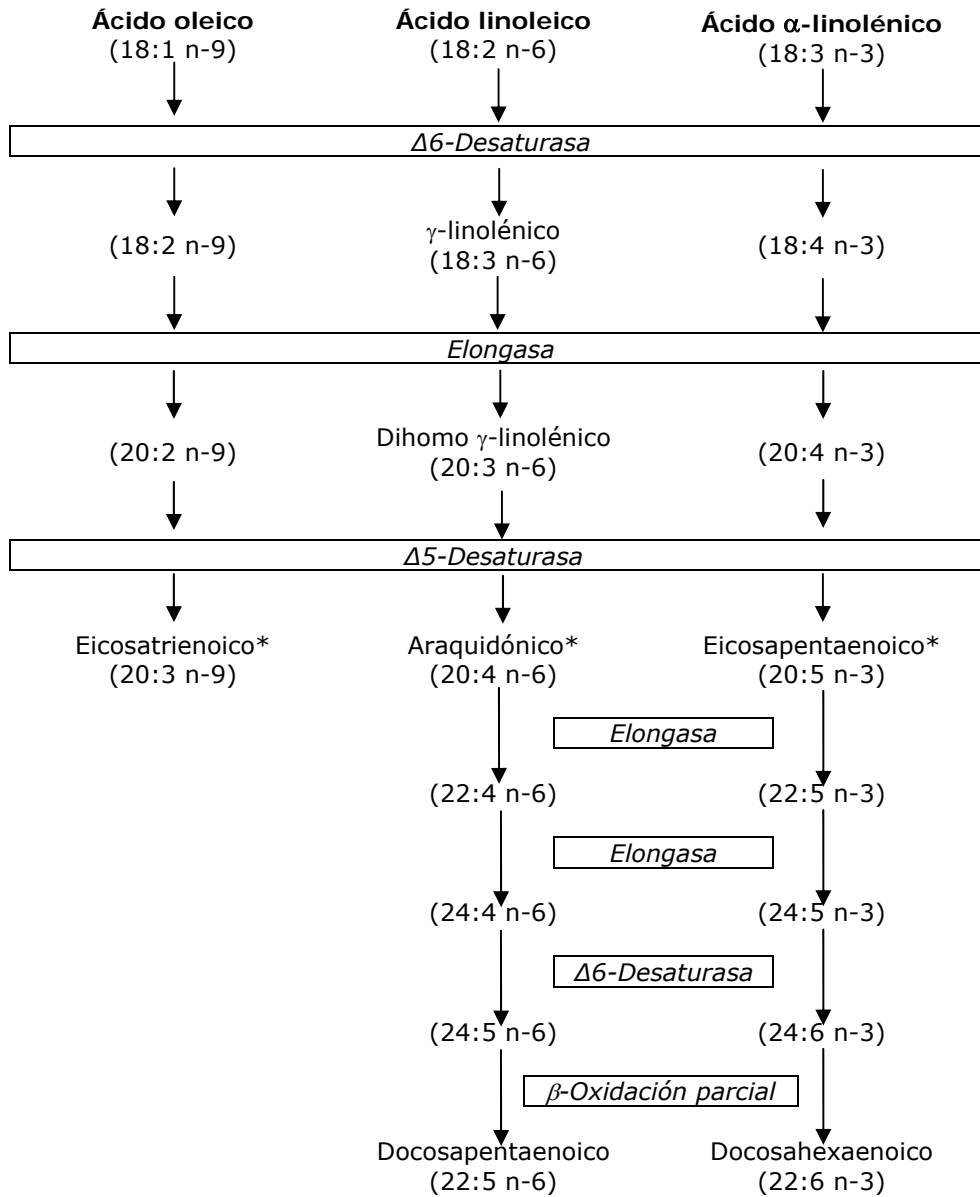
Los AG de las series n-9, n-6 y n-3 compiten por el mismo sistema enzimático y por eso influyen en el metabolismo de los AG de sus respectivas familias. Los tres ácidos precursores (ácidos oleico, linoleico y linolénico) compiten por la $\Delta 6$ -desaturasa, primer enzima de las vías de síntesis de los AGPI-CL (ver figura nº 1), que se convierte así en enzima limitante. Su afinidad por los ácidos muestra el siguiente orden de preferencia: n-3 > n-6 > n-9. El predominio de una u otra vía metabólica depende de la cantidad de AG presente, por lo tanto, la síntesis de los diferentes AGPI-CL depende directamente de la concentración de los respectivos precursores y es de esencial importancia un aporte correctamente equilibrado. Además, la actividad de esta enzima puede quedar inhibida por un proceso de retroalimentación por exceso de producto.

El derivado de cadena larga más importante de la serie n-6 es el ácido araquidónico (AA) (20:4 n-6), precursor de la biosíntesis de varias series de eicosanoides (prostanoides y leucotrienos). En la serie n-3, los derivados más importantes son los ácidos eicosapentaenoico

(EPA) (20:5 n-3) y docosahexaenoico (DHA) (22:6 n-3). El EPA es también precursor de varias series de eicosanoides, con estructuras químicas distintas y funciones antagónicas a los derivados del AA. El DHA y AA son componentes estructurales importantes del sistema nervioso central. Estos AG se transfieren al feto a través de la placenta, están presentes en la leche humana, y se acumulan en el cerebro y la retina durante el desarrollo fetal y primeras semanas de vida postnatal, existiendo una elevada concentración de DHA en la retina, y de DHA y AA en la materia gris del cerebro. En los lípidos del cerebro de los recién nacidos, el contenido de AGPI-CL n-6 duplica prácticamente al del AGPI-CL n-3 (Uauy y Hoffman, 2000; Lauritzen *et al.*, 2001; Innis, 2003).

En niños prematuros se describen deficiencias de ácido linoleico cuando se retrasa la introducción de la ingesta de grasa. En lactantes, la deficiencia de ácido linoleico (aporte inferior al 1% de ingesta energética total) se manifiesta por piel seca y escamosa, de mayor grosor, acompañada de un retraso en el crecimiento. La deficiencia de AG n-6 puede también provocar, entre otros, polidipsia y poliuria (Burguess *et al.*, 2000).

Figura nº 1. Los lípidos en la nutrición de la infancia. Síntesis metabólica de ácidos grasos de cadena larga a partir de los ácidos grasos esenciales.



*: Precursores inmediatos de prostaglandinas y otros eicosanoides.

En cuanto al ácido linolénico, la información relativa a su deficiencia en seres humanos es escasa, la mayoría de datos disponibles proceden de estudios en animales, que han demostrado que la disminución de DHA en la retina y el cerebro reduce la función visual y del aprendizaje, produce polidipsia, y cambios en el comportamiento (Innis, 2000; Salem *et al.*, 2001). De forma similar, los niños pequeños incapaces de sintetizar DHA (síndrome de Zellweger) tienen bajos contenidos de este AG en la retina y el cerebro y padecen de ceguera y atonía general. Algunos de estos síntomas revierten con los suplementos de DHA (Gibson y Makrides, 2000).

Los AGPI-CL desempeñan varias funciones en: la permeabilidad de la membrana, la diferenciación del fotorreceptor, la activación del pigmento visual de la rodopsina, la actividad de algunos enzimas, la función de los canales iónicos y en los niveles y el metabolismo de neurotransmisores y eicosanoides (Sellemayer y Koletzko, 1999).

Debido a que durante el periodo fetal se produce la diferenciación celular, se ha evaluado el efecto de la suplementación de la dieta materna con DHA durante la gestación (Judge *et al.*, 2007), y se ha mostrado una mayor capacidad en la resolución de problemas aunque sin diferencias en la capacidad intelectual a los 9 meses de edad.

Durante las primeras etapas de la vida los requerimientos de AGPI-CL pueden sobrepasar la capacidad endógena para su síntesis a partir de los precursores, especialmente en niños prematuros ya que no reciben la suplementación intrauterina de DHA durante el último trimestre de embarazo (Helland *et al.*, 2003) y su vía metabólica para obtener DHA es inmadura (Gibson y Makrides, 1999). Por lo que,

durante este período los AGPI-CL se consideran nutrientes esenciales que deben aportarse con la dieta (Aggett *et al.*, 1991). Los niños alimentados con lactancia materna reciben un aporte de AGPI-CL suficiente para satisfacer los requerimientos para el crecimiento, inclusive cuando se trata de prematuros.

El DHA y el AA se han utilizado en la suplementación de preparados para lactantes. Sin embargo, los estudios realizados para analizar el efecto que produce dicha suplementación sobre el recién nacido a término no han sido concluyentes (Helland *et al.*, 2003), ya que algunos han mostrado una mejora en la agudeza visual, en la resolución de problemas y/o en el desarrollo neurológico del recién nacido (Makrides *et al.*, 1995; Willatts *et al.*, 1998; Birch *et al.*, 1998 y 2000), mientras que en otros estudios no se ha visto efecto alguno (Makrides *et al.*, 2000; Auestad, 2001).

Otro tipo de AG importantes en la nutrición infantil son los isómeros *trans* de los AGPI, los cuales, según la ESPGHAN (*European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*) pueden ser absorbidos, metabolizados e incorporados a la sangre y tejidos por los lactantes (Aggett *et al.*, 1991). Estos AG pueden tener potenciales efectos adversos sobre el crecimiento y desarrollo fetal e infantil, posiblemente a través de la inhibición de las reacciones de desaturación de los AG n-6 y n-3, linoleico y α -linolénico, respectivamente para dar lugar a sus respectivos AGPI-CL (Koletzko, 1982; Sugano y Ikeda, 1996; Decsi *et al.*, 2001; Elias e Innis, 2001).

D.4. ESTEROLES

Aunque son componentes minoritarios de la grasa de la dieta humana, algunos de estos compuestos tienen una gran importancia biológica.

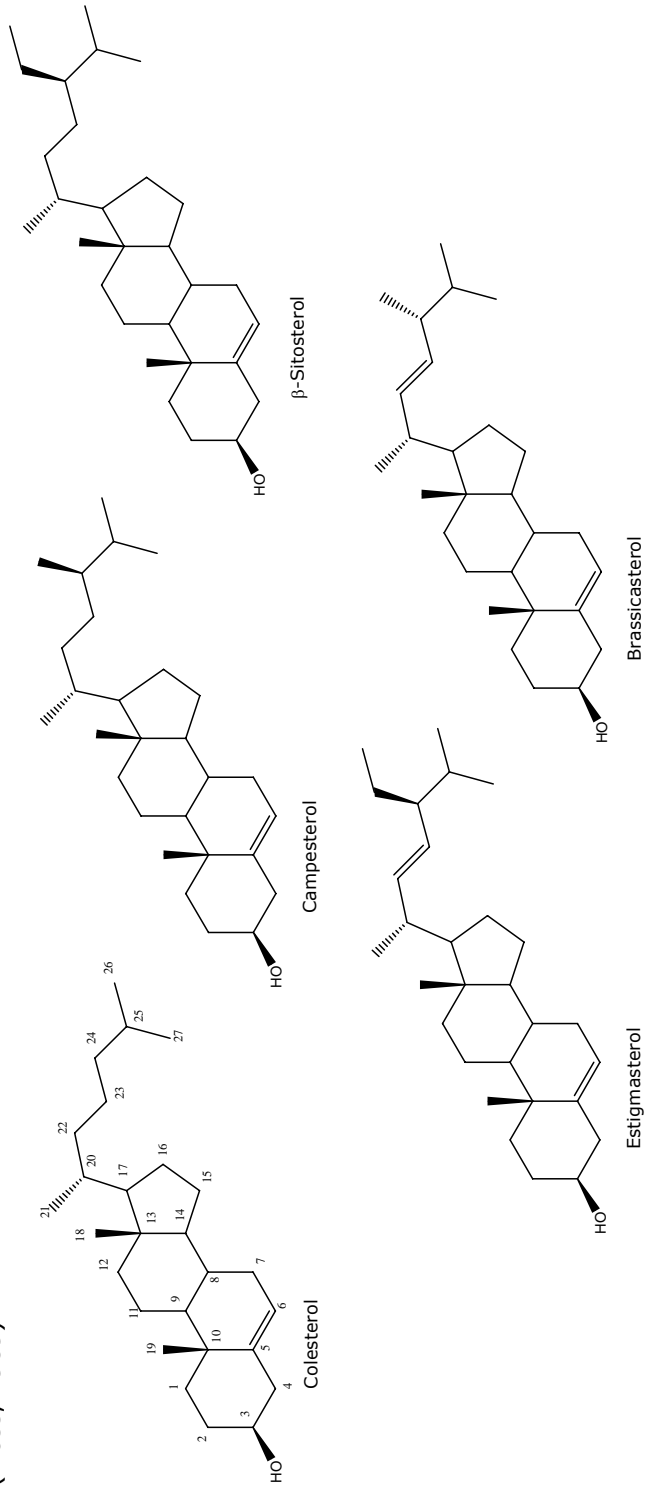
El colesterol es el principal esteroles animal, mientras que β -sitosterol, campesterol, estigmasterol y brassicasterol son los principales fitosteroles o esteroleles vegetales.

Los esteroleles pueden clasificarse en 4-desmetilesteroleles, 4 α -monometilesteroleles y 4,4-dimetilesteroleles. Los 4 α -monometilesteroleles y 4,4-dimetilesteroleles son intermediarios biosintéticos en la formación de los 4-desmetilesteroleles. El término 4-desmetilesteroleles incluye compuestos sin grupo funcional metilo en el carbono 4 (C-4), y se considera sinónimo del término esteroles (Akihisa *et al.*, 1991; Goad, 1991).

Los fitosteroleles más frecuentes con estructuras de 28 o 29 átomos de carbono y el colesterol, con 27 carbonos, son 4-desmetilesteroleles (Moreau *et al.*, 2002). Éstos tienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, con un grupo hidroxilo en el C-3, grupos metilo en C-10 y 13 y una cadena lateral alquílica de 8-10 carbonos en el C-17 (Moss, 1989; Goad, 1991).

Las estructuras de los fitosteroleles y del colesterol son muy similares: se diferencian principalmente por un grupo metilo o etilo en el C-24 de la cadena lateral (figura nº 2). La mayoría de los fitosteroleles y también el colesterol tienen un doble enlace entre C-5 y C-6 en el núcleo tetracíclico y por ello se llaman Δ^5 -esteroleles. Los fitosteroleles saturados, sin dobles enlaces en su estructura, reciben el nombre de fitostanoles (Akihisa *et al.*, 1991; Goad, 1991; Moreau *et al.*, 2002).

Figura n° 2. Los lípidos en la nutrición de la infancia. Estructuras del colesterol y de los fitosteroles más comunes (Moss, 1989).



La numeración es acorde con las recomendaciones de International Union of Pure and Applied Chemistry e International Union of Biochemistry (IUPAC-IUB) (1989)

D.4.1. Colesterol

Se encuentra en la mayoría de los tejidos del organismo (cerebro, hígado, sangre, etc.). Proviene, bien de los alimentos ricos en colesterol (yema de huevo, vísceras, leche, nata), bien de una síntesis endógena (principalmente en el hígado). Aunque poco abundante, es muy importante desde un punto de vista estructural y funcional, en particular como componente de las membranas celulares, mediando en su fluidez y permeabilidad. También es necesario para la síntesis de ácidos biliares, hormonas esteroideas y es precursor de la vitamina D; además, interviene en los mecanismos que regulan su síntesis y catabolismo.

Las dietas occidentales aportan alrededor de 300-600 mg de colesterol/día; a esta ingestión hay que sumarle una cantidad adicional (1000-1500 mg) producida por fuentes endógenas, principalmente el hígado y otros tejidos (Homan y Krause, 1997; Ellsworth y Starr, 1998; Hur *et al.*, 2007).

D.4.2. Fitosteroles

Tienen diversas funciones esenciales en los vegetales, como regular la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares, son precursores biogénicos de compuestos relacionados en el crecimiento de las plantas y, además, son sustratos para la síntesis de numerosos metabolitos secundarios, como glucoalcaloides y saponinas (Hartmann, 1998; Peng *et al.*, 2002; Read y Bacic, 2002). Los esteroides vegetales tienen un importante efecto hipocolesterolemizante, reduciendo las concentraciones de colesterol total y de LDL-colesterol (Moghadasian, 2000; Moreau *et al.*, 2002).

Se estima que la ingesta dietética de fitosteroles procedentes de fuentes naturales oscila entre 150 y 440 mg/día (De Vries *et al.*, 1997; Schothorst y Jekel, 1999; Ostlund, 2002), en España concretamente, se estima que es de 275.5 mg/día (Jiménez-Escrig *et al.*, 2006). Sin embargo, en personas vegetarianas, la ingesta puede aumentar hasta 1 g/día (Vuoristo y Miettinen, 1994; Ling y Jones, 1995; Piironen *et al.*, 2000).

La proporción fitosterol:colesterol de la dieta normalmente varía entre 0.5 y 1, pero recientemente se ha comprobado que excede de 1 (Valsta *et al.*, 2004).

D.5. RECOMENDACIONES RELATIVAS A LA COMPOSICIÓN DE LA FRACCIÓN GRASA EN LOS PREPARADOS PARA LACTANTES

La ESPGHAN recomienda un contenido en grasas de 4.4-6 g por 100 kcal (40-54% de las calorías totales) que es similar a los valores encontrados normalmente en leche humana. El aporte de ácido linoleico debería estar entre 300 mg y 1200 mg/100 kcal (aproximadamente entre 2.7 y 10.8% de la energía), se considera así que cubre los requerimientos mínimos de este AG evitando los efectos perjudiciales que, con respecto al metabolismo lipoproteico, función inmune, balance de eicosanoides y estrés oxidativo, podría producir un aporte mayor (Koletzko *et al.*, 2005).

Con respecto al ácido α -linolénico, se recomienda una ingesta mínima de 50 mg/100 kcal (aproximadamente 0.45% de la energía) (Koletzko *et al.*, 2005) y se considera aconsejable que la proporción ácido linoleico/ ácido linolénico esté comprendida entre 5/1 y 15/1, que es la presente en la leche materna (Aggett *et al.*, 1991; Koletzko *et al.*, 2005). En las DRI (2002/2005) para niños menores de un año, se recomiendan de 4.4-4.6 g/día de ácido linoleico y 0.5 g/día de

ácido α -linolénico, para niños entre 1-3 años, las recomendaciones son de 7 y 0.7 g/día, respectivamente.

Se recomienda que los AGPI-CL n-6 y n-3 no superen el 2 y el 1%, respectivamente, de los AG totales en las fórmulas lácteas, ya que un enriquecimiento excesivo puede tener efectos indeseables, como aumento de la peroxidación de los lípidos presentes en las membranas celulares, inhibición de la síntesis de AA, de AGPI-CL de la serie n-3 como el EPA y el DHA y de prostaglandinas, al competir con el ácido linolénico por las enzimas responsables de la elongación-desaturación (ver figura nº 1, apartado D.3.3). También se recomienda que los preparados para lactantes nacidos a término, aporten como mínimo un 0.2% de los AG totales en forma de DHA y un 0.35% como AA. Dado que los prematuros tienen menores contenidos corporales que los nacidos a término, las fórmulas destinadas a ellos tendrán como mínimo un 0.35% y un 0.4% de los AG totales en forma de DHA y AA, respectivamente (Koletzko *et al.*, 2001).

Se ha planteado la posibilidad de establecer recomendaciones para el resto de AGPI de las series n-3 y n-6 debido a los importantes efectos biológicos de los AGPI-CL, de ambas series, sobre el desarrollo del sistema nervioso (Uauy *et al.*, 1992; Kleinman y Stoker, 1995; Ballabriga y Carrascosa, 1998).

El colesterol no se añade de forma rutinaria a las FL, excepto en productos destinados a ensayos clínicos.

En cuanto a los ácidos láurico y mirístico, se considera que su contenido en conjunto no debe exceder el 20% del contenido total de grasa, debido a sus potenciales efectos negativos sobre el colesterol sérico y las concentraciones de lipoproteínas (Koletzko *et al.*, 2005).

E. OXIDACIÓN LIPÍDICA

La oxidación lipídica constituye uno de los principales problemas que afectan a la calidad de los alimentos procesados (Eriksson, 1987; Frankel, 1991); la estabilidad de la fracción lipídica es muy importante desde el punto de vista nutricional, organoléptico y toxicológico (Eriksson, 1982; Love, 1983; Fennema, 1993; Nawar, 1996).

E.1. ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos insaturados (AGI), en especial los AGPI, con posiciones alílicas muy reactivas y que son capaces de reaccionar, con relativa facilidad, con el oxígeno favorecen la oxidación lipídica. En este proceso, el oxígeno de la atmósfera reacciona con ciertos AGI, siendo los AGPI que son esenciales, especialmente para el desarrollo del cerebro y del sistema nervioso, los más susceptibles a la peroxidación (Halliwell, 1996). Aunque la oxidación enzimática y la fotooxidación tienen un papel destacado, el proceso más común e importante por el cual los AG reaccionan con el oxígeno formando radicales libres es la autooxidación lipídica (Frankel, 1980; Porter, 1990; Kappus, 1991; Hamilton *et al.*, 1997; Frankel, 1998; Belitz y Grosch, 1999; Gordon, 2001; Erickson, 2002b).

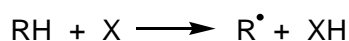
E.1.1. Autooxidación

La oxidación de los AGPI es una reacción auto-catalítica que se produce mediante un mecanismo de propagación en cadena de radicales libres, el cual comprende cuatro etapas. Una primera

reacción que produce un radical libre por la abstracción de un radical hidrógeno de un AG (iniciación). Después, las reacciones se encadenan para producir más radicales libres (propagación y ramificación) que se combinan para formar compuestos no radicalarios (terminación).

a). Iniciación

Se genera un radical libre lipídico centrado en un carbono, por abstracción de un átomo de hidrógeno adyacente a un doble enlace de un AGI (RH), debido a un agente iniciador (X) que propicia la cesión del oxígeno a los lípidos. Son agentes iniciadores la exposición a la luz, el calor, otro AG, sistemas enzimáticos o químicos productores de especies activas del oxígeno, las trazas de metales o el oxígeno molecular.

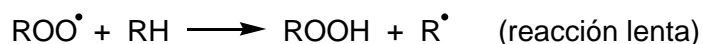


La abstracción del hidrógeno del carbono adyacente al doble enlace se favorece por la formación de un "radical alílico" muy estable en el que los electrones están deslocalizados sobre tres átomos de carbono (Knight *et al.*, 1951). Ello conduce a la formación de una mezcla de hidroperóxidos isoméricos debido a la estructura de resonancia del sistema alílico.

b). Propagación

Los radicales libres formados (R^{\bullet}) reaccionan con el oxígeno molecular para dar un radical peroxilo muy reactivo (ROO^{\bullet}). Este radical puede actuar sobre otro AGI, abstrayéndole un radical hidrógeno, generando así, un nuevo radical centrado en el carbono

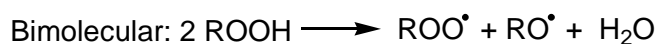
que iniciaría a su vez la cadena de propagación. Estas consideraciones no se limitan sólo al oxígeno molecular, sino también a otras especies como O_2^- , HO^\bullet , H_2O_2 (Coxon *et al.*, 1987).



Durante esta fase, se forma una elevada cantidad de hidroperóxidos.

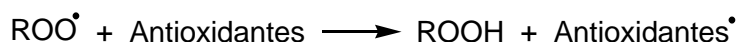
c). Ramificación

Se produce una descomposición de los hidroperóxidos formados en la etapa anterior, con lo que aumenta la concentración de radicales libres. La descomposición bimolecular es más probable ya que requiere menos energía de activación.



d). Terminación

La reacción en cadena, que se propaga por sí misma, se interrumpe por medio de conjugaciones, rupturas, descomposiciones o por reacciones de peroxiradicales con antioxidantes.



Los hidroperóxidos (ROOH) productos primarios de la oxidación lipídica, son compuestos, sin olor específico, muy inestables que sufren reacciones sucesivas de estabilización y escisión, originando diversos productos de descomposición de menor peso molecular que los lípidos no oxidados (productos secundarios de la oxidación).

E.1.2. Fotoxidación

La fotoxidación es una vía importante de producción de hidroperóxidos en presencia de oxígeno, energía luminosa y de fotosensibilizadores, tales como las hemoproteínas o la riboflavina. Los fotosensibilizadores absorben la energía luminosa y pasan al estado de triplete excitado e intervienen en la oxidación de los lípidos según dos tipos de mecanismos: fotosensibilizadores tipo I (del estado excitado abstraen un átomo de hidrógeno, o un electrón a las moléculas lipídicas para formar un radical capaz de reaccionar con el oxígeno) o tipo II (desde el estado excitado reaccionan con el oxígeno triplete para convertirlos en oxígeno singlete).

E.1.3. Oxidación enzimática

Las dos principales enzimas implicadas en los fenómenos de la oxidación enzimática de los AGI son la lipoxigenasa y la cicloxigenasa. La lipoxigenasa cataliza la inserción de una molécula de oxígeno en un AG según una reacción esteroespecífica. La cicloxigenasa es una

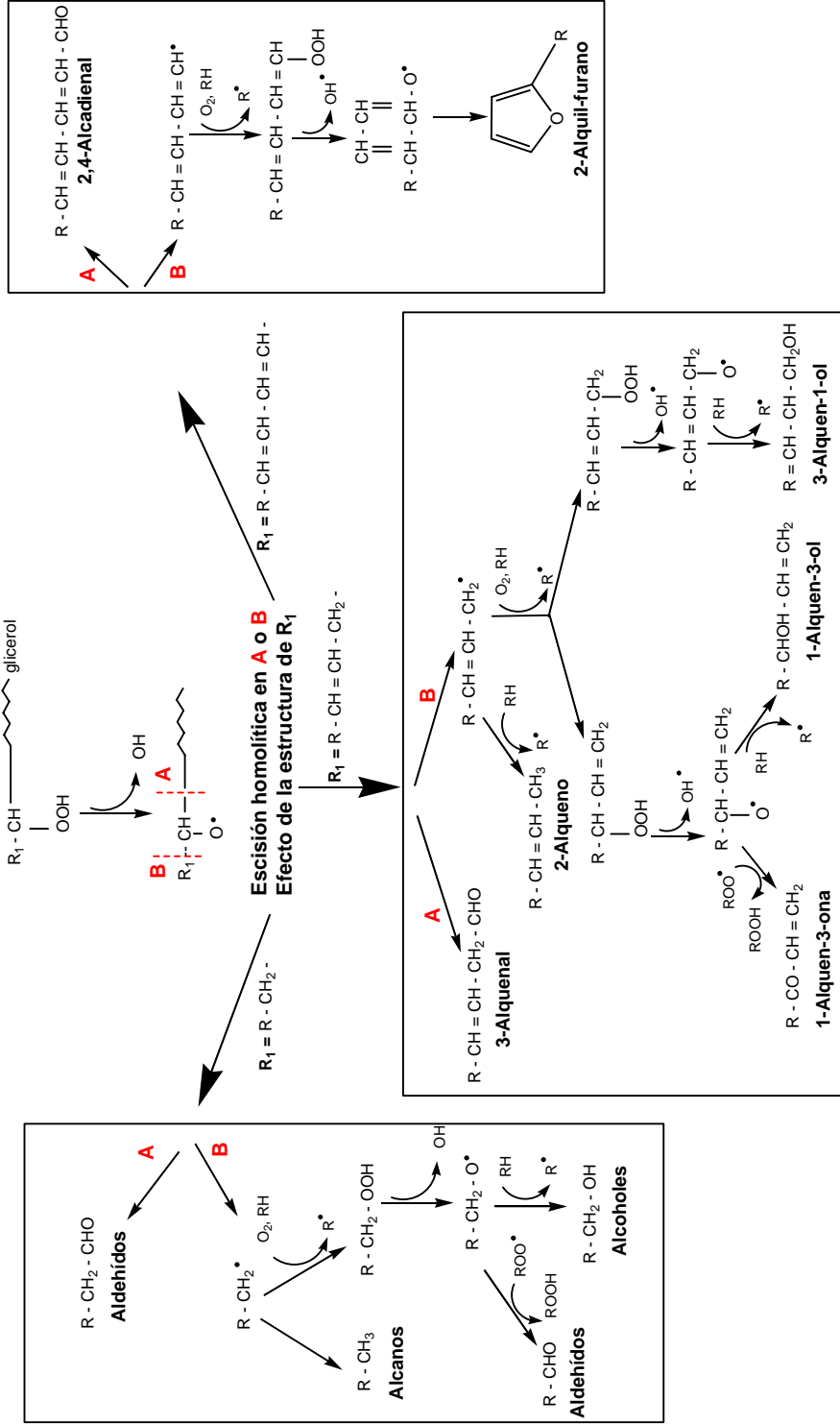
lipoxigenasa que incorpora dos moléculas de oxígeno a un AG para formar hidroperóxidos.

E.1.4. Escisión de los hidroperóxidos

La descomposición de los hidroperóxidos, en varias etapas, origina diversos compuestos de menor peso molecular según la posición del grupo hidroperóxido en la molécula inicial tales como dienos conjugados, cetonas, alcoholes, ácidos, hidrocarburos (etano, pentano, etc.), aldehídos volátiles (pentanal, hexanal, hexenal, 2-octenal, 2,4-decadienal) y no volátiles (4-hidroxinonenal, 4-hidroxihexenal) o dialdehídos como el malondialdehído (MDA), que es el aldehído más representativo de la oxidación lipídica (Esterbauer *et al.*, 1990) (ver figura nº 3); estos compuestos tienen interés desde el punto de vista sensorial ya que juegan un papel importante en el olor y sabor de los alimentos y también desde un punto de vista toxicológico (Frankel, 1980, 1982 y 1993a; Esterbauer y Cheeseman, 1990; Hageman *et al.*, 1992).

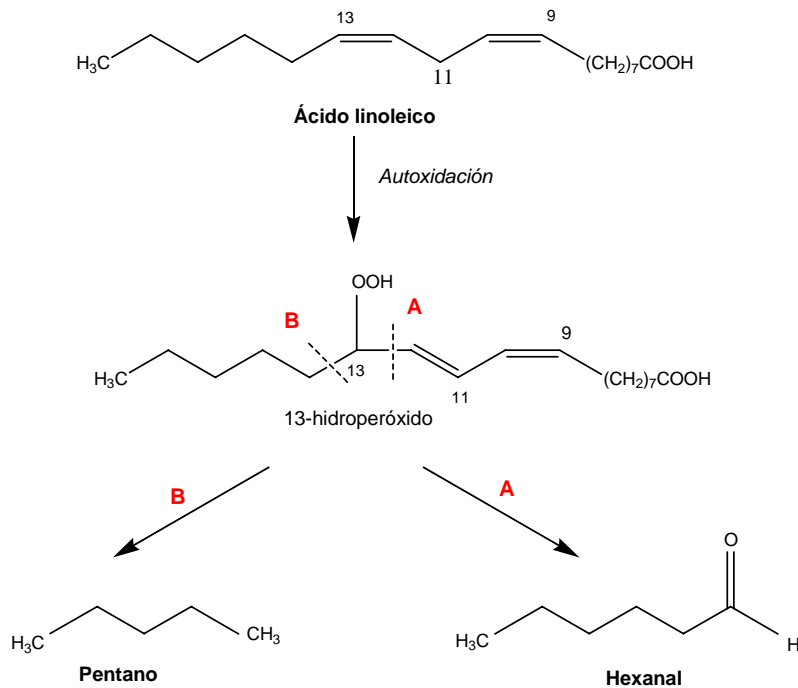
Entre los hidroperóxidos que se forman a partir de los AGI, destacan los 8- y 11-hidroperóxidos del ácido oleico, 9- y 13-hidroperóxidos del ácido linoleico, 9-, 12-, 13- y 16-hidroperóxidos del ácido linolénico, del cual los 12- y 13-hidroperóxidos sufren una rápida ciclación (Frankel *et al.*, 1961; Gardner, 1989).

40 **Figura n° 3.** Oxidación de los ácidos grasos. Mecanismos de descomposición de los hidroperóxidos.



La escisión del enlace oxígeno-oxígeno del grupo hidroperóxido, que da lugar a un radical alcoxilo y un radical hidroxilo marca la primera etapa en la descomposición. A continuación, se produce la rotura del enlace carbono-carbono a cada lado del grupo alcoxilo (rotura homolítica) generando productos como aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, ésteres, furanos y lactonas. En general, la rotura sobre el lado ácido produce un aldehído y un ácido, mientras que la escisión en el lado hidrocarbonado genera un hidrocarburo y un oxoácido u oxoéster. Así, la escisión de los hidroperóxidos formados a partir del ácido linoleico da lugar a hexanal y pentano (Frankel, 1982 y 1991) (figura nº 4).

Figura nº 4. Oxidación de los ácidos grasos. Escisión del 13-hidroperóxido del ácido linoleico en pentano y hexanal.

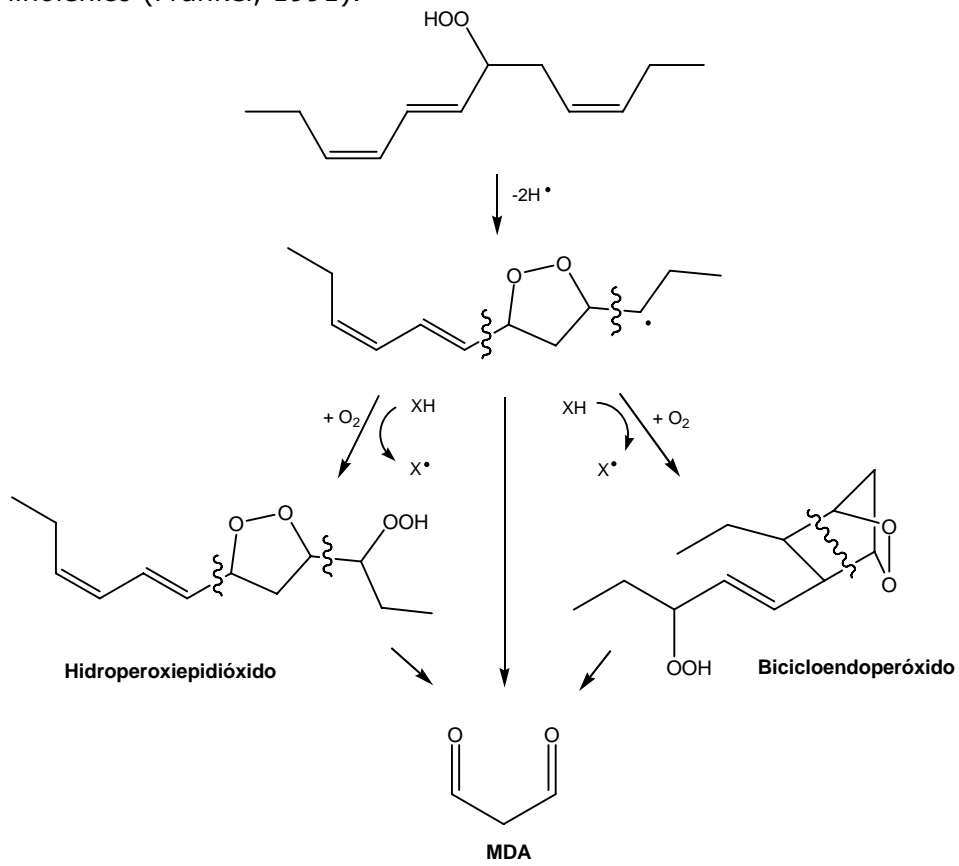


En medio ácido también puede producirse una escisión heterolítica, dando éteres de iones carbonio como intermediarios, los cuales pueden escindirse en los mismos compuestos que se obtienen en la rotura homolítica (Frankel *et al.*, 1984).

Los aldehídos formados durante la oxidación secundaria son responsables de los *off-flavors*, directa o indirectamente a través de sus formas enólicas o tautómeras. Además están relacionados con los efectos biológicos de la oxidación lipídica (Frankel, 1982).

Además, los hidroperóxidos pueden reaccionar de nuevo con oxígeno para formar productos secundarios como epoxihidroperóxidos, oxohidroperóxidos, dihidroperóxidos, hidroperoxiepidióxidos, peróxidos cíclicos y bicicloendoperóxidos. Estos productos secundarios pueden, a su vez, descomponerse del mismo modo que los monohidroperóxidos para formar compuestos volátiles, concretamente, los hidroperoxiepidióxidos y bicicloendoperóxidos son precursores del MDA (figura nº 5). Alternativamente, los hidroperóxidos pueden condensar en dímeros o polímeros (Dahle *et al.*, 1962; Prior *et al.*, 1976; Coxon *et al.*, 1981; Frankel, 1984, 1985 y 1991; Hama *et al.*, 1990).

Figura n° 5. Oxidación de los ácidos grasos. Formación de MDA a partir de hidroperoxiepidióxidos y bicicloendoperóxidos del ácido linolénico (Frankel, 1991).



E.1.5. Productos de interacción entre productos de oxidación lipídica y proteínas

Los hidroperóxidos y los productos secundarios provenientes de la oxidación de los lípidos interactúan con las proteínas y los aminoácidos (ver cuadro n° 2). Estas interacciones tienen un impacto importante en la degradación de las propiedades funcionales, sensoriales y nutricionales de los alimentos (Pokorny, 1977). La naturaleza de esta interacción depende del estado de oxidación de los

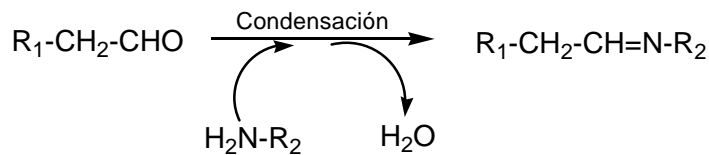
lípidos, es decir, del contenido de hidroperóxidos o de productos secundarios (Ladikos y Lougovois, 1990).

a). Hidroperóxidos

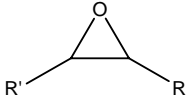
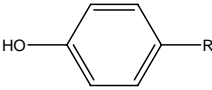
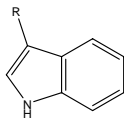
Los hidroperóxidos son más reactivos con los grupos amino y sulfidrilo de las proteínas. La reacción entre un hidroperóxido y un grupo α -amino conduce a la formación de un aldehído, mientras que la reacción entre un hidroperóxido y un grupo ε -amino libre genera una imina. Las modificaciones químicas inducidas por las interacciones entre los hidroperóxidos de los lípidos y las proteínas dan lugar a polímeros proteína-proteína, productos de adición lípido-proteína y degradaciones de aminoácidos, particularmente lisina, cisteína, metionina y triptófano (Gardner, 1979).

b). Compuestos carbonílicos

Los compuestos carbonílicos, principalmente los aldehídos, productos de la oxidación lipídica, pueden participar en reacciones de pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard, RM) por la reacción con los grupos aminos libres de aminoácidos y proteínas para formar las bases de Schiff (productos no volátiles y sensorialmente neutros) (Pokorny *et al.*, 1976; Stapelfeldt y Skibsted, 1994; Refsgaard *et al.*, 2000):



Cuadro nº 2. Oxidación de los ácidos grasos. Grupos reactivos en las interacciones entre los productos de oxidación de los lípidos con las proteínas según la naturaleza del enlace formado (Pokorny, 1977).

Grupos reactivos de los productos de oxidación lipídica	Grupos reactivos de las proteínas
Enlaces covalentes	
<p><i>Hidroperóxidos</i> R -OOH</p> <p><i>Aldehídos saturados</i> R-CH₂-CHO</p> <p><i>Aldehídos insaturados</i> R-(CH=CH)_n-CHO</p> <p><i>Cetonas</i> R-CH=CH-CO-R'</p> <p><i>Cetoles</i> R-CHOH-CO-R'</p> <p><i>Dicetonas</i> R-CO-CO-R'</p> <p><i>Epóxidos</i></p> 	<p><i>Aminas primarias</i> R-NH₂</p> <p><i>Aminas secundarias</i> R-NH-R'</p> <p><i>Tioles</i> R-SH</p> <p><i>Disulfuros</i> R-S-S-R'</p> <p><i>Disulfuros</i> R-S-S-R'</p> <p><i>Fenoles</i></p>  <p><i>Indoles</i></p> 
Puentes de hidrógeno	
<p><i>Hidroxiolos</i> R-CH=CH-CHOH-R'</p> <p><i>Dihidroxiolos</i> R-CHOH-CHOH-R'</p> <p><i>Carboxílico</i> R-COOH</p>	<p><i>Hidroxiolos</i> R-OH</p> <p><i>Enlaces peptídicos</i> R-CO-NH-R'</p> <p><i>Carboxílico</i> R-COOH</p>

Los aldehídos reaccionan preferiblemente con los grupos tiol de la cisteína y los grupos ϵ -amino de la lisina (Gardner, 1979). Pokorný *et al.*, (1987) observan una relación inversa entre la longitud de la cadena de los aldehídos y su reactividad con las proteínas. Las reacciones del MDA con las proteínas conducen a la formación de grupos carbonilos en la cadena aminoacídica (Burcham y Kuhan, 1996).

Posteriormente, las bases de Schiff polimerizan por condensación aldólica repetida dando lugar a polímeros pardos macromoleculares de elevado peso molecular. Estos polímeros son inestables y pueden generar nuevos compuestos volátiles por escisión de las macromoléculas, o deshidratación. Se producen así cambios en el color, *flavor*, propiedades físicas y funcionales (solubilidad, propiedades emulsificantes y reológicas) y una disminución del valor nutricional (Zamora e Hidalgo, 2001). La reacción de los productos de oxidación lipídica con aminas, aminoácidos y proteínas se relaciona desde hace tiempo con el pardeamiento observado en muchos alimentos durante el procesado y almacenamiento (Pokorný *et al.*, 1976; El-Zeany y Fattah, 1982; Hidalgo *et al.*, 1992; Fischer y Widder, 1997; Belitz y Grosch, 1999; Zamora e Hidalgo, 2005).

Además, los aldehídos, formados por peroxidación lipídica, junto con epoxialquenos, pueden reaccionar con aminas, aminoácidos y proteínas dando lugar a hidroxialquilpirroles *N*-sustituídos y a pirroles *N*-sustituídos. Estos compuestos polimerizan de forma espontánea dando dímeros, trímeros, tetrámeros y polímeros de mayor tamaño, pardos con fluorescencia característica (Hidalgo y Zamora, 1993).

Por la acción del oxígeno atmosférico, los aldehídos pueden también degradarse por oxidación siendo los correspondientes AG los productos mayoritarios de su oxidación. Así, pentanal, hexanal y

heptanal pueden oxidarse, respectivamente, a ácido pentanoico, hexanoico y heptanoico (Michalsky y Hammond, 1972; Frankel, 1982; Pokorný *et al.*, 1985). Además, los aldehídos saturados pueden oxidarse dando una multitud de aldehídos de cadena corta y dialdehídos. Los aldehídos insaturados pueden a su vez oxidarse por ataque del oxígeno a la posición α -metilénica formando compuestos volátiles (dímeros, polímeros, hidroperoxiepóxidos, hidroperoxiepidióxidos y dihidroperóxidos), los cuales se descomponen del mismo modo que los monohidroperóxidos dando compuestos volátiles similares (hidrocarburos de cadena corta, aldehídos y dialdehídos, como por ejemplo el MDA) según se muestra en la figura nº 3 (Frankel, 1982; Frankel, 1991).

Las reacciones mencionadas son muy dependientes de la temperatura, por lo que incrementos de ésta reducen los contenidos de aldehídos volátiles, ya que se favorece su reacción y desaparecen del medio.

Como consecuencia del proceso de oxidación se produce el enranciamiento, factor decisivo en la determinación de la vida útil de los alimentos, se observan cambios en la palatabilidad (generación de sabores desagradables), en la funcionalidad y en el valor nutritivo (pérdida de nutrientes esenciales como las vitaminas liposolubles A y E, y AGE) (Shantha y Decker, 1993; Frankel, 1993b) y cambios en la textura y color de los alimentos (por oxidación de compuestos coloreados o por pardeamiento no enzimático) (Pokorny *et al.*, 1987; Hidalgo y Zamora, 2000). Las reacciones oxidativas afectan a los lípidos y a las proteínas y, como resultado, se altera la calidad de los alimentos.

Por otro lado, se ha demostrado que compuestos pardos productos de la RM, pueden reducir la oxidación de los lípidos (Ames, 2001), debido a su potente actividad antioxidante que enlentece el proceso de peroxidación lipídica (Alaiz *et al.*, 1997; Zamora *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 1998; Hidalgo *et al.*, 2001b).

Efectos adicionales de los productos de oxidación lipídica son los tóxicos (ver apartado E.1.7).

E.1.6. Factores que afectan a la oxidación de los ácidos grasos

Los factores que influyen en la oxidación lipídica se pueden clasificar en intrínsecos y extrínsecos.

a). Factores intrínsecos

a.1) Contenido y estructura de los AGI

Los contenidos de AGI constituyen un factor clave en la oxidación del alimento, ya que son el sustrato susceptible de sufrirla. También se ha de considerar la estructura de los mismos pues el número, la posición y la geometría de los dobles enlaces afectan al grado de oxidación y al perfil de productos de oxidación que se puedan obtener. Así, los AG *cis* se oxidan más fácilmente que sus isómeros *trans*, y los dobles enlaces conjugados son más reactivos que los no conjugados. La autooxidación de los AGS es muy lenta; a temperatura ambiente prácticamente no se oxidan, sin embargo, a elevada temperatura los AGS pueden sufrir un elevado grado de oxidación.

a.2) Actividad del agua (a_w)

El enranciamiento se produce más rápidamente a niveles de a_w muy altos (> 0.5), o muy bajos (< 0.2) (Labuza, 1971). La oxidación aumenta, a a_w muy altas, a través de los metales de transición y por reacciones de oxidación enzimática (por la lipooxigenasa), que se favorecen a a_w elevadas. Por otra parte, la eliminación del agua crea canales que favorecen la migración del oxígeno y la ruptura de los glóbulos de grasa, generando así una mayor superficie de contacto con el medio (Berset y Cuvelier, 1996).

a.3) Contenido de prooxidantes

Como metales de transición (cobalto, cobre, hierro, manganeso y níquel), enzimas (como lipo-oxigenasas y ascórbico-oxidasa) y sistemas prooxidantes (como el sistema ascórbico-hierro y ascórbico-cobre) (Bondet *et al.*, 2000). Los metales de transición aceleran las reacciones de oxidación mediante la abstracción de un radical hidrógeno y la descomposición de peróxidos, dando lugar a la formación de radicales libres (Frankel, 1998). Es importante mantener la integridad celular de los alimentos, pues al destruirla se liberan sustancias prooxidantes (ascórbico oxidasa, lipoxigenasas, hierro ferroso de los grupos hemos, etc.) y se produce una mayor exposición de los lípidos al oxígeno atmosférico, con lo que se incrementa la susceptibilidad a la oxidación (Berk, 1976). Por otro lado, los alimentos pueden contener quelantes de los metales de transición, con grupos carboxílicos (EDTA y ácido cítrico) o fosfato (polifosfatos y fitatos); sin embargo, no todos los quelantes inhiben la oxidación (Decker, 1998).

a.4) Estructura del alimento

En sistemas con una alta relación superficie/volumen, los AG se oxidan rápidamente, casi con independencia de la presión de oxígeno (Berk, 1976). Los lípidos dispersos en la matriz formada por poliósidos y proteínas son fácilmente oxidables. La creación de interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de los AG y las hélices de amilasa (Rao y Artz, 1989) o la encapsulación de los lípidos por proteínas, gliadina del trigo o zeína de maíz, ralentizan las oxidaciones (Iwami *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1991a y b). En la carne y el pescado, una fracción importante de la materia grasa está en forma de fosfolípidos componentes de las estructuras de las membranas; la estabilidad de los AG está directamente relacionada con la integridad de estas membranas (Berset y Cuvelier, 1996).

a.5) Heterogenicidad química de la fase lipídica

Los lípidos de los alimentos son mezclas de TG, monoglicéridos y diglicéridos, AG libres, glicolípidos, fosfolípidos, esteroides, tocoferoles, vitaminas y pigmentos. Los fosfolípidos de membrana de productos animales son más susceptibles a la oxidación por los tratamientos tecnológicos, que otras fracciones lipídicas (Berset y Cuvelier, 1996).

a.6) Presencia de secuestradores de radicales libres

Estos compuestos pueden ayudar a controlar la oxidación. Los grupos hidroxilo asociados a compuestos fenólicos (por ejemplo: tocoferoles, catequinas, ubiquinona, butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), etc) son los secuestrantes de radicales libres más usuales en los alimentos (Decker, 1998).

a.7) Presencia de antioxidantes

Disminuye el grado de oxidación de las sustancias susceptibles a la misma. Los principales antioxidantes lipídicos que se utilizan en los alimentos son fenoles mono o polihidroxílicos con varios sustituyentes en el anillo.

b). Factores extrínsecos

b.1) Temperatura

Puede influir tanto a nivel del tratamiento tecnológico como durante el almacenamiento. Por su relación con la energía de activación, la autooxidación es directamente proporcional a la temperatura (Nawar, 1996).

b.2) Concentración de oxígeno (presión parcial de oxígeno)

Cuando el oxígeno es abundante, la oxidación es independiente de su concentración, pero inversamente, cuando la concentración de oxígeno es baja, el grado de oxidación es aproximadamente proporcional a ésta. Sin embargo, en el efecto de la concentración de oxígeno en el grado de oxidación influyen otros factores como la temperatura y el área de la superficie (Fennema, 1996).

b.3) Oxígeno singlete

Es un estado excitado del oxígeno que puede interaccionar con los AGI para formar peróxidos lipídicos. Pero, puede inactivarse vía química (a través de reacciones con compuestos insaturados, tales como carotenoides, tocoferoles, aminoácidos, péptidos, proteínas, compuestos fenólicos y ascorbato) (Dahl *et al.*, 1988; Bradley y Min, 1992) y vía física por bloqueo (inactivación por carotenoides debido a la transferencia de energía del oxígeno singlete al carotenoide, esta

energía la libera posteriormente el carotenoide mediante interacciones vibracionales o rotacionales con el entorno, volviendo así a su estado elemental) (Decker, 1998).

b.4) Procesos de manipulación del alimento

Pueden afectar a su susceptibilidad frente a la oxidación. Por ejemplo, durante el refinado de los aceites se produce una pérdida importante de sus sistemas antioxidantes. La leche y derivados lácteos congelados son más susceptibles a la oxidación que los refrigerados (Weihrauch, 1988).

b.5) La luz visible (VIS), radiación ultravioleta (UV) y la radiación gamma (γ)

Son promotoras eficaces de la oxidación (Fennema, 1996). La radiación UV suele tener un efecto activador tanto de sustancias prooxidantes (riboflavina) como del sustrato oxidable (dobles enlaces, en especial si están conjugados). El envasado en atmósfera inerte y con protección frente a la luz permite reducir la peroxidación lipídica en un 85-90% en carnes esterilizadas (Gütensperges y Escher, 1994) o en yema de huevo en polvo, donde se evita la oxidación, en especial, del AA y DHA (Guardiola *et al.*, 1995a).

E.1.7. Implicación nutricional y sanitaria de la oxidación de los ácidos grasos

Los efectos biológicos negativos de los lípidos oxidados son el resultado del desequilibrio entre el grado de oxidación de las grasas ingeridas y la capacidad del sistema de defensa antioxidante (Kubow, 1990). Pueden evitarse o paliarse con un aporte adecuado de vitaminas antioxidantes (Fennema, 1993), pero los sistemas de

protección antioxidante pueden resultar insuficientes para neutralizar los radicales libres generados en los procesos fisiológicos y ambientales, y el resultado es la aparición de diversos compuestos que se han relacionado con la patogenia de ciertas enfermedades, tales como el cáncer, la artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias, las cataratas, la diabetes, las enfermedades renales, la pancreatitis, la esclerosis múltiple, el Parkinson, disfunciones pulmonares, reacciones con fármacos, o lesiones dérmicas. Además, se ha demostrado que pueden acelerar las tres fases de la aterosclerosis: iniciación-daño endotelial, progresión-acumulación de placa, y terminación-trombosis (Namiki, 1990; Kubow, 1990; Jacob, 1995).

Los centros diana de los radicales libres, especies muy inestables y reactivas, son, básicamente, algunos componentes intra y extracelulares de indiscutible importancia vital, como las proteínas, los glúcidos, los lípidos, las enzimas, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) (Addis, 1986; Kanazawa *et al.*, 2000), siendo la oxidación de los AGI el proceso oxidativo más usual en nuestro organismo (Halliwell, 1997), sobre todo los AGPI de las membranas biológicas, por su abundancia, disponibilidad y afinidad.

La interacción de los radicales libres de oxígeno con los átomos de carbono de los dobles enlaces y la posterior abstracción de un radical hidrógeno, ya mencionada, provoca la desestabilización de la estructura fosfolipídica, dando lugar a una serie de derivados peroxidados (peróxidos e hidroperóxidos lipídicos). Estos son el origen de compuestos de degradación muy citotóxicos, mutágenos y capaces de lesionar otras estructuras lipídicas alejadas del foco inicial.

Estos compuestos son similares, en cuanto a su naturaleza química se refiere, a los productos del enranciamiento lipídico en los alimentos.

Los derivados peroxidados son capaces de oxidar otros compuestos como, por ejemplo, las proteínas y los ácidos nucleicos.

La oxidación de los AGPI de los fosfolípidos de las membranas celulares, también puede dar lugar a especies reactivas del oxígeno ($\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, $\text{ROO}\cdot$, etc). Su formación podría ser el origen de una compleja secuencia de especies reactivas, que de forma similar a las correspondientes a la autoxidación, fotoxidación y catálisis por lipogenasas de los alimentos, pueden ser tóxicas y hallarse implicadas en la patogenia de determinados procesos degenerativos, como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. En este caso se habla de biodegradación oxidativa del organismo (de la Torre y López, 1997).

Productos de bajo peso molecular, procedentes de la descomposición de peróxidos de AG, se absorben en el tracto gastrointestinal, pasan al sistema circulatorio y se incorporan al hígado o tienen acceso a otros tejidos del organismo. El MDA, al ser un aldehído bifuncional, es un compuesto muy reactivo en reacciones de entrecruzamiento (*cross-linking*) con ADN y proteínas (Addis, 1986; Kubow, 1990).

En los alimentos el MDA se halla a menudo en forma de *N*- ϵ -(2-propenal)lisina (ϵ PL), producto de la reacción entre el MDA libre y los grupos ϵ -amino de las proteínas, principalmente de la lisina. En el transcurso de la digestión el MDA se libera y, una vez en los tejidos, reacciona con la lisina para formar de nuevo el ϵ PL (Mahmoodi *et al.*, 1995). El MDA es mutagénico y carcinogénico por su capacidad de formar aductos con el ADN (Shamberger *et al.*, 1974; Basu y Marnett, 1984; Burcham, 1998; Marnett, 1999 y 2000), puede actuar como catalizador de la síntesis de *N*-nitrosaminas, y participa en otros procesos patológicos, tales como la formación de pigmentos fluorescentes de lipofuscina típicos del envejecimiento celular (Bidlack y Tappel, 1973; Trombly y Tappel, 1975; Pearson, 1983).

Se dispone de numerosas pruebas de que las enfermedades relacionadas con los radicales libres, se pueden prevenir o hasta cierto punto retardar con una dieta adecuada, con disminución de la ingesta de grasa y aumento del consumo de frutas, cereales y verduras. Dado que la eficacia de las defensas endógenas no es del 100%, parece razonable señalar la importancia de los antioxidantes dietéticos en la reducción de los efectos acumulativos del daño oxidativo a lo largo de la vida humana, hecho que justifica algunos de los efectos beneficiosos derivados del consumo de frutas, cereales y hortalizas (Halliwell, 1996; Johnson, 2001; Virgili *et al.*, 2001). Los productos de peroxidación lipídica pueden representar graves y serios problemas para la salud humana, por lo que sería conveniente un control adecuado de la calidad de los alimentos que ingerimos, especialmente en el caso de las grasas.

E.2. ESTEROLES

Los esteroides son compuestos insaturados (alcoholes esteroídicos), y por tanto susceptibles a la oxidación. Los óxidos de esteroides se incluyen entre los compuestos mutágenos procedentes de alimentos sometidos a tratamiento térmico, junto con la acrilamida, aminas heterocíclicas, nitrosaminas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Jägerstad y Skog, 2005).

Los esteroides se oxidan de forma similar a los AGI, por un mecanismo de radicales libres, que puede iniciarse por: calentamiento, incidencia de luz, presencia de aire, agua y/o de metales de transición (Smith, 1981; Dutta *et al.*, 1996); así, se obtienen productos de oxidación del colesterol (*cholesterol oxidation products*, COP) y de los fitosteroides (*phytosterol oxidation products*,

POP), que en conjunto se denominan productos de oxidación de los esteroides (*sterol oxidation products, SOP*).

Los fitosteroides se han estudiado con mayor detalle, probablemente debido a su presencia en alimentos enriquecidos con los mismos, su creciente demanda en el mercado y la tendencia actual a consumir grasas vegetales frente a las de origen animal; en cualquier caso, los alimentos ricos en fitosteroides deberían controlarse por su potencial contribución como factores de riesgo dietéticos asociado al consumo de compuestos oxidados (Wasowicz, 2003).

Debido a la similitud de sus estructuras (ver figura nº 2, apartado D.4) los mecanismos de oxidación del colesterol son aplicables a los fitosteroides (Smith, 1981; Dutta y Savage, 2002; Dutta, 2004).

Aunque los esteroides pueden sufrir oxidación, en estado puro son bastante estables a temperaturas ≤ 100 °C. Sin embargo, tratamientos a mayor temperatura facilitan la oxidación de esteroides (Osada *et al.*, 1993).

La presencia de distintas especies de oxígeno como: oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), ozono (O_3), hidroperóxidos (H_2O_2), catión dioxígeno (O_2^+) y radical hidroxilo (HO^\cdot), y las reacciones enzimáticas (Smith, 1992; Dutta *et al.*, 1996) favorecen la oxidación.

E.2.1. Autoxidación

El triplete de oxígeno ($^3\text{O}_2$) es la especie de oxígeno más comúnmente implicada en la oxidación de los esteroides, siendo la autoxidación el mecanismo de oxidación más frecuente (Porter *et al.*, 1995).

El proceso (ver figura nº 6) comienza con la eliminación de un hidrógeno alílico reactivo en el carbono 7 (C-7), debido al efecto activador de un doble enlace entre los C-5 y C-6 (Smith, 1987). El radical libre formado reacciona con $^3\text{O}_2$ para dar el radical 7-peroxi (Dutta, 2004). Como iniciadores de esta reacción se señalan especies activas del oxígeno, metales y temperaturas elevadas (Labuza, 1971; Dutta *et al.*, 1996). La adición de hidrógeno a este radical, durante el almacenamiento y/o calentamiento, da lugar al 7-hidroperóxido y, tras su degradación, a los 7α -hidroxiesteros, 7β -hidroxiesteros y 7-cetoesteros (Yanishlieva *et al.*, 1983; Smith, 1987; Smith, 1996; Lercker y Rodríguez-Estrada, 2002). Los 7β -hidroxiesteros son más estables termodinámicamente que los 7α -hidroxiderivados (Smith, 1981).

La oxidación en otras posiciones de la molécula, como C-4, no suele darse debido a un posible efecto escudo (*shielding effect*) de los carbonos adyacentes (C-3 con grupo hidroxilo y C-5 triarquil-sustituido) (Maerker, 1987).

Otros productos mayoritarios resultantes de la oxidación del anillo son los epóxidos y trioles. La formación de epóxidos por autooxidación ocurre mediante un mecanismo bimolecular que incluye un radical hidroperóxido y un estero intacto, dando lugar al α - y β -epóxido (ver figura nº 6), al no derivar de hidroperóxidos se considera una vía indirecta de formación de SOP (Smith, 1987; Bortolomeazzi *et al.*, 1999; Lampi *et al.*, 2002; Lercker y Rodríguez-Estrada, 2002; Grandgirard *et al.*, 2004a). En muchos estudios, el $5\beta,6\beta$ -epoxisterol ha prevalecido sobre el $5\alpha,6\alpha$ -epoxisterol, lo que puede ser debido al impedimento estérico del grupo hidroxilo en C-3 (Lercker y Rodríguez-Estrada, 2002).

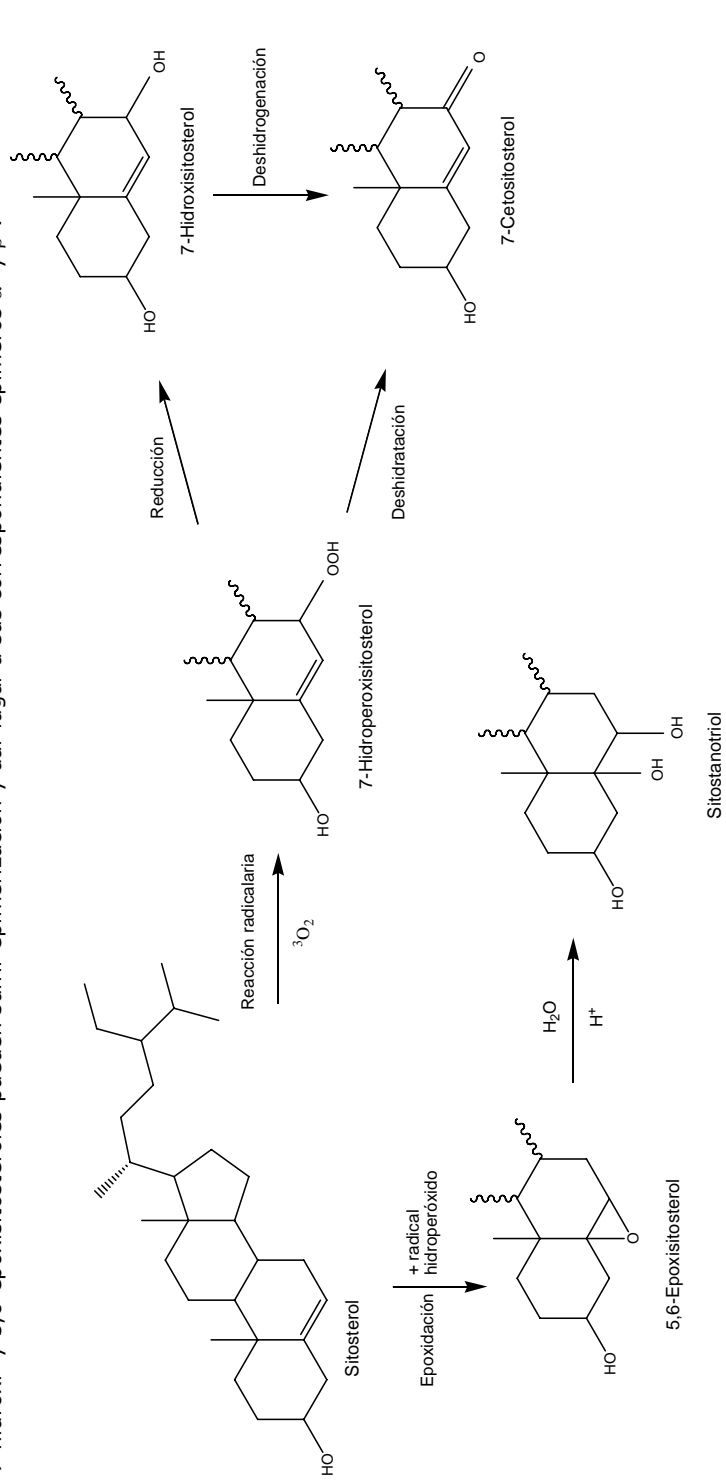
Sin embargo, la autooxidación a elevadas temperaturas no genera trioles, éstos se forman tras la hidratación de los epóxidos en

un medio ácido (ver figura nº 6) (Smith, 1981; Maerker, 1987). Es interesante resaltar que la hidratación de cualquier epímero de estos epóxidos da lugar a la formación del mismo triol; sin embargo, el impedimento estérico que sufre el C-5 por un grupo metilo en C-19 produce, probablemente, una menor velocidad de hidratación del $5\alpha,6\alpha$ -epoxisterol (Maerker, 1987), por ello el $5\alpha,6\alpha$ -epoxisterol es más estable termodinámicamente (Smith, 1981).

Otra posible formación de SOP es por oxidación de la cadena lateral de los esteroides, aunque esta oxidación es menos pronunciada que la del anillo de la molécula (Smith, 1992). En ambos casos, el mecanismo de oxidación es el mismo e incluye la formación de hidroperóxidos que generan productos secundarios de oxidación.

Debido a la naturaleza ternaria de los C-24 y C-25 de los fitosteroides, éstos son los sitios más favorables para la formación de los hidroperóxidos (Yanishlieva *et al.*, 1980; Smith, 1992; Johnsson y Dutta, 2003; Johnsson *et al.*, 2003). En un estudio de oxidación del colesterol, se han detectado 20-hidroxicolesterol y 26-hidroxicolesterol (Smith, 1987). Aunque es posible la formación de productos de oxidación en la cadena lateral, los estudios al respecto son escasos (Dutta, 2004).

Figura nº 6. Oxidación de los esteroides. Esquema de reacción de la formación de óxidos de esteroides por autooxidación. 7-Hidroperoxi-, 7-hidroxi- y 5,6-epoxisitosteroides pueden sufrir epimerización y dar lugar a sus correspondientes epímeros α - y β -.



E.2.2. Fotoxidación

La oxidación de los esteroides puede iniciarse por un estado excitado del oxígeno, que se conoce como oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$); este mecanismo de oxidación no radicalario recibe el nombre de fotoxidación.

El $^1\text{O}_2$ tiene en los orbitales externos dos electrones desapareados con spin opuesto, que provocan una fuerte repulsión electrostática (Frankel, 1998). El $^1\text{O}_2$ es unas 1500 veces más reactivo que el $^3\text{O}_2$ y puede producir un ataque electrofílico en el esteroide a cualquiera de los lados del doble enlace (Kulig y Smith, 1973; Dutta, 2004).

El oxígeno singlete puede generarse de varias formas; el mecanismo más importante se produce cuando fotosensibilizadores como la clorofila o la riboflavina, absorben luz y quedan excitados electrónicamente. En este estado, interaccionan con el oxígeno triplete y generan oxígeno singlete (Frankel, 1998; Säynäjoki *et al.*, 2003).

Debido a la elevada energía del oxígeno singlete, los productos resultantes de la fotoxidación difieren de los formados en la autoxidación. En la fotoxidación, el hidroperóxido primario que se forma es el 5α -hidroperóxido (ver figura nº 7) (Yanishlieva *et al.*, 1980; Smith, 1992; Bortolomeazzi *et al.*, 1999), aunque recientemente se ha observado la formación de hidroperóxidos en los C-6 y C-7 durante la fotoxidación y por degradación de 5 -hidroperóxidos (Säynäjoki *et al.*, 2003).

Como se ha mencionado anteriormente, los hidroperóxidos son moléculas de elevada energía y tienden a generar productos secundarios de oxidación más estables tales como 7 -hidroxiesteroides y

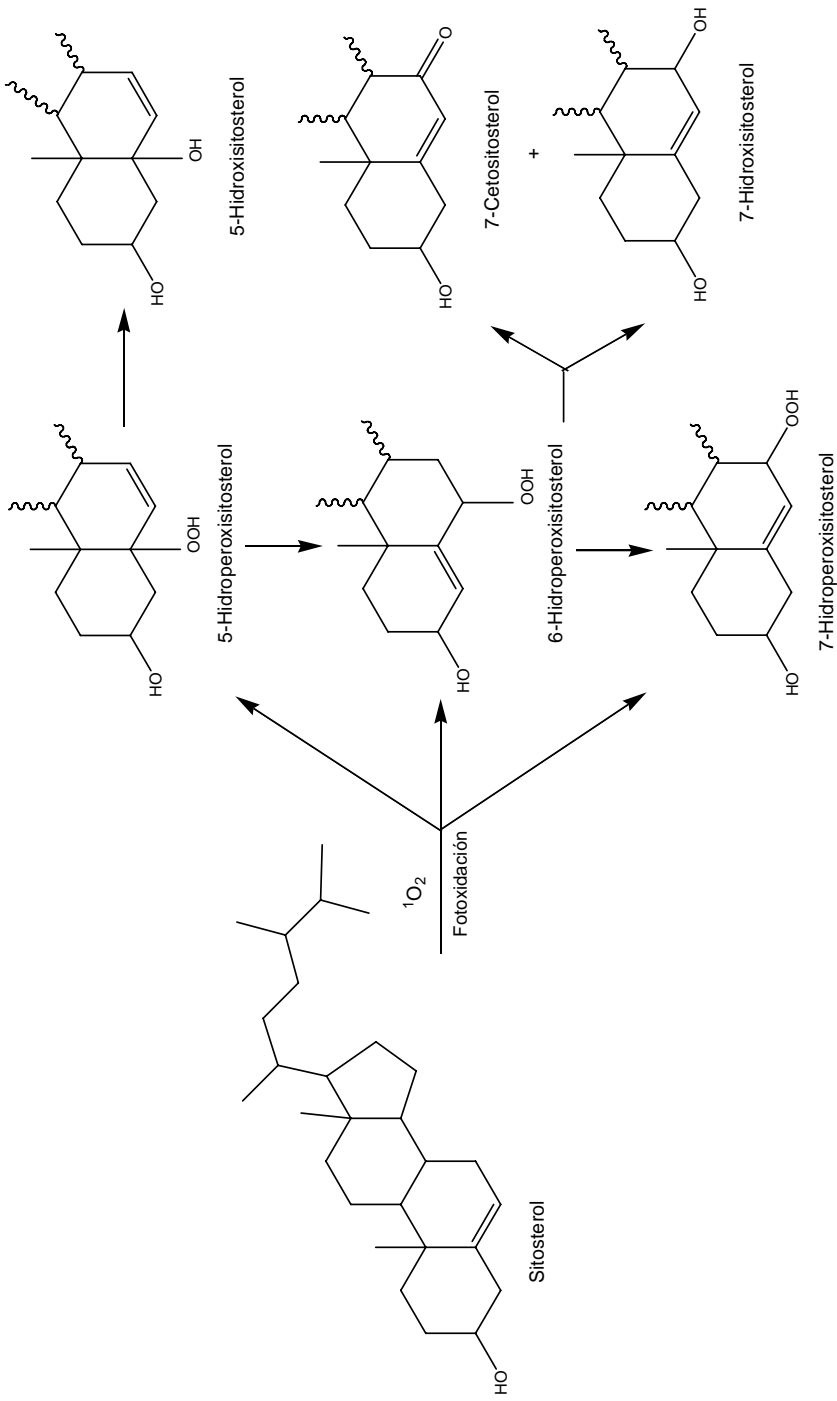
7-cetoesteroides. No obstante, la información disponible relativa a la fotooxidación de los fitosteroides es limitada (Säynäjoki *et al.*, 2003).

E.2.3. Oxidación enzimática

Las principales enzimas implicadas en la oxidación de los esteroides son las monooxigenasas, dioxigenasas, dehidrogenasas y oxidasas. Algunos productos resultantes de la oxidación enzimática del colesterol, como el 7 α -hidroxicolesterol, el 25-hidroxicolesterol y el 26-hidroxicolesterol, son intermediarios en la síntesis de ácidos biliares, mientras que otros, como el 22-hidroxicolesterol, están relacionados en la biosíntesis de hormonas esteroideas (Smith, 1992).

Se ha identificado un elevado número de SOP, los más usuales se indican en el cuadro nº 3.

62 **Figura nº 7.** Oxidación de los esteroides. Esquema de reacción de la formación de óxidos de esteroides por fotooxidación. 7-Hidroxisitosterol puede sufrir epimerización y dar lugar a sus correspondientes epímeros α - y β -.



Cuadro n° 3. Oxidación de los esteroides. Nombres comunes y sistemáticos del brassicasterol, estigmasterol, campesterol, β -sitosterol y colesterol y sus principales productos de oxidación.

Nombre común	Nombre sistemático
Brassicasterol	(24S)-Metilcolest-5,22-dien-3β-ol
7 α -Hidroxibrassicasterol	(24S)-Metilcolest-5,22-dien-3 β ,7 α -diol
7 β -Hidroxibrassicasterol	(24S)-Metilcolest-5,22-dien-3 β ,7 β -diol
7-Cetobrassicasterol	(24S)-Metilcolest-5,22-dien-3 β -ol-7-ona
5 α ,6 α -Epoxibrassicasterol	(24S)-5 α ,6 α -Epoxy-24-metilcolest-22-en-3 β -ol
5 β ,6 β -Epoxibrassicasterol	(24S)-5 β ,6 β -Epoxy-24-metilcolest-22-en-3 β -ol
Brassicastanol	(24S)-Metilcolest-22-en-3 β ,5 α ,6 β -triol
Estigmasterol	(24S)-Etilcolest-5,22-dien-3β-ol
7 α -Hidroxiestigmasterol	(24S)-Etilcolest-5,22-dien-3 β ,7 α -diol
7 β -Hidroxiestigmasterol	(24S)-Etilcolest-5,22-dien-3 β ,7 β -diol
7-Cetoestigmasterol	(24S)-Etilcolest-5,22-dien-3 β -ol-7-ona
5 α ,6 α -Epoxiestigmasterol	(24S)-5 α ,6 α -Epoxy-24-etilcolest-22-en-3 β -ol
5 β ,6 β -Epoxiestigmasterol	(24S)-5 β ,6 β -Epoxy-24-etilcolest-22-en-3 β -ol
Estigmastanol	(24S)-Etilcolest-22-en-3 β ,5 α ,6 β -triol
Campesterol	(24R)-Metilcolest-5-en-3β-ol
7 α -Hidroxicampesterol	(24R)-Metilcolest-5-en-3 β ,7 α -diol
7 β -Hidroxicampesterol	(24R)-Metilcolest-5-en-3 β ,7 β -diol
7-Cetocampesterol	(24R)-Metilcolest-5-en-3 β -ol-7-ona
5 α ,6 α -Epoxicampesterol	(24R)-5 α ,6 α -Epoxy-24-metilcolest-22-en-3 β -ol
5 β ,6 β -Epoxicampesterol	(24R)-5 β ,6 β -Epoxy-24-metilcolest-22-en-3 β -ol
Campestanol	(24R)-Metilcolest-22-en-3 β ,5 α ,6 β -triol
β-Sitosterol	(24R)-Etilcolest-5-en-3β-ol
7 α -Hidroxisitosterol	(24R)-Etilcolest-5-en-3 β ,7 α -diol
7 β -Hidroxisitosterol	(24R)-Etilcolest-5-en-3 β ,7 β -diol
7-Cetositosterol	(24R)-Etilcolest-5-en-3 β -ol-7-ona
5 α ,6 α -Epoxisitosterol	(24R)-5 α ,6 α -Epoxy-24-etilcolest-22-en-3 β -ol
5 β ,6 β -Epoxisitosterol	(24R)-5 β ,6 β -Epoxy-24-etilcolest-22-en-3 β -ol
Sitostanol	(24R)-Etilcolest-22-en-3 β ,5 α ,6 β -triol
Colesterol	Colest-5-en-3β-ol
7 α -Hidroxicolesterol	Colest-5-en-3 β ,7 α -diol
7 β -Hidroxicolesterol	Colest-5-en-3 β ,7 β -diol
7-Cetocolesterol	3 β -Hydroxycholest-5-en-7-ona
5 α ,6 α -Epoxicolesterol	5,6 α -Epoxy-5 α -colest-22-en-3 β -ol
5 β ,6 β -Epoxicolesterol	5,6 β -Epoxy-5 β -colest-22-en-3 β -ol
Colestanol	5 α -Colest-22-en-3 β ,5 α ,6 β -triol

E.2.4. Implicación nutricional y sanitaria de la oxidación de los esteroides

a). Óxidos de colesterol

Los COP tienen, a través de variados mecanismos, efectos citotóxicos, carcinogénicos, mutagénicos, aterogénicos y algunos de ellos pueden inhibir la biosíntesis del colesterol y funciones de la membrana (Bösinger *et al.*, 1993; Guardiola *et al.*, 1996; Schroepfer, 2000; García-Cruset *et al.*, 2002; Leonarduzzi *et al.*, 2002; Osada, 2002).

Los seres humanos absorben del 30 al 60% del colesterol total de la dieta y sólo se oxida un pequeño porcentaje (Li *et al.*, 1998; Bosner *et al.*, 1999).

a.1) Aterogenicidad

El principal riesgo tóxico de los COP está relacionado con la aterosclerosis. Existen numerosos estudios que demuestran que los COP están asociados a un posible desarrollo de la enfermedad aterogénica. Se cree que el proceso de aterosclerosis se inicia por un daño en la arteria que modifica la función de barrera del endotelio vascular, aumentando la permeabilidad de los componentes del plasma, entre ellos las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las plaquetas. Las LDL acumuladas en la pared arterial se oxidan y son degradadas por células musculares lisas y macrófagos; éstos se transforman entonces en células espumosas. El colesterol procedente de las LDL se almacena en y entre las células espumosas (Babiker *et al.*, 1997). Se produce así una acumulación de colesterol y de sus ésteres, proliferación celular, síntesis de colágeno y elastina y

depósitos de calcio que dan lugar a la formación de placas de ateroma.

La identificación de los agentes que pueden modificar la función del endotelio como barrera es uno de los puntos más controvertidos en este proceso. Estos agentes pueden ser tanto químicos como mecánicos, y entre ellos destacan: virus, factores hemodinámicos (como hipertensión), nicotina, radicales libres formados por fumar tabaco, toxinas bacterianas, lipasas, proteasas, quininas, histaminas y los lípidos oxidados, incluyendo los COP (Hubbard *et al.*, 1989; Berliner y Heinecke, 1996; Gimbrone, 1999; Ross, 1999; Erridge *et al.*, 2007).

Según se ha mencionado anteriormente, tanto los COP como las LDL oxidadas que los contienen (LDL-COP), pueden participar en el desarrollo temprano de la lesión aterosclerótica mediante la modificación de la función barrera del endotelio y la transformación de los macrófagos en células espumosas. Además, los COP y las LDL-COP pueden ejercer un papel en estadios intermedios y avanzados de la lesión aterosclerótica por la inducción de la muerte celular mediante apoptosis y necrosis. Así, en un estudio de Leonarduzzi *et al.* (2001) se sugiere una relación entre algunos COP y procesos característicos de fases avanzadas de la aterogénesis como la apoptosis y la fibrogénesis. Además, se ha señalado un posible mecanismo de calcificación de las células vasculares en lesiones ateroscleróticas avanzadas (Watson *et al.*, 1994). Por otro lado, así como el 7α -hidroxicolesterol se forma en el hígado por la enzima colesterol- 7α -hidroxilasa como parte de la síntesis normal de la bilis, el 7β -hidroxicolesterol se admite que tiene un origen autoxidativo, por lo que sus niveles en plasma se pueden considerar como un indicador de la peroxidación lipídica *in vivo* (Salonen *et al.*, 1997; Zieden *et al.*, 1999).

a.2) Efectos sobre la permeabilidad vascular y la estructura y funcionalidad de las membranas

El endotelio vascular actúa como una barrera, mostrando una permeabilidad selectiva a los distintos componentes del plasma. En estudios *in vitro* se ha demostrado que la transferencia de albúmina a través de células vasculares del endotelio aumenta por la presencia de COP (Hennig y Boissonneault, 1987; Boissonneault *et al.*, 1991a, 1991b). Esto podría explicar el hecho de que contenidos plasmáticos elevados de LDL sean un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad coronaria, porque las LDL-COP pueden modificar la selectividad de la barrera vascular del endotelio, aumentando así la penetración de diferentes componentes del plasma, incluidas las LDL, en la pared vascular.

Esta disfunción del endotelio podría ser resultado de la alteración de las características de la membrana (fluidez, permeabilidad y estabilidad, así como viabilidad, morfología y crecimiento celular), incluyendo también cambios en la actividad de ciertas enzimas unidas a la membrana (Ramasamy *et al.*, 1992). De hecho, en estudios realizados *in vitro* se ha visto que los COP pueden incorporarse a las membranas donde sustituyen al colesterol y provocan cambios en la modulación de la función y estructura de la membrana (Theunissen *et al.*, 1986; Crastes de Paulet *et al.*, 1988; Guardiola *et al.*, 1996).

Smith (1990b) postuló tres posibles orígenes de los COP hallados en las membranas biológicas: oxidación *in situ* del colesterol de las membranas, incorporación de COP generados por oxidación intracelular del colesterol, y absorción de los COP procedentes de la sangre o fluidos extracelulares.

a.3) Efectos sobre la síntesis de prostaglandinas, agregación plaquetaria y reactividad vascular

La prostaciclina I₂ (PGI₂) se sintetiza básicamente en las células endoteliales y es esencial para la integridad vascular (Weksler *et al.*, 1977). Una disminución en la síntesis de PGI₂ favorece la agregación plaquetaria y la contracción de la pared arterial. Peng *et al.* (1983) y Hu *et al.* (1990) observaron, en cultivos celulares, que el colestanoetriol y 25-hidroxicolesterol reducían la biosíntesis de prostaglandinas. En otros estudios (Peng *et al.*, 1993; Ross, 1999) se observa que la reducción de la síntesis de PGI₂ en células endoteliales inducida por COP, favorecía la adherencia de las plaquetas a estas células, lo que puede favorecer el desarrollo de los estadios iniciales de la lesión aterosclerótica. Sin embargo, en otro estudio (Martinez-Sales *et al.*, 1985) se observó un ligero aumento de PGI₂ en las aortas de ratas alimentadas con una dieta alta en COP.

a.4) Citotoxicidad

Aunque no se conoce totalmente el mecanismo de acción citotóxica de los COP, se ha atribuido a sus acciones sobre la modulación del crecimiento celular, la viabilidad de las células, el transporte de moléculas de pequeño tamaño, así como la actuación sobre enzimas celulares y la síntesis de ADN.

Es sabido que algunos COP son tóxicos para las células aórticas de animales y seres humanos. Este efecto *in vitro* se relaciona de forma directa con el efecto aterogénico de los COP y, de hecho, algunos COP son capaces de inducir la formación de lesiones ateroscleróticas *in vivo* (Peng *et al.*, 1977; Taylor y Peng, 1985; Naseem y Heald, 1987; Guyton *et al.*, 1990). Además, otros autores sugieren que los COP pueden ser los lípidos oxidados principalmente responsables de la toxicidad inducida de las LDL oxidadas para las

células vasculares (Sevanian *et al.*, 1995; Colles *et al.*, 1996). Aunque se requiere un estudio más profundo de los agentes que inducen muerte celular en la pared vascular y sus mecanismos de acción, se sugiere que en este proceso complejo las LDL oxidadas, y sus componentes, juegan un papel crítico (Luc y Fruchart, 1991; Witztum y Steinberg, 1991; Jialal y Devaraj, 1996; Berliner y Heinecke, 1996; Salonen *et al.*, 1997; Steffen *et al.*, 2006).

Algunos COP pueden estar relacionados en la muerte celular por apoptosis, lo cual puede asociarse a que las LDL oxidadas inducen en cultivos celulares de musculatura lisa, macrófagos, células endoteliales y células linfoides cambios morfológicos y la fragmentación característica del ADN durante la apoptosis (Wyllie, 1981; Orrenius *et al.*, 1989; Hardwick *et al.*, 1996; Escargueil-Blanc *et al.*, 1997; Dimmeler *et al.*, 1997). Recientemente, se ha demostrado la toxicidad *in vivo* debido a la liberación de citocromo c al citosol y apoptosis, por parte de los COP procedentes de la dieta frente a las células vasculares, sobre todo por la acumulación de colestanoetriol en ellas y por la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis (Meynier *et al.*, 2005; Leonarduzzi *et al.*, 2007).

a.5) Efectos sobre los receptores de LDL

El colesterol exógeno llega a la mayoría de las células por captación de las LDL por los receptores de LDL (LDLr). Tras su unión a receptores de membrana específicos, las LDL se incorporan y son degradadas por células como fibroblastos, células de la musculatura lisa, células endoteliales, y células linfoides (Goldstein y Brown, 1977). La disminución o modificación de la función de los LDLr produce hipercolesterolemia, una mayor acumulación de colesterol en los macrófagos, y predisposición al desarrollo de aterosclerosis (Goldstein *et al.*, 1983).

En varios estudios (Brown y Goldstein, 1975; Lorenzo *et al.*, 1987) se ha visto que algunos COP pueden inhibir de forma específica la unión, captación, y degradación de las LDL en fibroblastos humanos. El mecanismo más aceptado para explicar este efecto es la disminución de LDLr, ejercida por la modulación de los COP sobre la transcripción génica de los LDLr (Schroepfer, 2000).

a.6) Efectos sobre el metabolismo del colesterol

Los COP influyen en la actividad de varias enzimas específicas del metabolismo del colesterol, como la 3-hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), implicada en la síntesis *de novo* de colesterol (Bjorkhem, 2002).

Se han propuesto varios mecanismos por los que los COP pueden inhibir la actividad de la HMG-CoA reductasa: inhibición de la síntesis de la enzima (Sinensky *et al.*, 1979), degradación de la misma (Chang *et al.*, 1981), modificación de la estructura de la enzima (Beime *et al.*, 1977) o unión de los COP a las proteínas citosólicas (Taylor y Peng, 1985).

a.7) Mutagénesis

La actividad mutagénica de varios COP se ha demostrado en ensayos *in vitro*. Blackburn *et al.* (1979) y Sevanian y Peterson (1984, 1986) indican efectos mutagénicos del α -epoxicolesterol, en contradicción a lo señalado por Kadis (1978), Kelsey y Pienta (1979), Glatt *et al.* (1983) y Ansari *et al.* (1992). Más adelante, Peterson *et al.* (1988) encuentran que el β -epoxicolesterol es unas tres veces más mutagénico que su epímero y que, para ambos, la intensidad mutagénica aumenta con la dosis.

Es de destacar el trabajo de revisión de Smith y Johnson (1989) sobre los estudios acerca de la inhibición de la síntesis de ADN

por algunos COP. Moog *et al.* (1986) sugieren como posible mecanismo el incremento de la entrada de calcio a través de la membrana.

a.8) Enfermedades crónicas y degenerativas

Cáncer: Se ha señalado la actividad carcinogénica de algunos COP, de los cuales sólo el α -epoxicolesterol se ha detectado en alimentos y muestras biológicas (Morin *et al.*, 1992). Parsons y Goss (1978) encuentran que el α -epoxicolesterol produce, en fibroblastos de piel humana, un grado similar de daño cromosómico y de estimulación de la reparación del ADN, que dosis bajas de radiación UV. En tejidos humanos asociados a cáncer, y en secreciones y excreciones de personas con problemas hiperplásicos, se han identificado grandes cantidades de α -epoxicolesterol y colestanoetriol (Sporer *et al.*, 1982; Gruenke *et al.*, 1987; Wrensch *et al.*, 1989).

Enfermedad de Alzheimer: Los trastornos neurodegenerativos se caracterizan por una pérdida masiva de células nerviosas. La muerte de células neuronales va acompañada de un aumento de liberación de colesterol. La conversión de colesterol en un metabolito polar, (24S)-hidroxicolesterol, parece ser un mecanismo importante del sistema nervioso central para eliminar colesterol del cerebro (Kolsch *et al.*, 1999). Además, este metabolito daña las células neuronales, a estos efectos puede atribuirse el inicio de la enfermedad neurodegenerativa. Los niveles plasmáticos de (24S)-hidroxicolesterol pueden utilizarse como marcador bioquímico temprano de la alteración de la homeostasis del colesterol en el sistema nervioso central, ya que este compuesto está incrementado en pacientes con Alzheimer y demencia vascular (Lutjohann *et al.*, 2000; Bogdanovic *et al.*, 2001).

Diabetes: Al hallar niveles aumentados de COP en el miocardio de ratas diabéticas, Matsui *et al.* (1997) sugieren que los COP pueden estar relacionados con el desarrollo de cardiomiopatía diabética. Postulan que ello podría deberse a un metabolismo alterado del miocardio por deficiencia de insulina y no a niveles altos de lípidos circulantes.

Cataratas: Los COP pueden estar relacionados con la formación de cataratas (Schroepfer, 2000). Se ha estudiado la presencia de algunos COP en cataratas de seres humanos (Girao *et al.*, 1998). La degradación de la membrana lipídica por la edad y el ataque de radicales libres pueden contribuir a la formación de COP en el desarrollo de cataratas.

b). Óxidos de fitosteroles

Aunque los productos de oxidación del colesterol y de los fitosteroles son similares, los conocimientos sobre los posibles efectos biológicos y sobre la salud de los POP son limitados y, en algunos casos, contradictorios. Sin embargo, debido a la similitud estructural entre el colesterol y los fitosteroles, se piensa que los POP poseen características perjudiciales análogas a las de los COP (Oehrl Dean y Boyd, 2004).

b.1) Toxicidad

La mayoría de trabajos, con estudios *in vitro* e *in vivo*, sobre los efectos biológicos de los POP se han centrado en su toxicidad, estableciendo que el patrón de citotoxicidad de los óxidos de β -sitosterol y de los COP es similar, aunque menos severo para los POP (Kakis *et al.*, 1977, Meyer *et al.*, 1998, Adcox *et al.*, 2001).

Maguire *et al.* (2003) estudian los efectos de los óxidos de sitosterol sobre la citotoxicidad, apoptosis, estado antioxidante y genotoxicidad de una línea celular de monocitos de sangre humana (células U937). En función de la concentración, estos óxidos demuestran efectos biológicos similares al 7 β -hidroxicolesterol (reducción de la viabilidad celular, inducción de apoptosis, disminución de los niveles de glutatión), pero no producen efectos genotóxicos. Además el 5 α ,6 α -epoxisitosterol en solitario no muestra toxicidad hacia estas células. Se destaca la necesidad de tener en cuenta, a la hora de evaluar la toxicidad, el distinto comportamiento que pueden mostrar los óxidos según se encuentren en forma aislada o como componentes de mezclas de óxidos.

En un estudio más reciente (Ryan *et al.*, 2005) se evalúan los efectos de POP sobre la citotoxicidad y apoptosis de líneas celulares (U937, CaCo-2 y HepG2). De los POP estudiados, el 7-cetositosterol y el 7 β -hidroxisitosterol son los más citotóxicos, mientras que el 5 α ,6 α -epoxisitosterol no muestra toxicidad alguna. En general, los efectos tóxicos de los POP son similares a los de los COP, pero se necesitan mayores cantidades de POP para alcanzar resultados comparables. Además, se observa que las vías apoptóticas provocadas por COP y POP pueden ser diferentes.

Sin embargo, otros autores no hallan indicios de toxicidad de los POP: Hiroko *et al.* (2004) no detectan contribución alguna de los POP en el desarrollo de aterosclerosis en ratones deficientes de apo-E, a pesar de la absorción y acumulación de los POP, y Lea *et al.* (2004) no hallan indicios de genotoxicidad ni de toxicidad subcrónica en ratas Wistar alimentadas durante 90 días con una dieta que contiene un concentrado de fitosteroles con 30% de POP.

b.2) Absorción

Los estudios sobre la absorción de POP son escasos. Debido a la baja absorción intestinal de los fitosteroles, la acción de sus productos de oxidación no ha sido de interés, pero el enriquecimiento de los alimentos y la posible formación de POP en estos productos han incrementado el interés por el esclarecimiento de la forma en que se metabolizan y excretan estos óxidos y su incorporación a los tejidos (Grandgirard, 2002; Dean y Boyd, 2004).

Se han detectado POP en plasma de ratas y de humanos sanos y con fitosterolemia (Brooks *et al.*, 1983; Plat *et al.*, 2001; Grandgirard *et al.*, 2004b). Se ha estudiado la absorción linfática de POP en ratas (Grandgirard *et al.*, 1999; Tomoyori *et al.*, 2004) y la importancia de la longitud de la cadena de la molécula del esteroide en la absorción ya que a mayor longitud del sustituyente en C-24 de la cadena lateral, menor es la absorción del POP, hecho ya observado en los fitosteroles sin oxidar (Grandgirard *et al.*, 1999; Ostlund *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que la incorporación de POP en tejidos es dosis-dependiente (Grandgirard, 2002).

En otro estudio realizado en humanos (Grandgirard *et al.*, 2004b) se hallan contenidos plasmáticos de 5β -sitostanol- 6β -epóxido y sitostanotriol mucho más altos que los de otros POP, indicando que los POP proceden tanto de los alimentos como de la oxidación *in vivo* en el plasma. Datos sobre la acumulación de POP de la dieta en tejidos de hámsteres alimentados con mezclas de POP de sitosterol o campesterol (Grandgirard *et al.*, 2004c), sugieren que los derivados 7α -hidroxiesteroides se metabolizan mejor *in vivo* que otros óxidos y que los $5\alpha,6\alpha$ -epoxiesteroides se transforman en trioles.

E.3. INDICADORES DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA

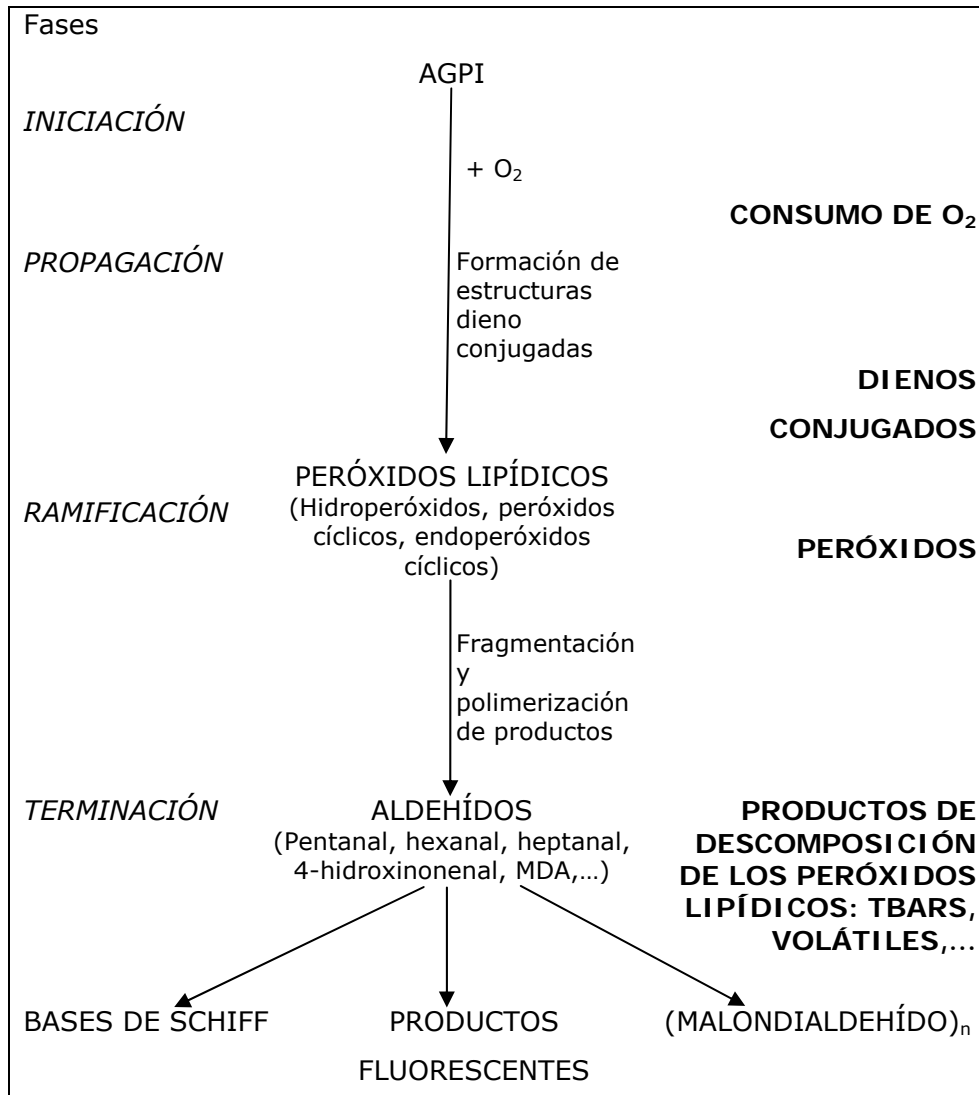
En la figura nº 8 se muestra un esquema de los compuestos que se pueden producir en las distintas etapas de la oxidación de los AGPI y los diferentes métodos utilizados para su evaluación.

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han evaluado productos secundarios de oxidación lipídica, por lo que, a continuación, se hace una revisión de los métodos propuestos para la determinación de estos compuestos y de los productos de oxidación de esteroides.

E.3.1. Métodos de determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

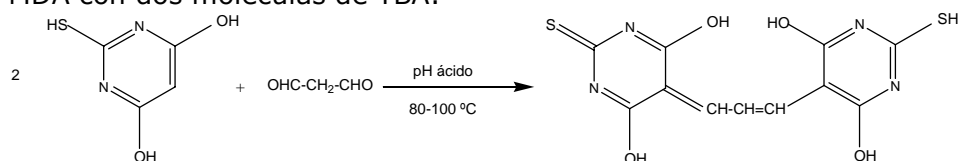
La determinación de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) es el método más utilizado para la evaluación de la oxidación de la grasa en alimentos. El ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) es un compuesto ampliamente usado debido a su reactividad, mayoritariamente con compuestos carbonílicos (aldehídos, cetonas), entre las principales sustancias reaccionantes con el TBA se encuentra el MDA (producto secundario procedente de la oxidación de los AG). El MDA es un dialdehído de 3 átomos de carbono con los grupos carbonilo en las posiciones C-1 y C-3, cada uno de ellos reacciona, por condensación, con una molécula de TBA (figura nº 9), produciendo un pigmento rojizo que se cuantifica por espectrofotometría o fluorimetría (Sinnhuber *et al.*, 1958; Schmidt, 1959).

Figura nº 8. Indicadores de la oxidación lipídica. Esquema del proceso de oxidación de los ácidos grasos insaturados y determinaciones que se han propuesto para su estudio en distintas etapas (Sánchez-Moreno y Larrauri, 1998).



A la derecha, en negrita, se señalan las determinaciones útiles para detectar oxidación lipídica.

Figura n° 9. Indicadores de la oxidación lipídica. Condensación del MDA con dos moléculas de TBA.



Aunque el MDA es el principal compuesto que reacciona con el TBA no es el único; otros compuestos que pueden formar complejos con él, como es el caso de otros aldehídos procedentes de la oxidación lipídica (Valenzuela, 1991), hidroximetilfurfural (HMF) y furfural (Espinosa-Mansilla *et al.*, 1993) y azúcares (Du *et al.*, 1992). Por otra parte el MDA se encuentra mayoritariamente unido a diferentes compuestos, especialmente a proteínas y aminoácidos y se debe recurrir a una hidrólisis ácida para su liberación (Hageman *et al.*, 1992).

Los factores que determinan la formación del MDA a partir de los AGPI peroxidados son: grado de insaturación de los AG (Dahle *et al.*, 1962; Pryor *et al.*, 1976), presencia de metales (Janero y Burghardt, 1989), pH (Chen y Waimaleongora-Ek, 1981), temperatura y duración del calentamiento (Pikul *et al.*, 1984).

La mayor parte del MDA que se detecta durante el ensayo de TBARS, se forma durante la oxidación lipídica; sin embargo, también puede proceder de la descomposición de peróxidos lipídicos por las condiciones de calor y acidez del ensayo, por lo que se añaden antioxidantes o quelantes para evitar la autooxidación de otros AGI de la muestra (Gutteridge y Halliwell, 1990).

La determinación de TBARS es, a pesar de su baja especificidad, uno de los procedimientos más útiles para evaluar productos procedentes de la oxidación de los AGPI. Cuando en la determinación se hace paralelamente un control y se aplica a

muestras parcialmente purificadas, los resultados se correlacionan bien con otros métodos más específicos de estimación de las alteraciones químicas inducidas por la oxidación (Wallin *et al.*, 1993; Guillén-Sans y Guzmán-Chozas, 1998).

El 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) se utiliza como patrón, ya que la hidrólisis ácida de este acetal produce MDA en una reacción equimolecular (Sinnhuber y Yu, 1958).

Los métodos propuestos para el análisis de MDA mediante el ensayo de TBARS son, generalmente, medidas espectrofotométricas o fluorimétricas, ya sean directas (sobre la muestra, la fracción grasa de la muestra, un extracto acuoso ácido de la muestra o una porción del destilado de la muestra) o posteriores a una separación cromatográfica (cromatografía líquida de alta resolución –CLAR- o gaseosa –CG-) (cuadros nº 4 y 5). En algunos casos (Tarladgis *et al.*, 1960; Pikul *et al.*, 1989; Azevedo Gomes *et al.*, 2003; Ulu, 2004) se propone una destilación previa de la muestra, de esta forma se minimizan las interferencias por componentes no lipídicos de la misma.

Los protocolos propuestos para la determinación del aducto MDA-TBARS son muy variados, y se basan en el tratamiento de la muestra con ácido tricloroacético (TCA) y una solución de TBA. Tras la incubación en caliente, la solución toma una coloración rosácea que se cuantifica mediante espectrofotometría o fluorimetría, siendo más sensible ésta última. En la cuadro nº 4 se indican distintos métodos utilizados en la determinación espectrofotométrica del MDA.

78 **Cuadro nº 4.** Indicadores de la oxidación lipídica. Determinación de MDA por técnicas espectrofotométricas.

	Referencia
<p>Preparación de la muestra:</p> <p>a) Extracción de la fracción grasa</p> <p>b) Eliminación de proteínas (TCA^(1-6,8,9), HClO₄^(7,8))</p> <p>c) Destilación</p>	<p>a) Bligh y Dyer (1959); Younathan y Watts (1960); Pikul <i>et al.</i> (1983 y 1989). b) ⁽¹⁾Asakawa y Matsushita (1979); ⁽²⁾Schmedes y Holmer (1989); ⁽³⁾Bird y Draper (1984); ⁽⁴⁾Fernández <i>et al.</i> (1997); ⁽⁵⁾Angulo (1997); ⁽⁶⁾Fenaille <i>et al.</i> (2001); ⁽⁷⁾Yagi (1976); ⁽⁸⁾Ulu (2004); ⁽⁹⁾Manglano <i>et al.</i> (2005). c) Tarladgis <i>et al.</i> (1960); Pikul <i>et al.</i> (1989); Azevedo Gomes <i>et al.</i> (2003); Ulu (2004)</p>
<p>Espectrofotometría VIS</p> <p>Muestras: AG⁽¹⁾, pescado⁽²⁾, muestras biológicas⁽³⁾, leche en polvo⁽⁴⁾, carne^(5,7), ⁽⁶⁾productos cárnicos; leche humana⁽⁸⁾; FL⁽⁶⁾.</p> <p>Preparación de la muestra, reacción con el TBA, medio ácido y calor.</p> <p>$\lambda = 532$ ó 535 nm</p>	<p>⁽¹⁾Asakawa y Matsushita (1979); ⁽²⁾Schmedes y Holmer (1989); ⁽³⁾Bird y Draper (1984); ⁽⁴⁾Fenaille <i>et al.</i> (2001); ⁽⁵⁾Pikul <i>et al.</i> (1983 y 1989); ⁽⁶⁾Ulu (2004); ⁽⁷⁾Azevedo Gomes <i>et al.</i> (2003); ⁽⁸⁾Turolli <i>et al.</i> (2004)</p>
<p>Espectrofotometría UV</p> <p>Muestras: Carne.</p> <p>La absorción al UV del MDA depende del pH, por la progresiva disociación del hidrógeno enólico al aumentar el pH.</p> <p>Se determina por diferencia de las absorbancias ($\lambda = 267$ nm) del MDA a pH ácido y básico.</p>	<p>Fernández <i>et al.</i> (1997)</p>
<p>Espectrofluorimetría</p> <p>Muestras: Fluidos biológicos⁽¹⁾ y FL^(2,3).</p> <p>Metodología similar a la descrita en la determinación en el visible por reacción con el TBA. Se calienta a 80 °C y, tras centrifugar, se mide la fluorescencia emitida.</p> <p>⁽¹⁾$\lambda_{exc} = 532$ nm y $\lambda_{em} = 553$ nm; ⁽²⁾$\lambda_{exc} = 515$ nm y $\lambda_{em} = 553$ nm.</p> <p>MDA: Malondialdehído; TCA: Ácido tricloroacético; VIS: Visible; FL: Fórmulas para lactantes; TBA: Ácido tiobarbitúrico; UV: Ultravioleta.</p>	<p>⁽¹⁾Yagi (1976); ⁽²⁾Angulo (1997); ⁽³⁾Manglano <i>et al.</i> (2005)</p>

El ensayo de TBA se ha intentado mejorar mediante la separación por cromatografía del complejo MDA-TBA de las distintas sustancias interferentes. En general, se forma en primer lugar el complejo MDA-TBA, a continuación se neutraliza la muestra (Lee y Csallany, 1987), y se procede a la extracción con *n*-butanol o a una cromatografía en columna (Draper *et al.*, 1993; Chirico, 1994). La separación del complejo MDA-TBA por CLAR se suele llevar a cabo en fase inversa con fases móviles que contienen metanol o mezclas de éste con agua y acetonitrilo o fases de tampón fosfato. Para la detección se utilizan detectores UV-VIS o de fluorescencia (Tatum *et al.*, 1990; Draper *et al.*, 1993; Chirico, 1994; Fenaille *et al.*, 2001). La determinación de MDA por CG requiere su derivatización previa. Los procedimientos propuestos para la determinación de MDA por cromatografía se indican en la cuadro nº 5.

80 Cuadro nº 5. Indicadores de la oxidación lipídica. Determinación de MDA por técnicas cromatográficas.

Técnica	Muestras	Modo operatorio	Referencia
CG			
Detector: Captura electrónica y fósforo-nitrógeno	Carne	Derivatización previa del MDA con: 2-hidroxi pirimidina ⁽¹⁾ ; 1,3-propanediol ⁽²⁾ ; 2-hidracinobenzotiazol ⁽³⁾ ; pentafluorofenilhidracina ⁽⁴⁾ .	⁽¹⁾ Hamberg <i>et al.</i> (1968); ⁽²⁾ Lakshminarayana y Cornwell (1986); ⁽³⁾ Bejjean-Leymarie y Bruna (1988); ⁽⁴⁾ Tomita <i>et al.</i> (1990).
Detector: EM	Leches en polvo	Derivatización previa del MDA con fenilhidracina.	Fenaille <i>et al.</i> (2000).
CLAR			
Detector: Fluorimétrico	⁽¹⁾ pescado, ^(1,2) carne, ⁽¹⁾ margarina, ⁽¹⁾ mantequilla, ⁽¹⁾ aceite	Cromatografía de exclusión molecular. Preparación: muestra homogeneizada + BHT + TCA. Tras centrifugar/filtrar, se añade TBA y se incuba. $\lambda_{exc} = 515$ y $\lambda_{em} = 543$ nm.	⁽¹⁾ Bergamo <i>et al.</i> (1998); ⁽²⁾ de las Heras <i>et al.</i> (2003).
Detector: UV	Hígado de rata	Cromatografía en fase reversa. Columna Spherogel-TSK 1000pw. MDA libre: la muestra se homogeneiza (pH = 7), se filtra por membrana de ultrafiltración. MDA ligado: el tejido homogenizado se hidroliza, y se procede de igual forma.	Lee y Csallany (1987).
Detector: DAD	Leches en polvo ⁽¹⁾ ; FL ⁽²⁾	Cromatografía en fase reversa. 2 modos de tratamiento de la muestra: a) por formación de aductos con TBA (muestra + TBA + TCA + BHT); tras centrifugar, el sobrenadante se incuba 1 h a 70 °C; $\lambda = 532$ nm); b) tras derivatización con dinitrofenilhidracina ($\lambda = 307$ nm).	a) ⁽¹⁾ Fenaille <i>et al.</i> (2001); ⁽²⁾ Cesa (2004). b) ⁽¹⁾ Fenaille <i>et al.</i> (2001).

MDA: Malondialdehído; CG: Cromatografía gaseosa; EM: Espectrometría de masas; CLAR: Cromatografía líquida de alta resolución; BHT: Butilhidroxitolueno; TCA: Ácido tricloroacético; TBA: Ácido tiobarbitúrico; UV: Ultravioleta; DAD: *Diode-array detector*; FL: Fórmulas para lactantes; BHT: Butilhidroxitolueno.

E.3.2. Métodos de determinación de compuestos volátiles

La determinación de los compuestos volátiles es habitual en la evaluación de la oxidación lipídica. Durante ésta, se generan pequeñas cantidades de compuestos volátiles, algunos sensibles al calor y/o oxígeno, por lo que se requieren métodos que aislen los analitos, y también los concentren, pero se deben tomar precauciones durante estos procesos para asegurar que permanecen inalterados y para minimizar las pérdidas de los mismos.

Para el muestreo y aislamiento de los volátiles generados por la oxidación lipídica se han desarrollado una gran variedad de métodos analíticos. Por lo general, para el muestreo se aplican métodos de: extracción (con disolventes o por destilación), análisis del espacio de cabeza o microextracción en fase sólida (SPME), con cualquiera de ellos se consigue separar de la matriz y pre-concentrar los compuestos volátiles. Para la separación de estos compuestos volátiles extraídos se utiliza la CG o la CLAR.

El método por destilación más usado para el análisis de volátiles es la destilación y extracción simultánea (SDE) (Parliment, 2002). En este método la muestra, dispersada en agua, se coloca en un matraz y el disolvente extractor en otro. Una vez acoplados cada uno de los recipientes a su correspondiente rama del destilador se les aplica una fuente de calor; durante la destilación, el disolvente orgánico va extrayendo los componentes volátiles que contiene el vapor liberado por la muestra. Tras destilar la muestra durante unas horas, el disolvente se elimina lentamente por evaporación y la determinación se realiza por CG. Aunque esta técnica es ampliamente utilizada, puede presentar una serie de problemas: una baja

recuperación de los componentes muy volátiles, el disolvente puede contaminar la muestra y, si el proceso no se lleva a cabo bajo condiciones de baja presión, los compuestos inestables pueden sufrir descomposición térmica (Mariaca y Bosset, 1997).

El análisis del espacio de cabeza puede ser estático o dinámico. En el modo estático, la muestra se equilibra, a una determinada temperatura, en un vial sellado. Una vez alcanzado el equilibrio entre la muestra y el espacio de cabeza, se toma una alícuota del mismo y se inyecta en el CG. La principal ventaja de esta técnica, es la capacidad de analizar compuestos de bajo peso molecular sin la presencia del pico del disolvente, además la preparación de la muestra es sencilla y el proceso puede automatizarse. Sin embargo, la sensibilidad de la técnica puede ser insuficiente ya que sólo se analiza una fracción del espacio de cabeza. Una combinación de destilación y posterior análisis, en modo estático, del espacio de cabeza del destilado ha sido propuesta por Ulberth y Roubicek (1995).

En el muestreo dinámico, la muestra se purga de forma continua con un gas inerte (gas de purga), que arrastra los compuestos volátiles de la muestra hasta una trampa de material absorbente (purga y trampa – *purge & trap*), que retiene los volátiles. Por calentamiento de la trampa o por elución con un disolvente apropiado, los compuestos volátiles se desorben, a continuación, se concentran por enfriamiento (*cryo-focusing*) y se introducen en el CG (Wamper, 2002). En esta técnica, la sensibilidad es mayor, pero la instrumentación que se requiere es más compleja (necesita la monitorización de varias etapas como purga, trampa y análisis) y costosa. Comparado con las técnicas estáticas, se requiere más

tiempo de análisis por muestra (Washall y Wampler, 1990; Steffen y Pawliszyn, 1996).

En la SPME la extracción de los analitos, del espacio de cabeza de la muestra o por inmersión en ella, se realiza mediante una fibra cubierta por una película polimérica. Tras la extracción, los analitos se desorben en el inyector del CG para su análisis. En el modo de espacio de cabeza, los analitos deben difundir desde la matriz al aire y, a continuación, desde éste a la fibra. En el modo por inmersión, los analitos difunden directamente de la muestra a la fibra. Con la incorporación de agitación y/o calentamiento de la muestra, se consigue aumentar la eficiencia de la extracción; la afinidad por el analito es muy diferente en las distintas fibras existentes en el mercado. La naturaleza química de los compuestos volátiles y el tipo de recubrimiento de la fibra va a condicionar el perfil de volátiles de la muestra. El control de variables (pH, temperatura, tiempo y volumen de la muestra) durante el muestreo con SPME es crítico para minimizar la variabilidad en los resultados (Arthur y Pawliszyn, 1990). La SPME ofrece las ventajas de no requerir una extensa preparación de la muestra, lo cual implica una reducción del tiempo de análisis, además es más barata y se ha demostrado su superioridad frente al análisis de purga y trampa, con respecto a la repetibilidad, ruido de fondo y contaminación de unas muestras a otras (Marsili, 1999).

Sin embargo, la SPME no es una técnica de extracción extensiva, ya que durante el proceso de extracción se alcanza un equilibrio entre la matriz y la fase estacionaria que recubre la fibra (Zhang y Pawliszyn, 1993). Por lo tanto, esta técnica no permite la cuantificación absoluta de los compuestos volátiles, pero permite comparar cantidades relativas entre muestras cuando se utilizan

exactamente las mismas condiciones de extracción (Roberts *et al.*, 2000).

La CLAR no es una técnica habitual en la determinación de volátiles, pero se usa como un método alternativo para su separación. En general, previo a su análisis por CLAR, los aldehídos se derivatizan y extraen con un disolvente. Este método resulta muy sensible y muestra buena linealidad, pero la preparación de la muestra es más compleja y se requiere una instrumentación más especializada.

En el cuadro nº 6 se resumen los métodos de determinación de compuestos volátiles en alimentos.

Cuadro nº 6. Indicadores de la oxidación lipídica. Determinación de compuestos volátiles.

Método	Muestra	Modo operativo	Referencia
SDE	(1)Pescado; (2)carne; (3,4)productos cárnicos; (5,6)leche	Disolvente/t destilación (h): (1)cloruro de metilo/2; (2)diétiler: pentano/4; (3,4)diclorometano/2; (5)diclorometano/ 7; (6)diclorometano/ 3. Determinación: (1-6)CG-EM; (9)CG-FID.	(1)Zhang y Lee (1997); (2)Liu et al. (2001); (3)Ansorena et al. (2001); (4)Ansorena y Astiasarán (2004); (5)Moio et al. (1993); (6)Jeon et al. (1978)
Espacio de cabeza estático	(1)Productos cárnicos; (2,4,7)FL; (3)aceites vegetales y de pescado; (5)palomitas de maíz; (6)leche en polvo;	T (°C)/t equilibrado (min): (1)120/ 10; (2)60/ 15 (3)40-180/ 10; (4)60/ 30; (5)90/ 60; (6)90/ 45 ; (7)60/ 15 . Determinación: (1-3,5-7)CG-FID; (4)EM-Nariz electrónica.	(1)Wu et al. (1998); (2)Romeu-Nadal et al. (2004); (3)Frankel (1993); (4)Fenaille et al. (2003); (5)Robards et al. (1988); (6)Thomsen et al. (2005); (7)Satué-Gracia et al. (2000);
Espacio de cabeza dinámico	(1,2)Productos cárnicos; (3)productos lácteos; (4,6)leche; (5)FL	T (°C)/t equilibrado (min): (1)90 °C/30; (2)42 °C/30; (3)30-70 °C/2; (4)45 °C/5; (5)TA/45; (6)TA/(sin datos). Gas/t purga (min): (1)He/10; (2,5)N ₂ /30; (3)He/5; (4)He/20; (6)N ₂ / 60. Determinación: (1,2,4,5)CG-EM; (3,6)CG-FID.	(1)Wu y Sheldon (1988); (2)Sunesen et al. (2001); (3)Park y Goins (1992); (4)Marsili (1999); (5)van Ruth et al. (2006); (6)Contarini et al. (1997)
SPME	(1,2,4)Carne; (3)leche; (5)FL; (6)patatas fritas; (7)aceite de oliva	T (°C)/t equilibrado (min): (1)40 °C/5; (2)80 °C/15; (3)45 °C/2; (4)sin equilibrado; (5)25 °C/60; (6)70 °C/5; (7)40 °C/15. t extracción (min): (1,6)20; (2,7)30; (3)15; (4)5 ; (5)10. Fibra: (2,3)CAR/PDMS; (1,5)PDMS/DVB; (4)PDMS; (6,7)DVB/CAR/PDMS. Determinación: (1,7)CG-FID; (2)CG-O; (2-6)CG-EM.	(1)Brunton et al. (2000); (2)Brunton et al. (2002); (3)Marsili (1999); (4)Goodridge et al. (2003); (5)Fenaille et al. (2003); (6)Sanchez-Silva et al. (2004); (7)Kalua et al. (2006)
CLAR	(1)Carne; (2)aceites vegetales; (3)aceites comestibles; (4)patatas fritas	Derivatización: (1,2,4)2,4-dinitrofenilhidrazona; (3)acetilacetona. Disolvente: (1,2)Hexano; (4)etanol. Detector: (1,2,4)UV; (3)fluorimétrico.	(1)Wen et al. (1997); (2)Seppanen y Csallany (2001); (3)Hirayama et al. (1994); (4)Sanchez-Silva et al. (2004)

SDE: Destilación y extracción simultánea; t: Tiempo; CG-EM: Cromatografía de gases-espectrometría de masas; CG-FID: Cromatografía de gases-detector de ionización de llama; T: Temperatura; EM-Nariz electrónica: Nariz electrónica acoplada a espectrometría de masas; FL: Fórmulas para lactantes; TA: Fórmulas para lactantes; SPME: Microextracción en fase sólida; CAR: Carboxen; PDMS: Polidimetilsiloxano; DVB: Divinilbenceno; CG-O: Cromatografía de gases-olfatometría; CLAR: Cromatografía líquida de alta resolución; UV: Ultravioleta.

E.3.3. Métodos de determinación de óxidos de esteroides

No existe una metodología validada y reconocida internacionalmente para el análisis de POP. Los métodos utilizados se basan en los desarrollados para la determinación de COP (Piironen *et al.*, 2000; Dutta, 2002; Zhang *et al.*, 2005a), aunque tampoco se dispone de métodos validados para estos compuestos (Appelqvist, 2004).

En la determinación de SOP se debe tener en cuenta que (Ulberth y Buchgraber, 2002; Dutta, 2002; Guardiola *et al.*, 2004):

- Los SOP están presentes en pequeñas cantidades en los alimentos, de ppm (ng/g) a ppb ($\mu\text{g/g}$), por lo que el método debe ser muy sensible.

- El método analítico debe poseer una elevada resolución porque los SOP son numerosos y algunos con estructuras muy similares.

- Las fracciones lipídicas de algunos alimentos son muy complejas, por lo que se requiere una purificación previa muy exhaustiva.

- Durante la manipulación de la muestra y el análisis se debe evitar la formación de nuevos óxidos de esteroides o la degradación de los existentes.

Los métodos de determinación de SOP incluyen habitualmente las siguientes etapas:

- a) Extracción lipídica
- b) Purificación
- c) Análisis cuantitativo por CG o cromatografía líquida (CL) e identificación por espectrometría de masas (EM).

a). Extracción lipídica

El aislamiento de los SOP de los alimentos comienza normalmente con la extracción lipídica si las muestras no se encuentran en forma de extractos lipídicos, como los aceites vegetales.

La fracción lipídica puede extraerse con disolventes, bien en extracción sólido-líquido (Dutta, 2004) o mediante Soxhlet (Christie, 2003) y con fluidos supercríticos (*supercritic fluid extraction*, SFE) (Johnson y Barnett, 2003). Lo más habitual es la extracción con mezclas de disolventes orgánicos.

Durante la extracción de la fracción grasa las pérdidas deben minimizarse y sólo deben extraerse los compuestos de interés para posteriores análisis. Es importante que el disolvente utilizado tenga la polaridad óptima para evitar que se extraigan junto con los lípidos otros componentes de la muestra (Dutta *et al.*, 1996).

La mezcla de disolventes más utilizada para la extracción de lípidos de alimentos es cloroformo:metanol (Folch *et al.*, 1957). También se usa hexano:isopropanol (Hara y Radin, 1978), cloruro de metileno/etanol y cloruro de metileno/metanol (Ulberth y Buchgraber, 2002). Turchetto *et al.* (1993) describen la extracción en frío con cloroformo aplicada a muestras de café.

Una alternativa para la extracción con disolventes, es la separación mediante una columna cromatográfica y su posterior elución con disolventes apropiados, este método se llama "flash chromatography" o "método columna seca". La columna está rellena con ácido silícico, Celite 545 y fosfato monocálcico. La primera elución se realiza con hexano:acetato de etilo (9:1, v/v) y contiene los lípidos neutros y la mayoría del colesterol (sin COP); la segunda fracción, eluida con acetato de etilo, contiene COP, algo de colesterol y lípidos polares. A continuación esta fracción se purifica por cromatografía en capa fina (CCF) con gel de sílice. La aplicación de este método como purificación de la fracción lipídica de la carne (Highley *et al.*, 1986; Zubillaga y Maerker, 1991) proporciona recuperaciones de COP del 97%.

También es posible omitir la extracción lipídica y comenzar el análisis de SOP con una saponificación directa, o transesterificación del alimento. Para la determinación de COP en leche en polvo, Dionisi *et al.* (1998) comparan la eficacia del método directo con otros tres que implican extracción previa de la grasa: con hexano:isopropanol (3:2, v/v), con cloroformo:metanol (2:1, v/v) y mediante columna cromatográfica con diclorometano:metanol (9:1, v/v). Las cantidades de COP obtenidas con la saponificación directa y con la extracción con cloroformo:metanol fueron similares, en cambio con hexano:isopropanol se obtuvieron valores más bajos, probablemente debido a la baja polaridad de los disolventes utilizados en la extracción. Además, la saponificación directa produjo una mínima formación de artefactos y buena repetitividad y exactitud.

Otras técnicas más avanzadas y muy eficientes para la extracción de lípidos donde se trabaja con fluidos presurizados, tales como la SFE o la extracción acelerada con disolventes (*pressurized liquid extraction*, PLE o también llamada *accelerated solvent*

extraction, ASE), no han encontrado una gran aceptación en la determinación de COP.

Boselli *et al.* (2001) encuentran recuperaciones similares de COP en huevo en polvo por Folch *et al.* (1957) y PLE (hexano:isopropanol, 3:2, v/v, a 60 °C y 15 MPa). La PLE presenta, además, como ventajas la reducción del tiempo de análisis, menores costes en disolventes y evita el uso de disolventes clorados.

Distintos sistemas de extracción lipídica utilizados por algunos autores en la determinación de SOP se muestran en el cuadro nº 7.

b). Purificación

Para mejorar la sensibilidad y eficiencia del análisis, ya que los SOP son componentes minoritarios en el extracto lipídico, del orden de 0.1-1% en aceites vegetales (Dutta *et al.*, 1996), la purificación es esencial para separarlos de TG, fosfolípidos, esteroides no oxidados y otros compuestos.

Se suelen aplicar las siguientes metodologías:

- b.1) Hidrólisis
- b.2) Transesterificación
- b.3) Fraccionamiento cromatográfico

b.1) Hidrólisis

La hidrólisis se debe realizar cuidadosamente para evitar la formación de artefactos y evitar contenidos erróneos de SOP, por lo que esta fase se considera, generalmente, la más controvertida en el análisis de SOP (Bodin y Diczfalusy, 2002). La hidrólisis se puede realizar mediante álcalis o enzimas.

90 Cuadro nº 7. Indicadores de la oxidación lipídica. Sistemas de extracción de la fracción lipídica.

Sistema de extracción	Muestra	Referencia
Extracción con disolventes		
Cloroformo:metanol	Patatas fritas	Lee <i>et al.</i> , 1985
	Alimentos infantiles a base de carne y pescado	Evangelisti <i>et al.</i> , 2004; Zunin <i>et al.</i> , 2006
	Carne	Boselli <i>et al.</i> , 2005
1. Cloroformo:metanol	Grasas vegetales para untar enriquecidas con ésteres de fitosteroles y sin enriquecer	Conchillo <i>et al.</i> , 2005
2. Cloroformo	Productos de bollería	Cercaci <i>et al.</i> , 2006
Diclorometano:metanol con 0.05% BHT	Grasas vegetales para untar enriquecidas con ésteres de fitosteroles	Grandgirard <i>et al.</i> , 2004a
Extracción fría con cloroformo	Café	Turchetto <i>et al.</i> , 1993
Hexano: isopropanol	Patatas fritas y aceites vegetales	Dutta, 1997
	FL y papillas de cereales con leche	Zunin <i>et al.</i> , 1998
Heptano:isopropanol	Harina de maíz	Nourooz-Zadeh y Appelqvist, 1992
	Carnes	Zubillaga y Maerker, 1991; Highley <i>et al.</i> , 1986
Columna cromatográfica	Leche en polvo	Dionisi <i>et al.</i> , 1998
Soxhlet con tert-butilmetil éter	Productos cárnicos y queso	Schmarr <i>et al.</i> , 1996.

BHT: butil-hidroxitolueno; FL: Fórmulas para lactantes.

La saponificación es, probablemente, el método más común y como resultado de la misma, los acilgliceroles se convierten en compuestos solubles en agua y los esteroides conjugados, si existen, se hidrolizan.

En la saponificación de forma directa, el medio alcalino se añade a la muestra, sin extracción previa de la fracción grasa (Rose-Sallin *et al.*, 1995; Dionisi *et al.*, 1998; Louter *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Saldanha *et al.*, 2006).

La saponificación es fundamental en la determinación de los esteroides totales (oxidados y no oxidados) porque libera los esteroides conjugados, permaneciendo los esteroides disueltos en la fase orgánica y extrayéndose con un disolvente adecuado (Dutta *et al.*, 1996; Ulberth y Buchgraber, 2002). Los disolventes más frecuentemente usados en el análisis de SOP son diclorometano y dietiléter. El disolvente de elección debe ser algo polar ya que los SOP son más polares que los esteroides sin oxidar.

Tradicionalmente, la saponificación se hacía calentando la muestra con una solución metanólica o etanólica de NaOH o KOH, procedimiento que se ha reemplazado por una saponificación fría o a temperatura ambiente, pues se ha demostrado que algunos COP, como 7-cetocolesterol y el α -epoxicolesterol, se pueden degradar por el calor, y existe la posibilidad de la formación de epímeros a partir del 7-hidroxicolesterol y 7-cetocolesterol (Tsai *et al.*, 1980; Maerker y Unruh, 1986; Smith, 1987; Park *et al.*, 1996). Además, se ha demostrado que en la saponificación a temperatura ambiente durante toda una noche las pérdidas de COP son mínimas y prácticamente no se forman artefactos (Park y Addis, 1986; Guardiola *et al.*, 1998; Louter, 2004).

Diferentes procedimientos de saponificación aplicados en la determinación de SOP se muestran en el cuadro nº 8.

La hidrólisis enzimática de ésteres de colesterol mediante hidrolasas se ha empleado en una metodología en varias etapas para la determinación de COP (Nourooz-Zadeh, 1990).

b.2) Transesterificación

Otro método, menos estudiado, para separar los compuestos no deseados de los esteroides y SOP es la transesterificación. Este método elimina la necesidad de lavar tras la saponificación, lo que constituye una fuente de error, minimiza el tiempo de permanencia de la muestra en un medio básico fuerte y la formación de artefactos (Schmarr *et al.*, 1996; Bodin y Diczfalusy, 2002).

La fracción grasa, inicialmente compuesta en su mayoría por esteroides y SOP esterificados y TG, se convierte tras la transesterificación realizada con un alcohol o reactivo donante de grupos alquilo en esteroides libres, SOP, ésteres metílicos de AG y otros compuestos minoritarios. Los compuestos de una polaridad menor que los SOP se eliminan mediante un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) de aminopropilo (LC-NH₂) usando disolventes de polaridad creciente para la elución (Ulberth y Buchgraber, 2002; Guardiola *et al.*, 2004). Johnsson y Dutta (2006) concluyen que este método es rápido, eficiente y comparable con otros en términos de recuperación de POP polares y de polaridad media.

Cuadro n° 8. Indicadores de la oxidación lipídica. Procedimientos de saponificación.

Procedimiento de saponificación	Muestra	Referencia
KOH acuoso (20-50%), 12-24 h	Pescado	Saldanha <i>et al.</i> , 2006
KOH en metanol (1 N), 18 h, TA	Carne	Boselli <i>et al.</i> , 2005
Etanol + KOH saturado en agua + atmósfera de N ₂ , 15 h, TA	Aceites vegetales	Zhang <i>et al.</i> , 2006
KOH en metanol (1 N), 18 h, TA, oscuridad, agitación	Productos de bollería Grasas vegetales para untar enriquecidas con ésteres de fitosteroles y sin enriquecer	Cercaci <i>et al.</i> , 2006 Conchillo <i>et al.</i> , 2005
KOH en etanol (2 M), 18 h, TA, oscuridad	Grasas vegetales para untar enriquecidas con fitosteroles, mezclas de grasas, concentrados de fitosteroles	Louter <i>et al.</i> , 2004
KOH en metanol (1 M), 16 h, TA, oscuridad	Grasas vegetales para untar enriquecidas con fitosteroles	Grandgirard <i>et al.</i> , 2004a
Etanol + KOH saturado en agua + atmósfera de N ₂ , durante una noche, 25 °C, con agitación	Aceites vegetales	Lampi <i>et al.</i> , 2002
KOH en metanol (1 N), saponificación fría, durante una noche, TA	Alimentos infantiles a base de carne y pescado FL y papillas de cereales con leche	Evangelisti <i>et al.</i> , 2004; Zunin <i>et al.</i> , 2006 Zunin <i>et al.</i> , 1998
KOH en etanol (2 M), 18 h, TA, oscuridad	Patatas fritas y aceites vegetales	Dutta, 1997
KOH en metanol (1 N), durante una noche, TA, oscuridad, con agitación	Leches en polvo	Rose-Sallin <i>et al.</i> , 1995
Reflujo con KOH en etanol (10%) durante 2 h	Diferentes muestras grasas	Yanishlieva y Tasheva, 1986
Reflujo con KOH en etanol (1.5 M en 95% etanol) durante 30-90 min	Patatas fritas	Lee <i>et al.</i> , 1985

TA: temperatura ambiente; FL: Fórmulas para lactantes.

En el análisis de los esteroides los estudios de transesterificación se limitan, principalmente, a la determinación de colesterol y COP en carnes (Zubillaga y Maerker, 1988), grasas y aceites comestibles (Biedermann *et al.*, 1993), productos cárnicos y quesos (Schmarr *et al.*, 1996), grasas animales (Johnson, 1996; Ubhayasekera *et al.*, 2004), leche en polvo y FL (Przygonski *et al.*, 2000), y sólo se referencia uno en la determinación de SOP (POP + COP) en aceites vegetales (Johnsson y Dutta, 2006).

b.3) Fraccionamiento cromatográfico

La purificación, por técnicas cromatográficas, previa a la identificación y cuantificación de SOP, se usa frecuentemente junto con la saponificación (Guardiola *et al.*, 2004). La separación de los SOP de sus esteroides sin oxidar es especialmente importante para evitar la coelución en CG (Dutta y Appelqvist, 1997).

En la purificación de extractos de COP se ha usado la cromatografía clásica en columna con ácido silícico (Tsai *et al.*, 1980; Park y Addis, 1985; Bovenkamp *et al.*, 1988) o CCF con gel de sílice (Chicoye *et al.*, 1968; Bjorkhem, 1986).

Sin embargo, estos métodos se han sustituido de forma progresiva por SPE, debido a su elevada eficacia, sensibilidad y bajo coste. La SPE se basa en las diferencias de polaridad entre las sustancias interferentes y los analitos, por lo que una buena separación se obtiene mediante una elución gradual utilizando disolventes de polaridad creciente (Piironen *et al.*, 2000; Guardiola *et al.*, 2004).

Los rellenos de los cartuchos de SPE más usados en la fase normal (adsorción) son de sílice (Si-), Florisil, y aminopropilo (NH₂), y en la fase inversa (partición) de ODS (octadecil). Para la purificación

de SOP, los SPE con fases de sílice y NH₂ son los que han mostrado una mayor eficiencia y reproducibilidad (Piironen *et al.*, 2000).

Los SOP son más polares que sus correspondientes esteroides, es decir, éstos son ligeramente menos retenidos que los 25-hidroxiesteroides, 7-cetoesteroides y 5,6-epoxiesteroides, mientras que los trioles son fuertemente retenidos. El paso por SPE es crítico para conseguir una buena separación entre los esteroides oxidados y sin oxidar así como para una buena recuperación de los óxidos con distinto grado de retención. Son varios los estudios donde se utilizan cartuchos de sílice y mezclas de hexano:dietiléter de polaridad creciente, para eliminar las interferencias, y acetona y/o metanol para eluir los SOP. Cuando existen problemas para la eliminación de los esteroides sin oxidar, se suele usar una SPE doble y otras técnicas cromatográficas (ver cuadro nº 9).

Ulberth y Rossler (1998) comparan distintos métodos de purificación por SPE para la determinación de COP, y concluyen que la menor eficacia en la purificación de COP corresponde a los cartuchos de ODS y de sílice. Guardiola *et al.* (1995b) estudian la recuperación de esteroides con cuatro sistemas diferentes de elución (combinaciones de hexano y dietiléter) con cartuchos de sílice, obteniendo con uno de ellos una mayor eficacia en la separación de los esteroides de los COP y una mayor recuperación de COP (ver cuadro nº 9).

La combinación de una saponificación fría y la purificación de la fracción insaponificable por CCF o SPE mejora la eficacia en la determinación de SOP y se incluye en la mayoría de métodos descritos para la determinación de COP y POP (Guardiola *et al.*, 1995b; Rose-Sallin *et al.*, 1995; Schmarr *et al.*, 1996; Dutta, 1997; Dionisi *et al.*, 1998; Lampi *et al.*, 2002; Bortolomeazzi *et al.*, 2003; Conchillo *et al.*, 2005). Las ventajas de esta combinación son: la eliminación de los TG al convertirse en jabones hidrosolubles y la

hidrólisis de los ésteres de esteroles; se consigue así determinar los SOP totales (libres y esterificados).

Diferentes métodos cromatográficos (cromatografía en columna, cromatografía líquida preparativa y CCF) se han usado para la purificación de SOP de extractos lipídicos sin el paso previo de saponificación. Se evita así la formación de artefactos y la destrucción de óxidos que se dan en un medio básico; sin embargo, sólo se pueden determinar los SOP formados a partir de esteroles libres (Dutta *et al.*, 1996; Guardiola *et al.*, 2004).

Algunas de las condiciones de SPE aplicadas para la purificación en la determinación de SOP se muestran en la cuadro nº 9.

d). Análisis cuantitativo por CG o CL e identificación por EM

Hasta la fecha, la CG ha sido la técnica más utilizada para el análisis de SOP en alimentos (Dutta *et al.*, 1996; Guardiola *et al.*, 2004). Además, como resultado de un estudio interlaboratorio de determinación de COP en alimentos, se recomienda el uso de CG para el análisis cuali y cuantitativo de SOP (Appelqvist, 2004), aunque el aumento de la disponibilidad de detectores como EM y detector evaporativo de dispersión de la luz (*evaporative light-scattering detector*, ELSD) para la CL, favorece el desarrollo de nuevas metodologías para la determinación de SOP por CL (Guardiola *et al.*, 2002; Rodríguez-Estrada y Caboni, 2002).

Cuadro n° 9. Indicadores de la oxidación lipídica. Características de las SPE empleadas en la determinación de SOP.

Cartucho	Sistema de elución	Muestra	Referencia
Florisil	1) Hp: Isop (98:2); 2) *Acetona	Alimentos infantiles a base de carne y pescado	Evangelisti <i>et al.</i> , 2004; Zunin <i>et al.</i> , 2006
NH ₂	Doble SPE 1) H:TBME (2:1); 2) *Acetona	Aceites vegetales	Johnsson y Dutta, 2006
Sílice	1) H:TBME (90:10); 2) H:TBME (80:20); 3) *Acetona	Grasas vegetales para untar enriquecidas con fitosteroles	Grandgirard <i>et al.</i> , 2004a
Sílice	1) H:DE (1:1); 2) *DE:M (1:1)		Bortolomeazzi <i>et al.</i> , 2003
NH ₂	1) H:AE (95:5); 2) H:AE (9:1); 3) *Acetona	Aceites vegetales	
Sílice	1) H:DE (9:1); 2) H:DE (1:1); 3) *Acetona	Aceites vegetales	Lampi <i>et al.</i> , 2002
Sílice	Doble SPE 1) H:DE (75:25); 2) H:DE (60:40); 3) *Acetona	Patatas fritas preparadas en distintos aceites vegetales	Dutta y Appelqvist, 1997
NH ₂	1) H; 2) H:TBME (5:1); 3) H:TBME (3:1); 4) *Acetona	Patatas fritas y aceites vegetales Carne y queso	Dutta, 1997 Schmarr <i>et al.</i> , 1996
Sílice	1) H; 2) H:DE (95:5); 3) H:DE (90:10); 4) H:DE (80:20); 5) *Acetona	Productos de bollería Grasas vegetales para untar enriquecidas con ésteres de fitosteroles y sin enriquecer Huevo en polvo	Cercaci <i>et al.</i> , 2006 Conchillo <i>et al.</i> , 2005 Guardiola <i>et al.</i> , 1995b
NH ₂	1) H:AE (95:5); 2) H:AE (9:1); 3) *Acetona	Leche en polvo	Rose-Sallin <i>et al.</i> , 1995
ODS	1) AE:M (50:50); 2) M; 3) *AE:M (50:50)	Manteca de cerdo	Chen y Chen, 1994

SPE: extracción en fase sólida; Hp: Heptano; Isop: Isopropanol; NH₂: aminopropilo; H: hexano; TBME: *tert*-butilmetil éter; DE: dietiléter; M: metanol; AE: acetato de etilo; DCM: diclorometano; * = fracción que contiene los SOP

d.1). Cromatografía gaseosa

Debido al elevado número de posibles SOP, se precisa de la elevada eficiencia de las columnas capilares en combinación con los detectores de ionización de llama (FID) y EM, para obtener un sistema analítico muy específico. El detector FID en CG proporciona una buena sensibilidad y selectividad, propiedades que se han ampliado con el uso de EM, especialmente en el modo SIM (*selected ion monitoring*). El uso de EM ha disminuido la identificación errónea de los SOP en presencia de contaminantes y compuestos coeluyentes (Dutta *et al.*, 1996; Guardiola *et al.*, 2002).

- *Derivatización*: Para aumentar la volatilidad del compuesto, su estabilidad térmica y mejorar la forma del pico durante la separación a altas temperaturas (Guardiola *et al.*, 1996), las muestras se derivatizan por sililación, generando trimetilsililéteres (TMSE). Los reactivos usados con este fin son: hexametildisilazano (HMDS), *N,O*-bis(trimetilsilil)-acetamida (BSA), *N,O*-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA), *N*-trimetilsililimidazol (TMSI) y trimetilclorosilano (TMCS); estos reactivos se mezclan en distintas proporciones, BSA:TMSI:TMCS (3:3:2) o BSTFA:TMCS (99:1). La sililación se realiza en piridina, que actúa como disolvente y también como aceptor de ácido clorhídrico (HCl) cuando se emplean organoclorosilanos, como TMCS, en la derivatización. Es importante eliminar las trazas de humedad antes de la silanización, porque el agua compite con los grupos hidroxilo de los SOP por el grupo silil, provocando que la reacción no sea completa y que los derivados TMSE sean menos estables (Guardiola *et al.*, 2004). Otras condiciones, como temperatura y tiempo, pueden afectar a la derivatización,

especialmente en el caso de derivados trioles de esteroides (Dutta y Appelqvist, 1997; Zhang *et al.*, 2005a).

Para superar problemas de degradación, separación, formas del pico y/o adsorción irreversible a la fase estacionaria de la columna, también es posible la determinación de óxidos no derivatizados o acetato-derivados (Guardiola *et al.*, 2004).

Si el detector a emplear es EM con ionización electrónica, la derivatización proporciona generalmente un patrón de fragmentación más favorable (Bodin y Diczfalusy, 2002).

- *Separación*: En la mayoría de trabajos de determinación de SOP, se utilizan columnas capilares con fases estacionarias no polares (100% metilsilicona, 100% dimetilpolisiloxano, 5% fenil-95% metilsilicona, 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano), de 0.20-0.32 mm de diámetro interno y 25-30 m de longitud (Dutta y Appelqvist, 1997; Bortolomeazzi *et al.*, 2003; Lambelet *et al.*, 2003; Apprich y Ulberth, 2004; Grandgirard *et al.*, 2004a; Louter, 2004; Johnsson y Dutta, 2005). También se han utilizado columnas de mayor longitud (50-60 m) (Lampi *et al.*, 2002; Conchillo *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005a y b).

A pesar de las distintas fases estacionarias, dimensiones de las columnas y programas de temperaturas, algunos autores han descrito casos de coelución entre distintos SOP y una mala separación de la línea base debido al elevado número de SOP presentes en las muestras (Dutta, 1997; Dutta, 2002; Lampi *et al.*, 2002; Apprich y Ulberth, 2004; Grandgirard *et al.*, 2004a; Conchillo *et al.*, 2005; Jonson y Dutta, 2005). Además, la coelución de fitosteroides sin oxidar con algunos POP, como 7 β -hidroxicampesterol y sitosterol constituye

un problema (Lampi *et al.*, 2002; Bortolomeazzi *et al.*, 2003) o 7α -hidroxisitosterol y estigmasterol (Louter, 2004).

Para resolver los posibles problemas en la separación por CG, se ha ensayado la combinación de dos columnas capilares de diferente polaridad (no polar – DB5-MS - y polaridad media – DB35-MS). La separación de la línea base mejora, pero coeluyen tres pares de picos: 24-hidroxisitosterol/ $5\beta,6\beta$ -epoxicampesterol, $5\beta,6\beta$ -epoxiestigmasterol/ $5\alpha,6\alpha$ -epoxicampesterol y $5\alpha,6\alpha$ -epoxiestigmasterol/campestanotriol (Johnsson y Dutta, 2005).

Este hecho se puede evitar usando detectores más selectivos que el FID, como EM en modo SIM, que permite la identificación y cuantificación de picos superpuestos; esta es la razón por la que su uso va en aumento (Guardiola *et al.*, 2002).

La identificación de SOP se puede realizar, inicialmente, mediante la comparación de los correspondientes tiempos de retención relativos (*relative retention times*, RRT), pero debe confirmarse mediante EM por impacto electrónico. Existen muchos trabajos donde se describen los espectros de masas de SOP, derivatizados o sin derivatizar, obteniendo así los iones característicos de los SOP más comunes, lo cual resulta muy útil para la identificación de los compuestos. Los patrones de fragmentación y espectros de masas de COP han sido revisados por Park y Addis (1992) y Addis *et al.* (1996). También se han publicado los espectros de masas de los POP (Dutta, 1997; Dutta y Appelqvist, 1997; Lampi *et al.*, 2002; Dutta, 2002).

- *Cuantificación*: En la cuantificación de los SOP se usa, generalmente, patrón interno (PI) (Apprich y Ulberth, 2004; Guardiola *et al.*, 2004), para compensar la pérdida de analito durante el procesado de la muestra. El 5α -colestano es uno de los PI más utilizados (Dutta y

Appelqvist, 1997; Oehrl *et al.*, 2001; Grandgirard *et al.*, 2004a; Louter, 2004), sin embargo, al no poseer grupo hidroxilo es menos polar que los SOP, por lo que no puede añadirse antes de la purificación. En este caso se utilizan otros PI, como 19-hidroxicolesterol, 6-cetocolesterol o 5 α -androstano-3 β -ol-17-ona que, al ser de polaridad similar a los SOP, pueden adicionarse al inicio del tratamiento de la muestra. El 19-hidroxicolesterol es el PI más comúnmente usado, sin embargo, no está exento de problemas: la separación de la línea base puede que no sea buena, dependiendo de las condiciones cromatográficas, si hay 7 α -hidroxicampesterol presente (Grandgirard *et al.*, 2004d). Aún así, es el mejor compuesto de elección porque tiene un comportamiento bastante similar a los SOP y puede añadirse a las muestras antes de la saponificación, por lo que compensa las pérdidas que se puedan producir a lo largo del proceso (Zhang *et al.*, 2005a).

Guardiola *et al.* (1995b) estudian cuatro compuestos como potenciales PI en la determinación de COP, resultando que el 19-hidroxicolesterol es el PI más fiable cuando la purificación se realiza con un cartucho de sílice. Algunos autores usan dos PI, añaden uno en los primeros estadios del análisis y otro antes de la silanización (Dutta, 1997; Lampi *et al.*, 2002). En los últimos años se ha señalado el uso de COP y colesterol como PI en la determinación de POP (Lampi *et al.*, 2002; Bortolomeazzi *et al.*, 2003) y el de los correspondientes COP deuterados, es decir, donde de 3 a 6 átomos de hidrógeno se han sustituido con deuterio, en la determinación de COP (Dzeletovic *et al.*, 1995), siendo éste último un método muy fiable aunque caro y laborioso.

En la cuantificación mediante PI, deberían establecerse los factores de respuesta relativos (*relative response factors*, RRF) y la linealidad de la respuesta para cada componente. La calibración del

CG para el análisis de POP constituye, sin embargo, un reto debido a la ausencia de patrones puros comercializados de POP, y para una calibración exacta, se deben sintetizar. Los POP, se preparan en el laboratorio, a partir de patrones de fitosteroles, lo que permite la formación de algunos óxidos (Daly *et al.*, 1983; Bortolomeazzi *et al.*, 1999; Grandgirard *et al.*, 2004a; Conchillo *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005b; McCarthy *et al.*, 2005).

En la mayoría de los estudios el contenido de un determinado POP se calcula por comparación de su área con el área de una concentración conocida de PI (Dutta y Appelqvist, 1997; Dutta, 1997; Louter, 2004; Conchillo *et al.*, 2005; Johnsson y Dutta, 2006). En otros estudios, las calibraciones se obtienen a partir de COP y, en base a la similitud estructural entre el colesterol y los fitosteroles, los RRF obtenidos para los COP se han aplicado a los POP (Lampi *et al.*, 2002; Apprich y Ulberth, 2004).

En solo dos estudios (Bortolomeazzi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005a), se sintetizan los POP que se utilizan en las calibraciones.

d.2) Cromatografía líquida

La CL se ha usado como una alternativa a la CG por ser una técnica no destructiva; óptima, por lo tanto, para el estudio de compuestos termolábiles como hidroperóxidos de esteroides, y muy versátil, ya que puede utilizarse en fase normal (Chen y Chen, 1994; Caboni *et al.*, 1997), o inversa (Fillion *et al.*, 1991; Razzazi-Fazeli *et al.*, 2000), y acoplada a distintos detectores (universales o específicos). La posibilidad de conectar dos detectores en línea distintos, potencia sus posibilidades (Rodríguez-Estrada y Caboni, 2002).

- *Derivatización*: La derivatización en la determinación de SOP por CL, está menos difundida que en CG. El aumento del uso de detectores como ELSD y EM disminuye la necesidad de la derivatización para aumentar la absorción UV y fluorescencia de SOP, mientras que la derivatización para incrementar la fluorescencia y quimioluminiscencia de hidroperóxidos de esteroides y de ésteres de esteroides está más extendida (Rodríguez-Estrada y Caboni, 2002; Säynäjoki *et al.*, 2003).

- *Separación*: La separación de SOP por CLAR en fase normal se ha aplicado a tejidos animales (Csallany *et al.*, 1989), FL y papillas de cereales y leche (Zunin *et al.*, 1990) (columna de sílice), pescados y mariscos (Saldanha *et al.*, 2006; Sampaio *et al.*, 2006) y productos cárnicos (Baggio y Bragagnolo, 2006) (columna de ciano). La fase inversa se ha utilizado para la determinación de SOP en leche humana, FL y papillas de cereales (Zunin *et al.*, 1998; Scopesi *et al.*, 2002) y distintos alimentos procesados ricos en grasa (Razzazi-Fazeli *et al.*, 2000) (columna de octadecil).

El sistema de detección más popular es el espectrofotométrico UV, pero algunos COP (epoxicolesteroides y colestanoetriol) no absorben en el UV y otros, como 7-cetocolesterol, muestran una sensibilidad mayor que los hidroxicolesteroides debido a los dobles enlaces conjugados (Csallany *et al.*, 1989). Por lo tanto, en el análisis de COP con detección UV debe utilizarse el intervalo UV bajo (206 nm) lo que es una tarea difícil si se consideran las bajas concentraciones a las que suelen encontrarse (Razzazi-Fazeli *et al.*, 2000). El detector de ELSD tiene una sensibilidad similar al UV; el EM es más sensible, pero como prerrequisito debe darse una ionización eficiente, y se suele utilizar con CL en fase inversa porque muestra una mayor

repetibilidad y favorece la ionización positiva (Osada *et al.*, 1999; Rodríguez-Estrada y Caboni 2002).

La CLAR con detección electroquímica se ha empleado para la separación y determinación de hidroperóxidos de colesterol (Korytowski y Bachowski, 1991), los correspondientes hidróxidos no se reducen bajo las condiciones empleadas y, por lo tanto, no interfieren en el análisis. Para la determinación simultánea de óxidos de colesterol, se debe emplear un segundo detector en serie con el electroquímico (Brown *et al.*, 1997) o emplear una combinación de UV y ELSD (Caboni *et al.*, 1997).

La combinación de CLAR con EM es una buena opción para la determinación de compuestos traza que o son demasiado polares o demasiado lábiles para ser analizados por CG-EM sin derivatización previa. La CL unida a ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI)-EM/EM, se ha usado para la determinación de COP en alimentos y muestras biológicas sin derivatización previa (Manini *et al.*, 1998; Razzazi-Fazeli *et al.*, 2000; Burkard *et al.*, 2004; Raith *et al.*, 2005). Sin embargo, la identificación inequívoca es difícil debido a que la energía empleada en la disociación inducida por colisión (*collision-induced dissociation*, CID) es insuficiente para romper los enlaces carbono-carbono en los esteroides (Raith *et al.*, 2005), por lo que una buena separación de la línea base es mucho más importante que para CL-EM y CG-EM. El detector ionización mediante electrospray (*electrospray ionization*, ESI)-EM es, en general, más sensible que el APCI-EM para compuestos con grupos polares, como los esteroides, pero los SOP, que son relativamente no polares, se deben derivatizar (mediante la inserción de un grupo más polar que un hidroxilo o un grupo con carga) para aumentar su eficiencia en la ionización. Los derivados pueden ser, entonces, analizados por ESI-EM y/o desorción/ionización

mediante láser asistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI)-EM con una gran sensibilidad (Liu *et al.*, 2000; Griffiths *et al.*, 2003; Griffiths *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007).

- *Cuantificación*: En la cuantificación de COP se puede utilizar tanto PI como externo. Los PI más utilizados son los mismos que en CG, además de 7-cetopregnenolona, aunque el método más usado es el de patrón externo. Es de resaltar el hecho de que cuando se usa el detector UV, se necesita más de un patrón, por la distinta intensidad de respuesta que tienen los COP frente a este detector.

F. EVALUACIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN ALIMENTOS INFANTILES

Son varios los estudios hallados en la bibliografía relativos a la evaluación de la oxidación lipídica en alimentos infantiles y especialmente en FL de base láctea en polvo (cuadro nº 10).

El ensayo de TBARS, con distintas variantes, se utiliza frecuentemente como parámetro clásico para evaluar el estado de la fracción lipídica, bien por sí solo (Botsoglou *et al.*, 1994; Cesa, 2004) o en combinación con otras determinaciones de las distintas fases de oxidación lipídica: primaria (dienos conjugados, índice de peróxidos (IP)) (Turoli *et al.*, 2004; Manglano *et al.*, 2005) y secundaria (hexanal) (Giammarioli *et al.*, 1997).

Recientemente, se han evaluado los cambios en la fracción lipídica de FL durante un almacenamiento prolongado (Rodríguez-Alcalá *et al.*, 2007), mediante el análisis de las pérdidas de los ácidos oleico y linoleico y tocoferoles, y el aumento de compuestos polares no volátiles.

También se hallan estudios que determinan aldehídos volátiles (butanal, propanal, pentanal, hexanal y heptanal) mediante el análisis del espacio de cabeza de la muestra (Giammarioli *et al.*, 1995; Fenaille *et al.*, 2003; Romeu-Nadal *et al.*, 2004; van Ruth *et al.*, 2006) y, en algunas ocasiones, lo relacionan con otros parámetros, como índice de *p*-anisidina, IP, ... (Roozen y Linssen, 1992; Ulberth y Roubicek, 1995; Romeu-Nadal *et al.*, 2007).

La oxidación de la fracción lipídica, iniciada durante la elaboración, en las FL y papillas de cereales con leche se evalúa mediante la determinación de COP (Evangelisti *et al.*, 1999), así como de MDA y hexanal (Fenaille *et al.*, 2006), relacionándose con parámetros de la RM (furosina, lisinoalanina, N^ε-(carboximetil)lisina, lisina bloqueada, ...).

La determinación de SOP se ha centrado, especialmente, en el estudio del contenido en COP en FL (Angulo *et al.*, 1998; Rose-Sallin *et al.*, 1995; Przygonski *et al.*, 2000; Scopesi *et al.*, 2002; Calvo *et al.*, 2003). En papillas de cereales con leche y en alimentos infantiles con ingredientes no lácteos se han determinado COP (Sander *et al.*, 1989; Evangelisti *et al.*, 2004) y como POP, el 7-cetositosterol (Zunin *et al.*, 1990, 1998 y 2006), pero no se encuentra, hasta la fecha, referencia de trabajo alguno que determine los POP de otros fitosteroles en alimentos infantiles.

En el cuadro nº 10 se recogen trabajos realizados en alimentos infantiles sobre la evaluación de la oxidación lipídica.

Cuadro n° 10. Evaluación de la oxidación lipídica en alimentos infantiles. Estudios realizados.

Análito	Tipo de alimento infantil	Modo operativo	Referencia
MDA.	FL	Eliminación de interferencias con TCA; adición de TBA; incubación a 70 °C, 30 min; determinación: Espectrofotometría de la tercera derivada ($\lambda = 521.5$ nm).	Botsoglou <i>et al.</i> , 1994
MDA. Otros: Capacidad antioxidante, dienos conjugados, IP.	FL lácteas líquidas	Incubación de la muestra con TBA a 100 °C, 15 min; determinación: Espectrofotometría ($\lambda = 532$ nm).	Turoli <i>et al.</i> , 2004
MDA.	FL lácteas en polvo	Eliminación de interferencias con TCA; adición de TBA; incubación a 70 °C, 30 min; determinación: Espectrofotometría de la tercera derivada ($\lambda = 526$ nm).	Cesa, 2004
MDA. Otros: IP, hidroperóxidos.	FL lácteas en polvo	Eliminación de interferencias con TCA (Angulo <i>et al.</i> , 1998); adición de TBA; incubación a 80 °C, 1h; determinación: Espectrofluorimetría ($\lambda_{\text{ex}} = 515$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 553$ nm).	Mangano <i>et al.</i> , 2005
MDA y hexanal. Otros: Ácido linoleico, IP.	FL lácteas de inicio en polvo	<i>MDA</i> : Destilación de la muestra (Holland, 1971); reacción del destilado con TBA; determinación: Espectrofotometría. <i>Hexanal</i> (Giammaroli <i>et al.</i> , 1995): Espacio de cabeza estático; equilibrado: 80 °C, 1 h; determinación: CG-FID y CG-EM.	Giammaroli <i>et al.</i> , 1997.
MDA y hexanal. Otros: Furosina, CML y LAL.	FL lácteas en polvo y líquidas	<i>MDA</i> (Fenaille <i>et al.</i> , 2001): Eliminación de interferencias con TCA; derivatización: Con fenilhidracina a derivado hidrazona de MDA; PI: <i>d</i> ₂ -MDA; determinación: CG-EM. <i>Hexanal</i> : Como en Fenaille <i>et al.</i> (2003).	Fenaille <i>et al.</i> , 2006
MDA, COP: 7K. Otros: AGE, tocóferoles.	FL en polvo: de base láctea y a base de soja.	<i>MDA</i> : Eliminación de interferencias con TCA; adición de TBA; incubación a 80 °C, 1h; determinación: Espectrofluorimetría ($\lambda_{\text{ex}} = 515$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 535$ nm). <i>COP</i> : PI: 5 α -col; extracción grasa: CF:M (2:1, v/v) (Folch <i>et al.</i> , 1957); saponificación: NaOH 4%/M; Bn (3:2, v/v) (Angulo <i>et al.</i> , 1997); derivatización: HMDS + TMCS; determinación: CG-FID y CG-EM.	Angulo <i>et al.</i> , 1998

108 Cuadro nº 10. Evaluación de la oxidación lipídica en alimentos infantiles. Estudios realizados (continuación).

Analito	Tipo de alimento infantil	Modo operativo	Referencia
TG oxidados, dímeros de TG, diacilgliceroles, AG libres. Otros: AGT, AG.	FL lácteas en polvo: de inicio y continuación.	Extracción grasa: ISO-IDF (2001); separación de compuestos polares por SPE; determinación: HPSEC (Márquez-Ruiz <i>et al.</i> , 2005).	Rodríguez-Alcaíá <i>et al.</i> , 2007
Hexanal. Otros: Índice de <i>p</i> -anisidina	Bases lácteas en polvo para FL	Espacio de cabeza estático; determinación: CG.	Roosen y Linsen, 1992
Hexanal.	FL lácteas en polvo: de inicio, continuación y neonatos; FL de base de soja	Espacio de cabeza estático; equilibrado: 80 °C, 1 h; determinación: CG-FID y CG-EM.	Giammaroli <i>et al.</i> , 1995
Pentanal, hexanal y heptanal. Otros: IP.	FL láctea en polvo	Espacio de cabeza estático del destilado de muestra; PI: Metilbutirato; equilibrado: 60 °C, 1 h; determinación: CG-FID y CG-EM.	Ulberth y Roubicek, 1995
Pentanal, hexanal y heptanal.	FL lácteas en polvo	Espacio de cabeza por SPME; equilibrado: 25 °C, 1h; fibra: PDMS/DVB; extracción: 25 °C, 10 min; determinación: CG-EM. Espacio de cabeza por nariz electrónica-EM; equilibrado 60 °C, 30 min; determinación: EM.	Fenaille <i>et al.</i> , 2003
Propanal, pentanal y hexanal.	FL láctea en polvo enriquecida con AGPI-CL	Espacio de cabeza estático; PI: Acetato de butilo; equilibrado: 60 °C, 15 min; determinación: CG-FID.	Romeu-Nadal <i>et al.</i> , 2004
Butanal, pentanal, hexanal y heptanal. Otros: Compuestos volátiles de las muestras	FL lácteas en polvo y líquidas de inicio y de continuación; FL en polvo a base de soja	Espacio de cabeza por PTR-MS; equilibrado: TA, 20 min; determinación: EM. Espacio de cabeza dinámico; equilibrado: TA, 45 min; purga y trampa; determinación: CG-EM.	Van Ruth <i>et al.</i> , 2006.

Cuadro nº 10. Evaluación de la oxidación lipídica en alimentos infantiles. Estudios realizados (continuación).

Analito	Tipo de alimento infantil	Modo operatorio	Referencia
Propanal, pentanal y hexanal. Otros: IP, AG, análisis sensorial.	FL lácteas en polvo enriquecidas/no enriquecidas con AGPI-CL	Romeu-Nadal <i>et al.</i> , 2004.	Romeu-Nadal <i>et al.</i> , 2007
COP: 7α, 7β, αEp, βEp, triol, 7K, 25-OH. Otros: Colesterol.	FL lácteas en polvo; alimentos infantiles deshidratados a base de verduras y carne; alimentos enlatados (verduras, caldos de carne, maíz y yema de huevo)	Extracción grasa: CF:M (2:1, v/v) (Folch <i>et al.</i> , 1957); PI: 5 α -col; saponificación: KOH 1N/M (Park y Addis, 1987); derivatización: Sylon BTZ; determinación: CG-FID y CG-EM	Sander <i>et al.</i> , 1989
COP: 7K	Líquidas: FL lácteas de inicio y de continuación y papillas de cereales y leche; lácteas en polvo; FL para neonatos y FL baja en lactosa	Extracción grasa: H: Isop (Hara y Radin, 1978); PI: 7K-preg; aislamiento de COP: cromatografía en columna con Florisil; determinación: CLAR-UV ($\lambda = 233$ nm).	Zunin <i>et al.</i> , 1990
COP: 7α, 7β, triol, 7K, 25-OH. Otros: Colesterol	FL lácteas en polvo	Saponificación: KOH 1N/M; PI: 19OH; purificación: SPE con LC-NH ₂ ; PI: 5 α -col; derivatización: BSTFA + TMCS; determinación: CG-EM.	Rose-Sallin <i>et al.</i> , 1995
COP: 7K; SOP: 7K-sit. Otros: Colesterol y β -sitosterol.	En polvo: FL lácteas de inicio y de continuación y papillas de cereales y leche	Extracción grasa: H: Isop (Hara y Radin, 1978); PI: α -colestanol; saponificación: KOH 2N/M (Park y Addis, 1986); purificación: SPE con Florisil; determinación: CLAR-DAD (240 nm).	Zunin <i>et al.</i> , 1998
COP: 7K; SOP: 7K-sit. Otros: Furosina, lisina bloqueada, colesterol y β -sitosterol.	FL lácteas de inicio y de continuación y papillas de cereales y leche	Extracción grasa: H: Isop (Hara y Radin, 1978); PI: α -colestanol; saponificación: KOH 2N/M (Park y Addis, 1986); purificación: SPE con Florisil; determinación: CLAR-DAD (240 nm).	Evangelisti <i>et al.</i> , 1999

110 Cuadro nº 10. Evaluación de la oxidación lipídica en alimentos infantiles. Estudios realizados (continuación).

Analito	Tipo de alimento infantil	Modo operatorio	Referencia
COP: 7α, 7β, αEp, triol, 7K, 25-OH.	FL lácteas	Extracción grasa: CF:M (2:1, v/v) (Folch et al., 1957); transesterificación: Metilato sódico; purificación: SPE con LC-NH ₂ ; derivatización: BSTFA + TMCS; PI: 19-OH; determinación: CG-FID y CG-EM.	Przygonski et al., 2000
COP: 7K. Otros: Colesterol.	Leche humana y FL lácteas de inicio líquidas y en polvo	Extracción grasa: H:Isop (Hara y Radin, 1978); PI: α -colestanol; saponificación: KOH 2N/M (Park y Addis, 1986); purificación: SPE con Florisil; determinación: CLAR-DAD (240 nm).	Scopesi et al., 2002
COP: 25-OH, 7K. Otros: Colesterol.	FL lácteas en polvo de inicio y de continuación y leches líquidas de crecimiento	Extracción grasa: H:Isop (Hara y Radin, 1978); PI: 19-OH; saponificación: KOH 2N/M (Fraga et al., 2000); purificación: SPE con LC-NH ₂ (Kaluzny et al., 1985); determinación: CG-EM	Calvo et al., 2003
COP: 7α, 7β, αEp, βEp, triol, 7K, 25-OH. Otros: Colesterol.	Alimentos infantiles a base de carne homogeneizados y liofilizados	Extracción grasa: CF:M (2:1, v/v) (Folch et al., 1957); PI: 19-OH y β -colestanol; saponificación: KOH 1N/M; purificación: SPE con Florisil; derivatización: Sylon BFT; determinación: CG-EM.	Evangelisti et al., 2004.
COP: Triol, 7K; POP: 7K-sit. Otros: Colesterol, β -sitosterol y AG.	Alimentos infantiles a base de carne y de pescado homogeneizados con aceites vegetales	Extracción grasa: CF:M (2:1, v/v) (Folch et al., 1957); PI: 19-OH y β -colestanol; saponificación: KOH 1N/M; purificación: SPE con Florisil; derivatización: Sylon BFT; determinación: CG-EM.	Zunin et al., 2006

FL: Fórmulas para lactantes; COP: Productos de oxidación del colesterol; AGE: Ácidos grasos esenciales; TG: Triglicéridos; AG: Ácidos grasos; AGT: Ácidos grasos *trans*; HPSEC: Cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución; Bn: Benceno; HMDs: Hexametildisilazano; 7 α : 7 α -Hidroxicolestero; 7 β : 7 β -Hidroxicolestero; α Ep: α -Epoxicolestero; β Ep: β -Epoxicolestero; triol: Colestanotriol; 7K: 7-Cetocolestero; 25-OH: 25-Hidroxicolestero; CF: Cloroformo; PI: Patrón interno; 5 α -col: 5 α -Colestano; H: Hexano; Isop: Isopropanol; 7k-preg: 7-Cetopregnenolona; CLAR: Cromatografía líquida de alta resolución; MDA: Malondialdehído; TCA: Ácido tricloroacético; TBA: Ácido tiobarbitúrico; SOP: Productos de oxidación de los esteroles; 7k-sit: 7-Cetositosterol; DAD: Diode-array detector; BSTFA: N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida; TMCS: Trimetilclorosilano; 19-OH: 19-Hidroxicolestero; M: Metanol; SPE: Extracción en fase sólida; CG-EM: Cromatografía de gases-espectrometría de masas; LC-NH₂: Aminopropilo; SPME: Microextracción en fase sólida; PDMS/DVB: Polidimetilsiloxano/divinilbenceno; AGPT-CL: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; IP: Índice de peróxidos; PTR-MS: Protón transfer reaction-mass spectrometry; LAL: Iminoalanina; CML: N^ε-(carboximetil)lisina.

PARTE EXPERIMENTAL

EXPERIMENTAL SECTION

A. MUESTRAS

A.1. RELACIÓN DE MUESTRAS

Se dispone para este estudio de dos muestras de papillas compuestas por leche y cereales, que difieren en un ingrediente minoritario:

- Muestra **A**: contiene miel
- Muestra **B**: contiene frutas (plátano, naranja y manzana).

Además, se dispone de seis tipos de fórmulas para lactantes (FL) en polvo:

- Cuatro FL adquiridas en establecimientos de venta (**C**, **D**, **E** y **F**): las muestras C y D son FL de inicio y ésta última contiene aceites de pescado para proporcionar AGPI-CL; las muestras E y F son FL de continuación. De cada FL se adquieren muestras correspondientes a dos lotes de fabricación distintos y a dos tiempos de almacenamiento distintos (4 y 7 meses).
- Una FL de continuación (**G**), proporcionada por una empresa del sector: almacenada a 25, 30 y 37 °C durante 0, 1 y 2 meses.

A.2. DESCRIPCIÓN DE LAS PAPILLAS DE CEREALES CON LECHE

A.2.1. Ingredientes

Las materias primas utilizadas en la fabricación de las muestras A y B son:

- Leche desnatada en polvo secada por atomización (88%). El proceso al que se somete la leche comprende las siguientes etapas: pasteurizado, desnatado, concentrado, enfriado, mezclado con la grasa, pasteurización, homogeneización, secado por atomización.
- Harina de 8 cereales (trigo, maíz, arroz, avena, cebada, centeno, sorgo y mijo) hidrolizada con α -amilasa y tostada (8.8%)
- Frutas (plátano, manzana y naranja) en forma de copos deshidratados (sólo en muestra B, 1.1%)
- Miel (sólo en muestra A, 0.9%)
- Mezcla de vitaminas (A, B₁, B₂, niacina, ácido pantoténico, B₆, biotina, ácido fólico, B₁₂, C y D)
- Mezcla de minerales (calcio, fósforo y hierro)
- Azúcar
- Aceites vegetales
- Aroma de vainilla (sólo en muestra A)
- Aromas naturales (sólo en muestra B)

A.2.2. Composición

El valor energético y los principios inmediatos se muestran en el cuadro nº 11. Los contenidos de vitaminas y minerales se muestran en el cuadro nº 12. Todos los datos corresponden a lo indicado por el fabricante en el etiquetado.

La actividad del agua (a_w) de ambas muestras, medida a 24 °C, al inicio y al final del estudio es de 0.992 ± 0.004 .

Cuadro n° 11. Descripción de las papillas de cereales con leche. Valor energético y principios inmediatos.

		Muestra A	Muestra B
Energía	kcal/100 g	96.1	97
Proteínas	g/100 g	3.5	3.5
Hidratos de carbono	g/100 g	15.7	15.8
Grasas	g/100 g	2.6	2.6

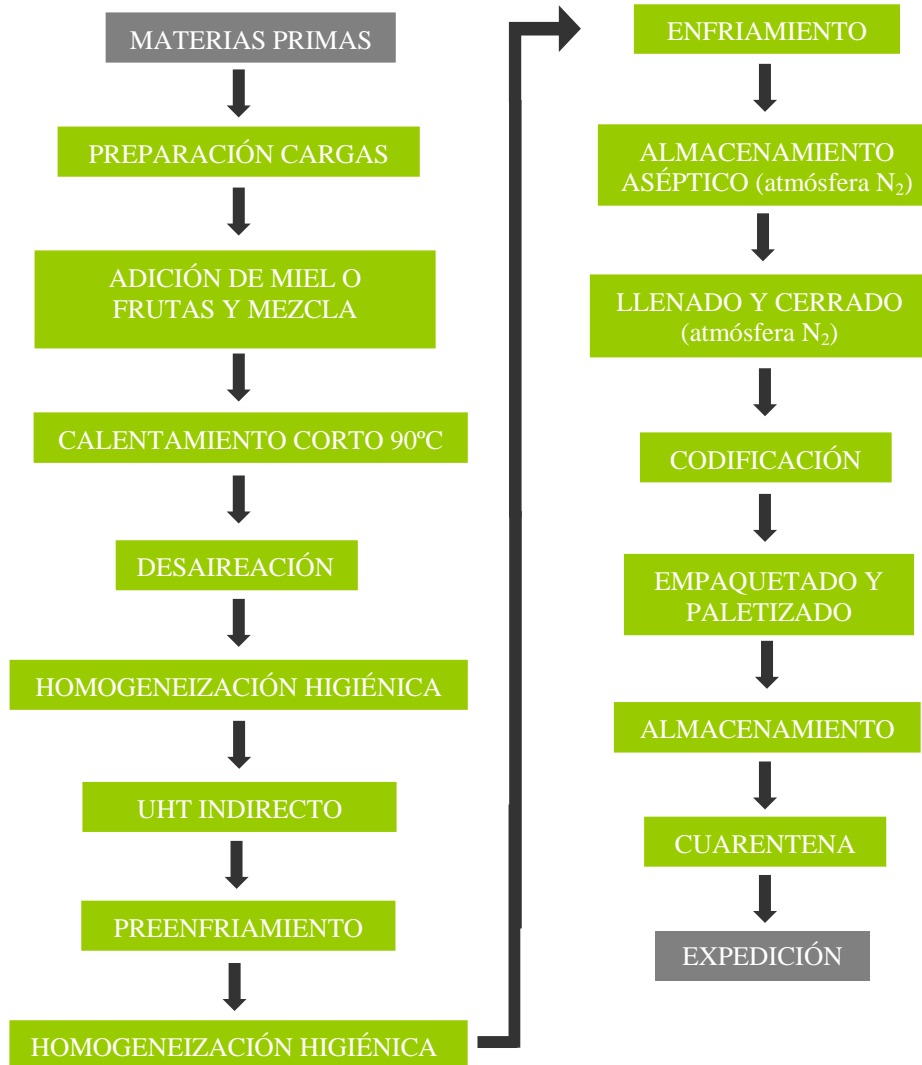
Cuadro n° 12. Descripción de las papillas de cereales con leche. Contenidos de vitaminas y minerales (por 100 g).

Vitaminas		Minerales	
A (µg)	82.1	Sodio (mg)	54.0
D (µg)	1.3	Calcio (mg)	118.0
E (µg)	1.1	Cinc (mg)	0.4
C (mg)	9.7	Fósforo (mg)	108.0
B ₁ (mg)	0.2	Hierro (mg)	1.1
B ₂ (mg)	0.1	Yodo (µg)	6.5
Ácido pantoténico (mg)	0.4		
Niacina (mg)	1.1		
B ₆ (mg)	0.1		
Ácido fólico (µg)	15.0		
B ₁₂ (µg)	0.2		
Biotina (µg)	6.5		

A.2.3. Fabricación

En la figura nº 10 se esquematiza el proceso de elaboración de estas muestras.

Figura nº 10. Descripción de las papillas de cereales con leche. Diagrama de fabricación.



A.2.4. Muestreo

Para conocer la influencia del tiempo y de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad de la fracción lipídica de las papillas, se aplica un diseño factorial completo que consta de 3 factores, con distinto número de niveles:

- a) Tiempo de almacenamiento con 8 niveles (0, 1, 2, 4, 5, 7, 8 y 9 meses)
- b) Temperatura de almacenamiento con 3 niveles (25, 30 y 37 °C)
- c) Tipo de muestra con 2 niveles (muestras A y B)

Las muestras de papillas se almacenan a 25, 30 y 37 °C en la empresa elaboradora, que las envía en la fecha correspondiente a cada punto de muestreo. Tras la recepción y hasta el momento de su análisis las muestras se mantienen a 4 °C. En cada punto de muestreo y para cada determinación se elige, de modo aleatorio, un brik de cada temperatura y de cada tipo de muestra.

Se realiza un mínimo de tres determinaciones de cada uno de los parámetros analíticos considerados tomando tres alícuotas de un mismo brik. En el caso de la determinación del contenido en SOP, se realiza una extracción lipídica por muestra, y cada parámetro se determina por triplicado para cada extracción.

El estudio abarca un periodo total de almacenamiento de 9 meses. En el cuadro nº 13 se indica la correspondencia entre punto de muestreo y mes de almacenamiento.

Cuadro nº 13. Descripción de las papillas de cereales con leche. Diseño experimental. Puntos de muestreo.

Puntos de muestreo	Meses de almacenamiento
0	0
1	1
2	2
3	4
4	5
5	7
6	8
7	9

A.2.5. Parámetros a determinar a lo largo del estudio

Se estudian la fracción lipídica y los productos de degradación de ésta que puedan limitar su periodo de vida útil.

Los parámetros que se determinan son:

- Composición cuali y cuantitativa de AG y esteroides.
- Productos secundarios de degradación de la fracción lipídica: TBARS, volátiles (pentano, pentanal, hexanal y heptanal) y SOP.

A.3. DESCRIPCIÓN DE LAS FÓRMULAS PARA LACTANTES

A.3.1. Ingredientes

Los ingredientes utilizados en la fabricación de las muestras C, D, E y F son:

- Suero lácteo desmineralizado
- Aceites vegetales
- Leche descremada
- Lactosa
- Minerales
- Lecitina
- Colina, taurina, inositol y carnitina
- Vitaminas (C, B₁, B₂, niacina, ácido pantoténico, B₆, A, ácido fólico, K, biotina, B₁₂, D₃ y E)
- Aminoácidos (arginina, histidina y triptófano) (en muestras C y D)
- Maltodextrinas (en muestras E y F)
- Nucleótidos (en muestras D y F)
- Grasa láctea (sólo en muestra D)
- Proteínas de suero lácteo desmineralizado enriquecidas con α -lactalbúmina (sólo en muestra D)
- Fosfolípidos de huevo (sólo en muestra D)
- Aceites de pescado (sólo en muestra D)
- Galacto-oligosacáridos (sólo en muestra F)
- Fermentos lácticos (sólo en muestra F, 0.12%)

A.3.2. Composición

El valor energético y los principios inmediatos se muestran en el cuadro nº 14; los contenidos de ácido linoleico y α -linolénico, que cumplen los niveles máximos y mínimos regulados por la Directiva 2006/141/CE, se muestran en el cuadro nº 15. Los contenidos de vitaminas y minerales se muestran en los cuadros nº 16 y 17, respectivamente. Todos los datos corresponden a lo indicado por el fabricante en el etiquetado.

Cuadro nº 14. Descripción de las fórmulas para lactantes. Valor energético y principios inmediatos.

		Muestras			
		C	D	E	F
Energía	kcal/100 g	522	516	500	485
	Kcal/100ml*	68	67	70	68
Proteínas	g/100 g	10.2	10.2	15	15
HC	g/100 g	55.2	56.9	53.7	49.9
Grasas	g/100 g	29.0	27.5	25	25

(*de fórmula infantil reconstituida al 13%; HC: hidratos de carbono)

Cuadro nº 15. Descripción de las fórmulas para lactantes. Contenidos de ácido linoleico y α -linolénico.

Ácido		Muestras		
		C	D	E y F
Linoleico	mg/100 g	4510	4129.5	3890
	mg/100 ml	586.3	536.8	544.6
α -Linolénico	mg/100 g	430	311.8	370
	mg/100 ml	55.9	40.5	51.8

Cuadro n° 16. Descripción de las fórmulas para lactantes. Contenidos (por 100 g) de vitaminas.

	Muestras		
	C	D	E y F
Vitamina A (μg)	523.0	523.0	497.0
Vitamina D (μg)	7.8	7.8	7.4
Vitamina E (mg)	7.8	7.8	7.4
Vitamina K (μg)	52.0	52.0	49.4
Vitamina C (mg)	52.0	52.0	49.4
Vitamina B ₁ (μg)	523.0	523.0	496.8
Vitamina B ₂ (μg)	785.0	785.0	745.7
Ácido pantoténico (μg)	2353.0	2353.0	2235.3
Niacina (mg)	5.2	5.2	4.9
Vitamina B ₆ (μg)	523.0	523.0	497.0
Ácido fólico (μg)	78.0	78.0	74.1
Vitamina B ₁₂ (μg)	2.1	2.1	2.0
Biotina (μg)	16.0	16.0	15.2

Cuadro n° 17. Descripción de las fórmulas para lactantes. Contenidos (por 100 g) de minerales.

	Muestras		
	C	D	E y F
Sodio (mg)	130.0	154.0	250.0
Potasio (mg)	497.0	495.0	850.0
Cloro (mg)	366.0	326.0	550.0
Calcio (mg)	392.0	387.0	600.0
Cinc (mg)	4.2	4.2	4.0
Fósforo (mg)	220.0	246.0	425.0
Relación Ca/P	1.8	1.6	1.4
Magnesio (mg)	42.0	46.0	60.0
Hierro (mg)	6.3	6.6	9.0
Cobre (µg)	314.0	314.0	300.0
Yodo (µg)	78.0	78.0	75.0
Selenio (µg)	7.0	7.0	7.0

B. MÉTODOS DE ANÁLISIS SELECCIONADOS

(En cada apartado se indicarán los reactivos más específicos, véase el resto de instrumentación, material y reactivos en los anexos II, IV y V, respectivamente)

B.1. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA

Reactivos

- Mezcla cloroformo:metanol (1:1, v/v)
- Cloruro de potasio (KCl) 1 M (disolución acuosa)

Modo operatorio

Para la extracción de la fracción grasa de las papillas de cereales con leche se utiliza una modificación (Boselli *et al.*, 2001) del método de Folch *et al.* (1957): A 50 g de muestra contenidos en un frasco cilíndrico de vidrio Pyrex con tapón roscado de 500 ml, se le añaden 200 ml de una mezcla cloroformo:metanol (1:1, v/v), se homogeniza con un UltraTurrax durante 3 min y se mantiene en estufa a 60 °C durante 20 min.

A continuación, se añaden 100 ml de cloroformo, se homogeneiza de nuevo durante 2 min y la muestra se centrifuga a 2500 rpm durante 8 min. La fase orgánica obtenida se transfiere a otro frasco de vidrio Pyrex de 500 ml, se le añaden 100 ml KCl 1M, se agita vigorosamente durante 1 min y se deja en refrigeración durante toda la noche.

Al día siguiente, el contenido del frasco se transfiere a un embudo de decantación y se deja en reposo hasta separación de las fases. Entonces, se recoge en otro frasco cilíndrico de vidrio la fase orgánica, se le adicionan tres cucharadas de sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4) granulado y se mantiene en refrigeración durante 2 h. Transcurrido este tiempo, se filtra por papel plegado con Na_2SO_4 anhidro y se recoge en un matraz de 500 ml previamente tarado. El disolvente se evapora en un rotavapor con el baño a 40 °C y se pesa el matraz.

B.2. DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO

B.2.1. Papillas de cereales con leche

El perfil lipídico de las papillas se determina en muestras recién fabricadas.

Reactivos

- Diazometano: Preparado a partir de *p*-toluensulfonilnitrosometilamida (Diazald®), monoetiléter de dietilenglicol, éter dietílico no estabilizado, hidróxido potásico (KOH) según el método descrito en Fieser y Fieser (1967).
- KOH 2N en metanol
- PI éster metílico del ácido tridecanoico (C13-EMAG) 10.3 mg/ml en hexano.

Modo operatorio

a). Extracción de la fracción grasa

Se aplica la metodología descrita en el apartado B.1.

b). Obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (EMAG)

Unos 10 mg de grasa son metilados dos veces con 100 μ l de diazometano, para metilar los AG libres, y, después, se realiza una transesterificación con 20 μ l de KOH 2N en metanol, para metilar los glicéridos (Reglamento (CE) 796/2002). A continuación, se añaden 1 mg de C13-EMAG como PI (100 μ l de una disolución de 10.3 mg/ml) y 0.5 ml de hexano. La muestra se agita, se centrifuga a 2000 x g durante 3 min y 1 μ l del sobrenadante se inyecta en el CG-FID. Las

condiciones cromatográficas aplicadas se muestran en el cuadro nº 18.

Los distintos AG se identifican mediante comparación de su tiempo de retención con los correspondientes a una mezcla de patrones de EMAG (GLC 463, Nu-Chek); la cuantificación se realiza por comparación de las áreas cromatográficas del PI y su concentración y las áreas de los picos de los AG en los cromatogramas de las muestras. El factor de respuesta de los AG cuantificados se considera igual a 1.

Cuadro nº 18. Determinación del perfil lipídico. Condiciones cromatográficas aplicadas a las papillas de cereales con leche.

Aparato	HRGC Fractovap 4160, Carlo Erba®
Columna	RTX 2330, 30 m x 0.25 mm; f.e: 0.2 µm, Restek®
Programa del horno	T ₁ = 60 °C, ΔT ₁ = 4 °C/min; T ₂ = 240 °C; t ₂ = 20 min
Gas portador (He) (ml/min)	1.25
Inyector (°C)	240
Split	1:42
Detector (°C)	240

(T: Temperatura; t: tiempo)

B.2.2. Fórmulas para lactantes

El perfil lipídico de las FL se determina en muestras recién fabricadas.

Reactivos

- Carbonato potásico (K_2CO_3) al 6% (disolución acuosa).
- Mezcla metanol:hexano (4:1, v/v).
- PI tripentadecanoína (C15) 2 mg/ml en hexano.
- PI ácido tricosanoico (C23) 2 mg/ml en metanol:hexano (4:1, v/v).

Modo operatorio

Para la determinación del perfil lipídico de las FL los EMAG se preparan directamente con las muestras en polvo. Se aplica el método de Lepage y Roy (1986) de derivatización por transesterificación en una única etapa. En un tubo de ensayo de 10 ml de vidrio Pyrex con tapón roscado se introducen 50 mg de las FL, como PI se añaden 0.6 mg de C15 (300 μ l de una disolución de 2 mg/ml) y 0.3 mg de C23 (150 μ l de una disolución de 2 mg/ml). A continuación, se añaden 2 ml de una mezcla metanol:hexano (4:1, v/v), se agita y se adicionan 200 μ l de cloruro de acetilo.

Los tubos, bien cerrados, se mantienen en baño de agua a 80 °C durante una hora, tras dejar enfriar los tubos en un baño agua-hielo, se añaden 5 ml de una disolución acuosa de K_2CO_3 al 6% y 1 ml de hexano para favorecer la extracción de los EMAG.

A continuación, los tubos se centrifugan a 1500 x g y 10 °C durante 20 min. La fase superior hexánica, que contiene los EMAG, se transfiere a un vial de 1.5 ml de capacidad. 1 μ l del extracto hexánico se inyecta en el CG-FID aplicando las condiciones descritas en el cuadro nº 19. Cada muestra se analiza por triplicado.

Los distintos ácidos grasos se identifican por comparación de su tiempo de retención con los correspondientes a patrones y se calculan sus porcentajes de área con respecto al total de AG.

Cuadro nº 19. Determinación del perfil lipídico. Condiciones cromatográficas aplicadas a las fórmulas para lactantes.

Aparato	Autosystem XL, Perkin-Elmer®
Columna	SP-2560, 100 m x 0.25 mm; f.e: 0.2 µm, Supelco®
Programa del horno	T ₁ = 80 °C, t ₁ = 5 min; ΔT ₁ = 10 °C/min; T ₂ = 160 °C; ΔT ₂ = 6 °C/min; T ₃ = 200 °C, t ₃ = 20 min; ΔT ₃ = 5 °C/min; T ₄ = 230 °C, t ₄ = 50 min.
Inyector	T ₁ = 70 °C, t ₁ = 0.5 min; ΔT ₁ = máxima potencia; T ₂ = 250 °C
Gas portador (H₂) (psi)	22
Split	1:70
Detector (°C)	250

(T: Temperatura; t: tiempo)

B.3. DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

B.3.1. Ensayos preliminares. Selección del método

Reactivos

- BHT 58 µg/ml en etanol 95-96%.
- BHT al 2% en etanol 95º-96º.
- TEP 0.1 mM en etanol 95º-96º.

- TEP 32.4 μ M (disolución acuosa).
- HCl 0.25 N (disolución acuosa).
- HCl 4 N (disolución acuosa).
- TBA 0.02 M en ácido acético: agua (9:1, v/v).
- TBA al 0.6% en HCl 0.25 N.
- TCA al 10% (disolución acuosa).

a). Determinación de TBARS con TCA (Angulo, 1997)

Inicialmente se aplica a las muestras el procedimiento utilizado por Angulo (1997) y modificado por Manglano (1999) para FL.

Modo operatorio

A 2 g de muestra se le adicionan 0.5 ml de agua destilada, 2 ml de BHT al 2% en etanol, 2 ml de TCA al 10% en agua y 2 ml de TBA al 0.6% en HCl 0.25 N. Se agita y se calienta a 80 °C (en baño de agua) durante una hora, a continuación se enfría en baño de agua-hielo y se centrifuga a 3000 x g y 4 °C, durante 30 min.

a. 1). *Ensayo de interferencia de matriz*

Para evaluar el posible efecto de la matriz en la determinación del MDA se hace un ensayo con patrones acuosos y patrones adicionados de matriz.

Como se indica en la revisión bibliográfica (apartado E.3.1), la hidrólisis ácida de TEP produce MDA en una reacción equimolecular, por lo que el TEP se usa como patrón.

Patrones acuosos: Se toman 0, 25, 45, 115, 170 y 230 μ l de la disolución de TEP de 0.1 mM en etanol y se completan hasta 2.3 ml con agua. A dichas disoluciones patrón se les aplica el mismo tratamiento que a las muestras.

Patrones adicionados de matriz: Se toman 0, 20, 40, 100, 150 y 200 μl de la misma disolución de TEP, se completan con agua hasta 0.5 ml y se añaden 1.8 ml de muestra. A las disoluciones obtenidas se les aplica el mismo tratamiento que a las muestras.

Se mide la fluorescencia de patrones y muestras a $\lambda_{\text{excitación}} = 515$ nm y $\lambda_{\text{emisión}} = 553$ nm.

Las ecuaciones de las rectas y sus coeficientes de regresión se muestran en el cuadro nº 20.

Cuadro nº 20. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Ecuaciones de las rectas de calibrado acuosa y adicionada de matriz en la determinación con TCA.

Recta acuosa	$y = 4.320 + 2309.465 x$	$r = 0.988$
Recta matriz	$y = 7.310 + 1021.461 x$	$r = 0.986$

(y: unidades de fluorescencia; x: μmol ; r: coeficiente de correlación)

Las pendientes de las rectas de calibrado se comparan mediante un test "t", para detectar posibles diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellas, lo que indicaría la existencia de interferencias de matriz. Los intervalos de confianza obtenidos para las pendientes no se solapan (acuosa: 1813.811 a 2798.697, matriz: 700.670 a 1342.252). En consecuencia, deberán utilizarse patrones adicionados de matriz o, de forma alternativa, aplicar un método que reduzca o elimine la interferencia.

a.2). Validación del método

Para evaluar la calidad del método se determinan sus parámetros analíticos:

Precisión: Se preparan seis alícuotas de una misma muestra y se les aplica el procedimiento descrito, se utiliza una recta de

calibrado de patrones adicionados de matriz. Se calculan las medias, desviaciones estándar y la precisión expresada como coeficiente de variación (C.V.). Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro nº 21.

Cuadro nº 21. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Ensayo de precisión de la determinación con TCA.

Muestra	Precisión (C.V. %)	Contenido de MDA ($X \pm D.E.$)
Papilla (n = 6)	10.49	8.95 ± 0.94 nmol

(X: media; D.E: desviación estándar; C.V: coeficiente de variación; n = número de alícuotas)

Límite de detección: Se estima a partir de los valores obtenidos en seis blancos, constituidos por 2 ml de agua, y tratados del mismo modo que las muestras.

El límite de detección (L.D.) se calcula aplicando la fórmula: $L.D. = (3 \times D.E.) / b$ (American Chemical Society, 1980); donde: D.E. = desviación estándar de las lecturas de los blancos; b = pendiente de la recta de calibrado

La recta de calibrado, la desviación estándar de las lecturas realizadas y el límite de detección obtenido se muestran en el cuadro nº 22.

Cuadro nº 22. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Límite de detección (L.D.) de la determinación con TCA.

Recta de calibrado	D. E.	L.D.
$y = 7.310 + 1021.461 x$ $r = 0.986$	0.0154	0.02 μ M (2 ng/g muestra)

(D.E: desviación estándar; y: unidades de fluorescencia; x: μ mol; r: coeficiente de correlación)

Exactitud: La exactitud se evalúa mediante ensayos de recuperación del TEP adicionado a la matriz. Se preparan seis alícuotas de la muestra, se les adiciona una cantidad conocida de TEP y se aplica el procedimiento descrito.

El porcentaje de recuperación se calcula aplicando la fórmula: % Recuperación = $(C - C_i) \times 100 / C_{ad}$; donde: C = Contenido de las muestras adicionadas; C_i = Contenido de las muestras sin adicionar; C_{ad} = Contenido de TEP adicionado a las muestras.

En el cuadro nº 23 se muestran los resultados obtenidos.

Cuadro nº 23. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Exactitud de la determinación con TCA.

Presente	Adicionado	Hallado	% Recuperación
	nmol		
		18.74	108.55
		16.27	86.06
6.80	11	19.15	112.25
		17.37	96.03
		15.05	74.99
		15.25	76.78
% Recuperación: 92.44 ± 15.84*			

(* expresado como media ± desviación estándar)

Comparación de parámetros analíticos del método en dos tipos de muestra: En el cuadro nº 24 se comparan los parámetros analíticos del método obtenidos con dos tipos de muestras, FL en polvo (Manglano, 1999) y papillas líquidas. En el primer caso, al no existir interferencia de matriz se utilizan patrones acuosos.

Aunque la recuperación y el límite de detección son aceptables, se decide ensayar otro procedimiento para la determinación de MDA en papillas líquidas debido a la presencia de partículas, procedentes del precipitado, difíciles de eliminar y que interfieren en la medida fluorimétrica.

Cuadro nº 24. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Comparación de parámetros analíticos de la determinación con TCA en fórmulas para lactantes (FL) y papillas líquidas (P_L).

	FL	P _L
Precisión (C.V. %)	8.82	10.49
L.D. en ensayo (µM)	0.025	0.02
% Recuperación*	94.26 ± 16.67	92.44 ± 15.84

(C.V: coeficiente de variación; L.D: límite de detección; * expresado como media ± desviación estándar)

b). Determinación de TBARS mediante destilación (Tarladgis et al., 1960): Ensayos de adaptación del método a papillas

El método de destilación utilizado para la determinación de MDA se basa en el propuesto inicialmente por Tarladgis *et al.* (1960) para muestras de carnes, con modificaciones posteriores de Zipser y Watts (1962), Tarladgis *et al.* (1964) y Pikul *et al.* (1989).

El método de destilación tiene la ventaja de que puede ser aplicado a cualquier tipo de alimento, sin necesidad de una extracción previa de la grasa como en otros métodos y, además, se evitan interferencias con otros componentes de la matriz como puede darse cuando se realiza el ensayo de TBA directamente sobre la muestra o sobre el extracto lipídico.

Modo operatorio

A la muestra se le añade agua destilada y 1 ml de BHT 58 $\mu\text{g/ml}$ en etanol en un matraz de fondo redondo de 250 ml. La mezcla se homogeneiza mediante agitación suave y, tras añadir 2 ml de HCl 4 N, perlas de vidrio y silicona, el matraz con un refrigerante acoplado se coloca sobre una manta calefactora y se procede a destilar.

Se recogen los primeros 50 ml del destilado en un matraz aforado que se mantiene inmerso en un baño agua-hielo para evitar pérdidas por volatilización, se agita bien y se mantiene a 4 °C hasta su utilización.

El destilado se filtra; 5 ml del filtrado se introducen en un tubo de ensayo con rosca y se añaden 5 ml de disolución de TBA 0.02 M en ácido acético: agua (9:1, v/v). El ensayo se realiza por duplicado.

De forma paralela se prepara la recta de calibrado en el intervalo de concentraciones entre 0.13 y 2.05 μM TEP, para ello se toman 0, 20, 50, 75, 150 y 320 μl de la disolución acuosa de TEP y se completan hasta 5 ml con agua destilada. A cada una de las disoluciones patrón se le añaden 5 ml de TBA.

Blanco, problemas y patrones se introducen en un baño de agua a ebullición durante 35 min. Transcurrido este tiempo se enfrían rápidamente sumergiendo en agua fría durante 10 min.

Con el fin de seleccionar la mejor forma de medida se utilizan, inicialmente, un espectrofotómetro y un espectrofluorímetro, y se mide la tercera derivada en el espectrofotómetro.

En la medida de la absorbancia, para confirmar la longitud de onda del máximo se hace un barrido, entre 400 y 600 nm, con un patrón frente al blanco; la absorbancia se mide en el máximo obtenido a 530 nm. En el espectrofluorímetro se hace un barrido de emisión ($\lambda_{\text{emisión}} = 400$ a 600 nm y $\lambda_{\text{excitación}} = 515$ nm), y se observa un

máximo de emisión a $\lambda = 545$ nm que corresponde al complejo MDA-TBA formado y se selecciona para las lecturas.

b.1). Ajustes realizados sin muestra

Se comienza por hacer ensayos de recuperación del patrón (TEP) en agua. Se ensaya con distintos: volúmenes de agua (97 y 197 ml), pH (de 0.79 a 1.5, ajustados con HCl 4 N) y μ moles adicionados (2.05 y 4.80).

Las destilaciones se realizan según se ha descrito y se mide por fluorimetría ($\lambda_{\text{excitación}} = 515$ nm y $\lambda_{\text{emisión}} = 545$ nm).

Los % de recuperación más altos (79 y 78.1) se obtienen al adicionar 4.8 μ M de patrón TEP a 97 ml de agua y pH 0.93 y 1.5.

b.2). Optimización con muestra

En ensayos iniciales con 10 g de muestra y 97 ml de agua, se observa que durante la destilación la ebullición es irregular y, en ocasiones, se forma espuma que llega hasta el matraz donde se recoge el destilado. Se realizan distintos ensayos de recuperación modificando: cantidad de muestra, volumen de agua, pH y volumen de matraz de destilación.

Se concluye que las mejores condiciones para la destilación de este tipo de muestra son: 15 g de muestra, 197 ml de agua, 1 ml de BHT 58 μ g/ml en etanol, pH ajustado a 1.5 y en un matraz topacio de 1000 ml de capacidad. En el sistema de destilación, para asegurar que no pasen componentes no volátiles al matraz de recogida, se utiliza un acodado con bola tipo Kjeldahl. Se incorporan perlas de vidrio y gotas de silicona al matraz y se destila en manta calefactora, a ebullición suave, hasta recoger un poco menos de 50 ml de destilado. La medida se realiza por fluorimetría.

Para evaluar la calidad del método se determinan sus parámetros analíticos:

Linealidad: Se prepara una recta de calibrado en el intervalo de concentraciones entre 0.13 y 2.05 μM TEP, a cada una de las disoluciones patrón se le añaden 5 ml de TBA y se someten al tratamiento descrito previamente. Las lecturas se realizan mediante espectrofotometría, fluorimetría y la tercera derivada.

En el cuadro nº 25, se recogen las ecuaciones de las rectas obtenidas.

Cuadro nº 25. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Linealidad de la determinación mediante destilación.

Técnica	Ecuación de la recta	
Absorbancia	$y = - 0.007 + 0.068 x$	$r = 0.997$
Fluorimetría	$y' = 0.379 + 12.104 x$	$r = 0.999$
Tercera derivada	$y'' = 0.001 + 0.013 x$	$r = 0.996$

(y: absorbancia; x: μM ; r: coeficiente de correlación; y': unidades de fluorescencia; y'': valor de la 3ª derivada)

La mayor pendiente de la recta de fluorescencia indica una mayor sensibilidad de la técnica, por lo que se confirma su elección.

Se comprueba que en el intervalo de concentraciones ensayado (0.13 y 2.05 μM TEP) la respuesta es lineal.

Límite de detección: Se calcula a partir de los valores obtenidos en la determinación, del MDA de seis blancos, constituidos por 197 ml de agua, 1 ml de BHT 58 $\mu\text{g/ml}$ en etanol y HCl 4 N en cantidad suficiente para alcanzar $\text{pH} = 1.5$.

La recta de calibrado, la desviación estándar de las lecturas realizadas y el límite de detección obtenido se muestran en el cuadro nº 26.

Cuadro nº 26. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Límite de detección (L.D.) de la determinación mediante destilación.

Recta de calibrado	D.E.	L.D.
$y = 16.732 x + 0.059$ $r = 0.999$	0.021	0.0038 μM (0.912 $\mu\text{g/kg}$ muestra)

(D.E: desviación estándar; y: unidades de fluorescencia; x: μM ; r: coeficiente de correlación)

Precisión intra e interdía: Se calculan a partir de la determinación, en dos días distintos, de cuatro alícuotas de una muestra de papilla.

Las precisiones, expresadas como coeficiente de variación, los valores medios obtenidos de MDA y las desviaciones estándar, se muestran en el cuadro nº 27.

Cuadro nº 27. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Precisión de la determinación mediante destilación.

	$\mu\text{g MDA/kg muestra}^*$ (n = 4)	Precisión (CV%)	
		Intradía	Interdía
Día 1			
$y = 0.329 + 11.835 x$ $r = 0.998$	68.36 ± 3.10	4.53	
			4.82
Día 2			
$y = 0.601 + 13.919 x$ $r = 0.999$	70.26 ± 3.74	5.32	

(* expresado como media \pm desviación estándar; n: número de alícuotas; C.V: coeficiente de variación; y: unidades de fluorescencia; x: μM ; r: coeficiente de correlación)

Exactitud: Se realizan ensayos de recuperación con y sin matriz para conocer si ésta interfiere en los valores obtenidos.

Se preparan dos series de matraces de destilación: a) tres con 197 ml de agua destilada y una cantidad conocida de TEP y, paralelamente, tres con el mismo volumen de agua pero sin patrón adicionado, y b) seis conteniendo cada uno de ellos 15 g de papilla, a tres de ellos se les añade una cantidad conocida de TEP justo antes de la destilación.

Se someten todos los matraces al mismo tratamiento de destilación.

Los resultados obtenidos, se muestran en el cuadro nº 28.

Cuadro nº 28. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Exactitud de la determinación mediante destilación.

Ensayos sin matriz			
μM			
Presente	Adicionado	Hallado	% Recuperación
		0.117	48.75
n.d.	0.24	0.095	39.58
		0.094	39.17
			42.50 ± 5.42*
Ensayos con matriz			
$\mu\text{g/kg}$ muestra			
Presente	Adicionado	Hallado	% Recuperación
	61.68	89.13	41.52
63.56	61.03	91.07	45.10
	60.39	91.84	46.90
			44.51 ± 2.74*

(n.d: no detectable; * expresado como media \pm desviación estándar)

A la vista de los resultados de recuperación obtenidos, puede afirmarse que no parece que las bajas recuperaciones se deban a un efecto de matriz; además, aunque los valores son bajos, estos son bastante reproducibles (coeficiente de variación: 6.15%). Para confirmar la recuperación obtenida (factor a tener en cuenta en el resultado final) se repetirán los ensayos de recuperación a lo largo del estudio, en distintos puntos de muestreo.

c). Comparación de métodos

En el cuadro nº 29 se comparan los parámetros analíticos del método de determinación de TBARS con TCA (Angulo (1997) modificado por Manglano (1999)) (1), con el propuesto por Tarladgis *et al.* (1960) de destilación (2), aplicados a papillas líquidas.

Cuadro nº 29. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Comparación de parámetros analíticos en papillas de cereales con leche: con TCA (1) y por destilación (2).

Método aplicado		(1)	(2)
Precisión (C.V. %)		10.49	4.53
Límite de detección	μM	0.02	0.0038
	$\mu\text{g/kg}$	2	0.912
% Recuperación*		92.44 \pm 15.84	44.51 \pm 2.74

(C.V: coeficiente de variación; * expresado como media \pm desviación estándar)

Como puede observarse, el método de destilación, presenta una mejor precisión, así como LD, pero se obtiene una menor recuperación que con el método del TCA, lo que obliga a aplicar un factor de corrección en los valores obtenidos por este método.

Con objeto de comparar los resultados obtenidos, se determina el contenido de TBARS en una muestra de papilla líquida por ambos métodos. Los resultados se muestran en el cuadro nº 30.

Cuadro nº 30. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Comparación de contenidos de MDA obtenidos en una misma muestra: TCA (1) y por destilación (2).

Método aplicado	µg MDA /kg	Factor de recuperación (% recuperación)	Corrección µg MDA /kg
1	252.10	1.08 (92.44%)	272.27
2	63.62	2.23 (44.78%)	141.87

El método con TCA proporciona contenidos mucho mayores que el de destilación, probablemente por interferencias producidas por carbonilos (ver antecedentes bibliográficos, apartado E.3.1). El método de elección es el de destilación ya que los parámetros analíticos obtenidos son, a excepción de los porcentajes de recuperación, mejores que con el método de TCA y, los contenidos de MDA que proporciona son inferiores, debido a que sólo reaccionan con el TBA los componentes volátiles. Independientemente del valor cuantificado, interesa conocer la evolución de los compuestos que reaccionan con el TBA a lo largo del almacenamiento y el método por destilación proporciona resultados más precisos.

B.3.2. Conservación de la muestra antes del análisis*a). Efecto del tiempo de congelación de la muestra*

Se mezclan tres envases de papilla del mismo lote de fabricación, se alicuotan y se mantienen en congelación (-23 °C). La determinación del MDA se efectúa en la muestra recién fabricada y tras una y tres semanas de congelación.

Las lecturas se hacen por espectrofotometría, fluorimetría y espectrofotometría de la tercera derivada. Los resultados, tras aplicar el factor de recuperación, se muestran en el cuadro nº 31.

Cuadro nº 31. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Efecto del tiempo de congelación de la muestra: contenidos medios de MDA ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Técnica	Fresca	Congelada	
		1 semana	3 semanas
E	140.96	127.40	131.84
F	146.63	137.94	142.18
3ª D (*)	136.82	161.10	132.87

(E: Espectrofotometría; F: Fluorimetría; 3ª D: Espectrofotometría de la tercera derivada; * Valores próximos al L.D.)

Al aplicar un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (tiempo y técnica de medida) se comprueba que no existen diferencias estadísticamente significativas (con un intervalo de confianza del 95%) entre los tres estados (fresca, congelada 1 y 3 semanas), o con respecto a la técnica de medida utilizada. A la vista de los resultados, se concluye que la muestra puede almacenarse en congelación antes de su determinación durante un periodo de tres semanas.

Los resultados obtenidos por las tres técnicas son similares, por lo que se deduce que no existen interferencias en la lectura.

b). *Estabilidad del destilado*

Se cuantifica el contenido de MDA de un destilado mantenido a 4 °C durante dos días seguidos, con el fin de comprobar si es posible mantener los destilados en refrigeración 24 h antes de proceder a su medida. Como se muestra en el cuadro nº 32 los valores permanecen sin cambios.

Cuadro nº 32. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Método por destilación: estabilidad del destilado.

	Día 1	Día 2
Recta de calibrado	$y = 13.165 x + 0.872$ $r = 0.998$	$y = 13.195 x + 0.496$ $r = 0.999$
Contenido de MDA (µg/kg papilla)	52.55	52.44

(y: unidades de fluorescencia; x: µM; r: coeficiente de correlación)

B.3.3. Evolución del MDA a lo largo del tiempo: Ensayo piloto en fórmulas para lactantes

Se analiza, con el método propuesto, la muestra G que ha sido almacenada durante 2 meses a distintas temperaturas (25, 30 y 37 °C).

Los resultados obtenidos se recogen en el cuadro nº 33.

Se aplica un ANOVA de dos factores (T y t de almacenamiento) para evaluar las diferencias significativas, resultando que no existen diferencias entre las T de almacenamiento, ni entre los meses 1 y 2,

pero sí entre éstos y el mes 0 (el contenido de MDA en la muestra recién fabricada es menor que tras uno y dos meses de almacenamiento).

Como puede observarse, el método aplicado es capaz de detectar diferencias en el contenido de MDA entre muestras almacenadas durante distinto tiempo, por lo que es válido para detectar variaciones de MDA durante un almacenamiento.

Cuadro nº 33. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Evolución del MDA a lo largo del tiempo: ensayo piloto en fórmulas para lactantes.

Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo de almacenamiento (meses)	Contenido de MDA (µg /g producto)*
25	0	0.411 ± 0.008
	1	0.745 ± 0.073
	2	1.104 ± 0.081
30	0	0.443 ± 0.013
	1	0.930 ± 0.175
	2	1.084 ± 0.301
37	0	0.438 ± 0.036
	1	0.896 ± 0.088
	2	1.476 ± 0.248

(* expresado como media ± desviación estándar)

B.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES

Reactivos

- PI 4-metil-2-pentanona (MIBK) 80 µg/ml en metanol.

Modo operatorio

Para proceder a la extracción de los compuestos volátiles de la muestra, se pesan, a precisión, unos 4 g de muestra en un vial de vidrio topacio de 10 ml; se introduce un imán agitador y se encapsula inmediatamente con un septum y un sello de aluminio. Con ayuda de una jeringa de 10 µl se añaden 3 µl de la disolución del PI a través del septum. El vial se mantiene a 37 °C sumergido en un baño de agua sobre una placa agitadora-calentadora y en agitación durante todo el análisis. Después del tiempo de equilibrio, una fibra cubierta con CAR/PDMS, previamente equilibrada según las recomendaciones del fabricante, se expone al espacio de cabeza del vial. La extracción se realiza a 37 °C, estando la fibra a 1.0 en la escala del soporte de SPME. Posteriormente, los compuestos volátiles son desorbidos en el puerto de inyección del CG-FID durante 5 min.

Las condiciones cromatográficas se optimizan previamente y se describen en el cuadro nº 34.a.

Se identifican los compuestos volátiles (pentano, pentanal, hexanal y heptanal) en CG-FID por comparación de sus tiempos de retención con los correspondientes patrones. Para confirmar la presencia en las muestras de estos compuestos volátiles se procede a analizar la muestra por CG acoplada a EM. Para ello, las muestras se someten al tratamiento descrito y se aplican las condiciones cromatográficas del cuadro nº 34.b.

La adquisición de los espectros se realiza en modo *scan* (barrido) y en modo SIM; los iones seleccionados son: 57 y 72 para pentano, 44 y 86 para pentanal, 56 y 72 para hexanal y 70 y 114 para heptanal. Los compuestos se identifican por comparación de sus espectros de masas con los obtenidos con patrones y con los presentes en la espectroteca NIST 05.

Cuadro nº 34. Determinación de compuestos volátiles. Condiciones cromatográficas.

	a. CG-FID	b. CG-EM
Aparato	Autosystem XL, Perkin Elmer	6890N-5973N, Agilent
Columna	Equity 5 [®] , 30 m x 0.53 mm; f.e: 5 µm, Supelco [®]	ZB-5 ms, 30 m x 0.32 mm; f.e: 1 µm, Phenomenex [®]
Programa del horno	T ₁ = 40 °C, t ₁ = 5 min; ΔT ₁ = 4 °C/min; T ₂ = 100 °C; ΔT ₂ = 17 °C/min; T ₃ = 220 °C, t ₃ = 10 min	
Gas portador (ml/min)	2.1 (H ₂)	3.1 (He)
Inyector (°C)	250	
Modo de inyección	Sin split	
Detector	300 °C (FID)	Temperatura de la fuente: 230 °C; ionización por impacto electrónico a 70 eV

(T: Temperatura; t: tiempo)

B.4.1. Puesta a punto del método en papillas de cereales con leche

Para la selección de las condiciones analíticas óptimas (posición de la fibra de SPME en el inyector del CG y tiempos de equilibrado (t_{eq}) y extracción (t_{ex}) de la muestra), se tienen en cuenta la sensibilidad y el tiempo necesario para el análisis. Para ello se utiliza la muestra A y los compuestos volátiles hexanal y pentano.

a) Posición de la fibra de SPME en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases

Una muestra adicionada de hexanal (41.72 ng/ml) se equilibra durante 15 min a 37 °C, a continuación, se extrae el espacio de cabeza con la fibra durante 45 min a 37 °C y se inserta durante 5 min en el inyector del CG en diferentes posiciones del soporte de SPME: 4.0, 4.2 y 4.4.

Tras la primera inyección, la fibra se reinserta de nuevo en el inyector del CG. El valor del área del hexanal obtenido en la segunda inyección se usa para calcular el porcentaje de desorción de hexanal (%D) correspondiente a la primera inyección, que se calcula según la fórmula: $\% D = (A_1 \times 100) / (A_1 + A_2)$; donde: A_1 = área del hexanal en la primera inyección y A_2 = área del hexanal en la segunda inyección.

Los valores obtenidos en función de la posición de la fibra se muestran en el cuadro nº 35.

Aunque la diferencia en el porcentaje de desorción entre las tres posiciones es pequeña, la posición 4.4 permite obtener el

porcentaje de desorción mayor, por lo que es la elegida para los análisis.

Cuadro n° 35. Determinación de compuestos volátiles. Posición de la fibra de SPME en el puerto de inyección del CG.

Posición de la fibra	Porcentaje de desorción
4.0	98.5
4.2	98.8
4.4	99.0

Al realizar el mismo ensayo en una muestra adicionada de pentano (46.98 ng/ml) se obtiene un 99.71% de desorción de pentano con la posición 4.4.

b). Optimización del tiempo de equilibrado

La muestra se equilibra a 37 °C durante 2, 5, 10, 15, 30 y 60 min. A continuación, el espacio de cabeza se extrae con la fibra de SPME durante 30 min a 37 °C, la cual se inserta en el inyector del CG para su análisis siguiendo las condiciones indicadas en el cuadro n° 34.a. El ensayo se realiza por duplicado. La relación entre las áreas cromatográficas de los analitos y el PI (áreas relativas) se muestran en el cuadro n° 36 y se representan en la figura n° 11.

Los incrementos en las áreas relativas indican que, para ambos analitos, el equilibrio entre el espacio de cabeza y la muestra se alcanza a los 30 min. Sin embargo, en el caso del hexanal, las diferencias entre el área relativa obtenida a los 15 y 30 min es pequeña (0.02); a los 15 min se obtiene un 92.9% de la relación de áreas obtenida a los 30 min de equilibrado; con respecto a la

reproducibilidad, los C.V. que se obtienen a 15 y 30 min son 3.8 y 3.6%, respectivamente.

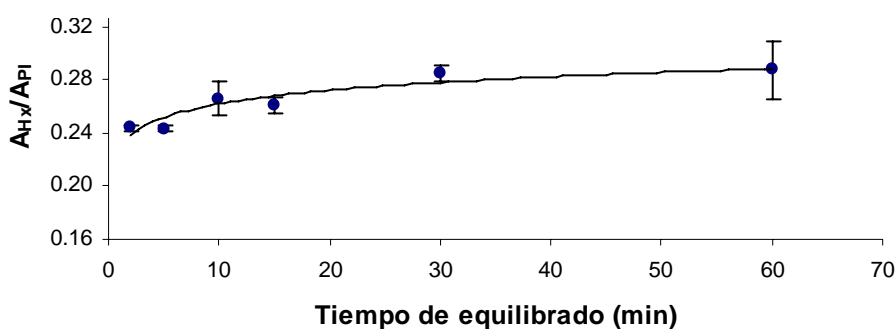
Cuadro n° 36. Determinación de compuestos volátiles. Optimización del tiempo de equilibrado ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Áreas relativas* del hexanal y pentano.

t_{eq} (min)	$t_{\text{ex}} = 30\text{ min}$	
	$A_{\text{Hx}}/A_{\text{PI}}$	$A_{\text{Pt}}/A_{\text{PI}}$
2	0.24 ± 0.00	1.19 ± 0.02
5	0.24 ± 0.00	1.22 ± 0.00
10	0.27 ± 0.01	1.28 ± 0.04
15	0.26 ± 0.01	1.35 ± 0.20
30	0.28 ± 0.01	1.52 ± 0.13
60	0.29 ± 0.02	1.54 ± 0.17

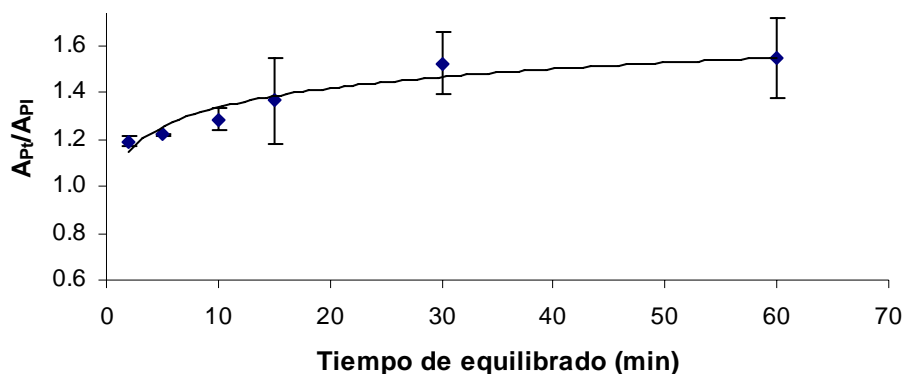
(T: temperatura; t_{eq} : tiempo de equilibrado; t_{ex} : tiempo de extracción; A_{Hx} : área del hexanal; A_{PI} : área del patrón interno; A_{Pt} : área del pentano; * expresado como media \pm desviación estándar)

Figura n° 11. Determinación de compuestos volátiles. Optimización del tiempo de equilibrado (tiempo de extracción = 30 min, temperatura = $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Áreas relativas (media \pm desviación estándar): (a) Hexanal y (b) pentano.

(a) Hexanal ($A_{\text{Hx}} =$ área del hexanal; $A_{\text{PI}} =$ área del patrón interno).



(b) Pentano (A_{Pt} = área del pentano; A_{PI} = área del patrón interno).



Con respecto al pentano, las diferencias entre las áreas relativas obtenidas a los 15 y 30 min es de 0.17, y a los 15 min se obtiene un 88.8% de la relación de áreas obtenida a los 30 min.

La pequeña diferencia obtenida en el incremento de la respuesta, junto con la reducción en el tiempo de análisis, justifican la elección de 15 min como t_{eq} .

c). Optimización del tiempo de extracción

La fibra de SPME se expone al espacio de cabeza de una muestra equilibrada (15 min a 37 °C) durante diferentes tiempos: 5, 15, 30, 45 y 60 min. Transcurrido el tiempo de exposición, los compuestos son desorbidos en el inyector del CG aplicando las condiciones descritas en el cuadro nº 34.a. El ensayo se realiza por duplicado. Los valores de áreas relativas (en relación al PI) se muestran en el cuadro nº 37 y los valores de áreas absolutas y relativas se representan en la figura nº 12.

Cuadro n° 37. Determinación de compuestos volátiles. Optimización del tiempo de extracción ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Áreas relativas* del hexanal y pentano.

t_{ex} (min)	$t_{\text{eq}} = 15\text{ min}$	
	$A_{\text{Hx}}/A_{\text{PI}}$	$A_{\text{Pt}}/A_{\text{PI}}$
10	0.27 ± 0.01	2.69 ± 0.27
15	0.27 ± 0.01	1.55 ± 0.37
30	0.28 ± 0.00	1.30 ± 0.12
45	0.27 ± 0.01	1.16 ± 0.01
60	0.30 ± 0.01	1.08 ± 0.05

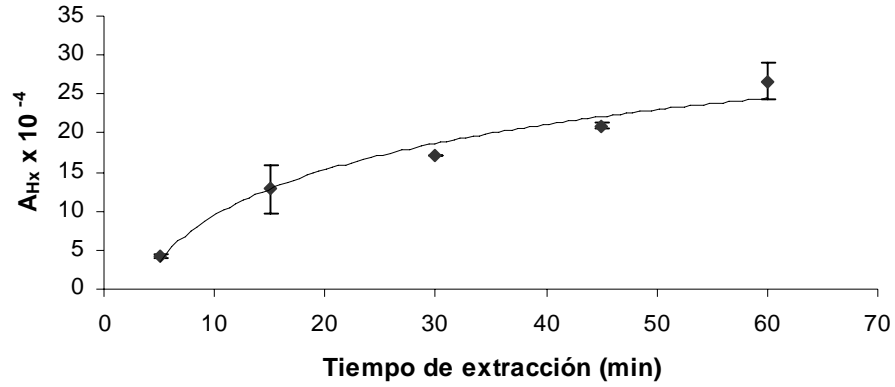
(T: temperatura; t_{eq} : tiempo de equilibrado; t_{ex} : tiempo de extracción; A_{Hx} : área del hexanal; A_{PI} : área del patrón interno; A_{Pt} : área del pentano; * expresado como media \pm desviación estándar)

Como se muestra en la figura n° 12.a, las áreas absolutas correspondientes al hexanal aumentan con el t_{ex} . Sin embargo, cuando las áreas se expresan en relación al PI (figura n° 12.b), las respuestas son similares para los tiempos ensayados.

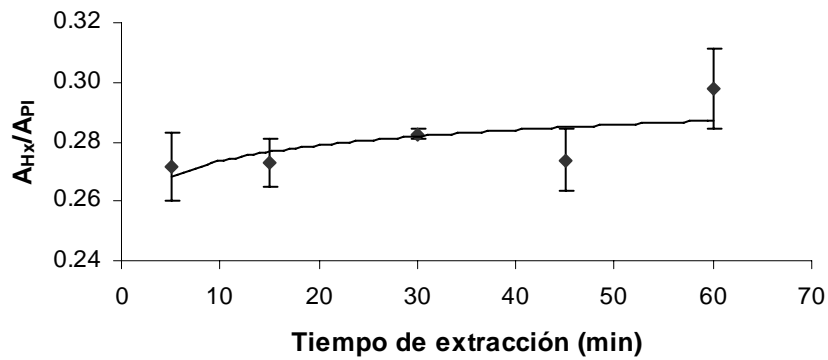
En el caso del pentano, el aumento en las áreas absolutas es más pronunciado al considerar los t_{ex} menores (5 y 15 min) en comparación con los mayores (ver figura n° 12.c). Sin embargo, el comportamiento decreciente de las áreas relativas (Figura n° 12.d) con el t_{ex} puede explicarse por la distinta afinidad por la fibra del pentano y el PI. Dado que se obtiene una mejor reproducibilidad de la respuesta cuanto mayor es el t_{ex} , con 45 min el C.V. = 0.9% y con 30 min el C.V. = 9.2%, se seleccionan 45 min para el hexanal y para el pentano.

Figura n° 12. Determinación de compuestos volátiles. Optimización del tiempo de extracción (t equilibrado = 15 min, temperatura = 37 °C). Hexanal: (a) Áreas absolutas, (b) áreas relativas; pentano: (c) Áreas absolutas y (d) áreas relativas. Media \pm desviación estándar.

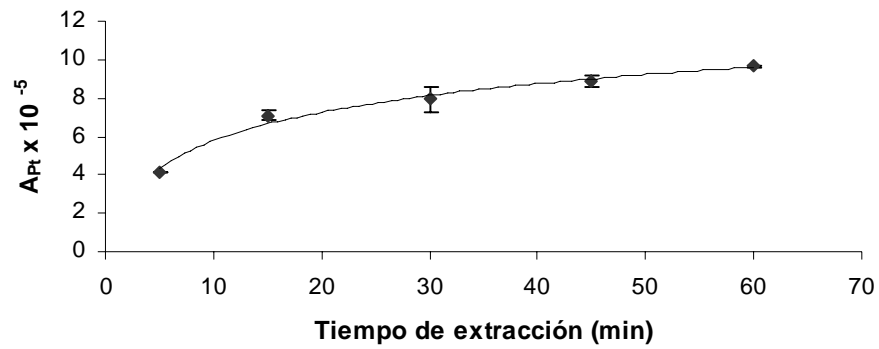
(a) (A_{Hx} = área del hexanal; A_{PI} = área del patrón interno).



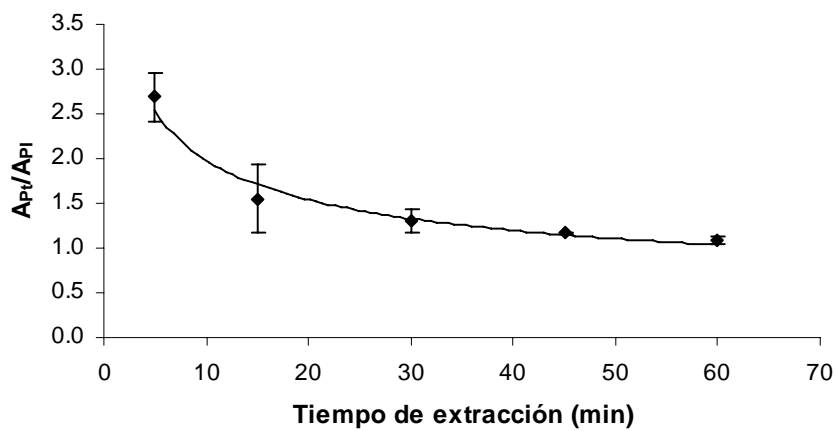
(b) (A_{Hx} = área del hexanal; A_{PI} = área del patrón interno).



(c) Pentano (A_{Pt} = área del pentano).



(d) Pentano (A_{Pt} = área del pentano; A_{PI} = área del patrón interno).



Los tiempos seleccionados (15 min para el equilibrado, 45 min para la extracción y 30 min para el programa del CG) permiten realizar el análisis completo en 1.5 h.

d). Validación del método

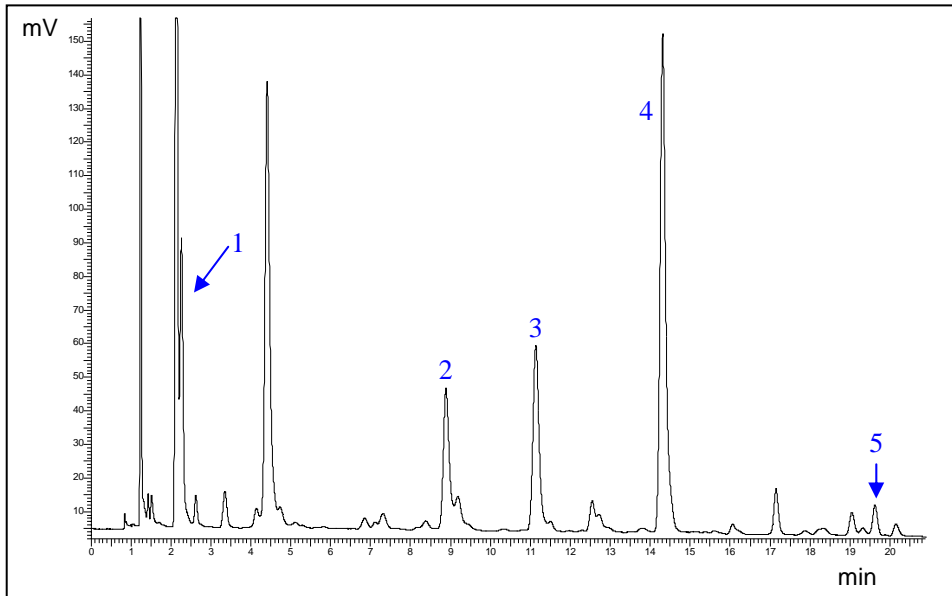
Los cromatogramas correspondientes a las dos muestras (A y B) obtenidos mediante CG-FID aplicando las condiciones antes descritas (cuadro nº 34.a) se muestran en la figura nº 13.a y 13.b, respectivamente. Se señalan en los cromatogramas los picos correspondientes a pentano, pentanal, hexanal y heptanal, identificados por comparación de sus tiempos de retención con patrones y mediante CG-EM.

Como se observa en la figura nº 13.b, la muestra B (con frutas) contiene un mayor número de volátiles que la muestra A y, además, que en el tiempo de retención del hexanal (14.2 min) el pico es mayor. En el análisis por CG-EM se confirma mediante SIM que el hexanal coeluye con otro compuesto identificado como etilbutanoato.

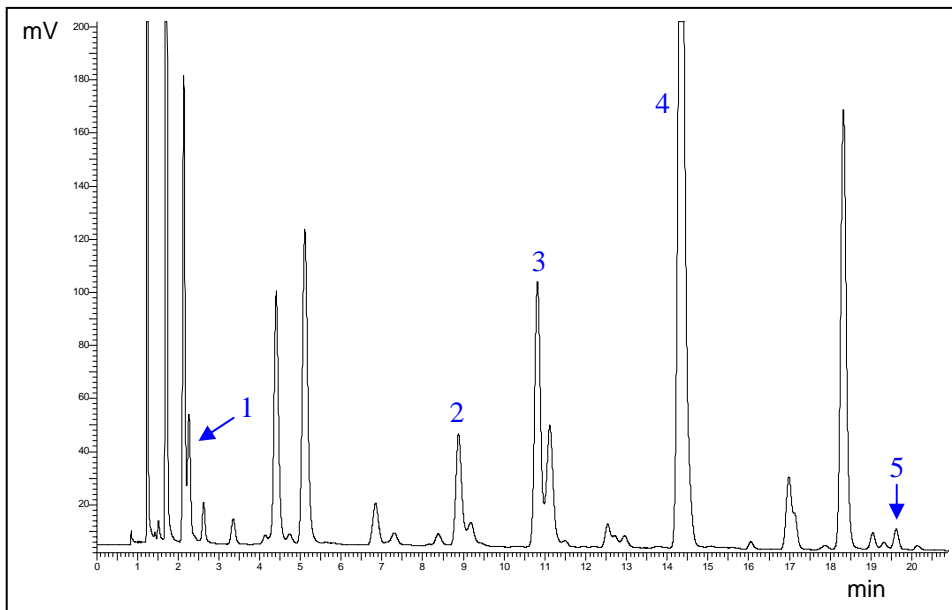
No es posible mejorar la separación de estos picos porque debido a la polaridad de las columnas usadas, los índices de Kovats del hexanal y etilbutanoato son muy similares (802 y 804, respectivamente) (Adams, 2001). Por lo tanto, en las condiciones analíticas aplicadas en el presente estudio, el hexanal no puede utilizarse como indicador de la oxidación lipídica en la muestra B. Sin embargo, los picos correspondientes a pentano, pentanal y heptanal pueden identificarse y cuantificarse claramente en ambas muestras por CG-FID.

Figura n° 13. Determinación de compuestos volátiles. Cromatogramas obtenidos por CG-FID: (a) muestra A, (b) muestra B. Los picos numerados corresponden a 1) pentano; 2) pentanal, 3) PI, 4) hexanal y 5) heptanal.

a)



b)



Para evaluar la calidad del método se determinan sus parámetros analíticos:

d.1). Linealidad

El PI (4-metil-2-pentanona) se usa para la cuantificación. Las curvas de calibrado se obtienen con una serie de alícuotas de las muestras (A y B) adicionadas con una cantidad fija del PI (240 ng) y cantidades crecientes de los compuestos volátiles a analizar (pentano, pentanal, hexanal, heptanal). Los intervalos de concentraciones estudiados, las ecuaciones de regresión y los coeficientes de correlación obtenidos se muestran en el cuadro nº 38.

Se comprueba que en los intervalos estudiados la respuesta es lineal.

Cuadro nº 38. Determinación de compuestos volátiles. Validación del método: linealidad.

	Intervalo de concentraciones (µg/kg)	Ecuaciones de regresión	
		Muestra A	Muestra B
Pentano	1.05 a 79.55	$y = 0.031x + 1.002$ $r = 0.990$	$y = 0.026x + 0.671$ $r = 0.994$
Pentanal	0.04 a 9.66	$y = 0.049x + 0.083$ $r = 0.997$	$y = 0.154x + 0.398$ $r = 0.999$
Hexanal	0.91 a 84.78	$y = 0.025x + 0.568$ $r = 0.999$	---
Heptanal	0.02 a 7.16	$y = 0.065x + 0.09$ $r = 0.994$	$y = 0.237x + 0.433$ $r = 0.994$

(y: área del analito/área del PI; x: concentración del analito (µg/kg muestra); r: coeficiente de correlación)

d.2). Sensibilidad: límites de detección y cuantificación

Se definen como el cociente entre el triple y décuplo, respectivamente, de la desviación estándar obtenida para los blancos analizados y la pendiente de la recta de calibrado (American Chemical Society, 1980).

Se preparan cuatro blancos y se someten al método descrito. Los resultados se muestran en el cuadro nº 39.

Cuadro nº 39. Determinación de compuestos volátiles. Validación del método: límites de detección (L.D.) y cuantificación (L.C.).

	Muestras	Pentano	Pentanal	Hexanal	Heptanal
L.D. (µg/kg)	A	0.54	0.04	0.91	0.02
	B	1.05	0.01	---	0.01
L.C. (µg/kg)	A	0.9	0.14	3.03	0.07
	B	3.50	0.04	---	0.02

d.3). Precisión

Se evalúa mediante el cálculo del C.V. de tres medidas efectuadas expresadas en µg analito/kg de muestra. Se muestran en el cuadro nº 40.

Cuadro n° 40. Determinación de compuestos volátiles. Validación del método: precisión.

	Muestra A		Muestra B	
	$\mu\text{g analito/ kg}$ muestra*	C.V (%)	$\mu\text{g analito/ kg}$ muestra*	C.V (%)
Pentano	26.40 \pm 0.91	3.46	19.96 \pm 0.66	3.32
Pentanal	1.57 \pm 0.06	3.97	5.49 \pm 0.17	3.02
Hexanal	71.52 \pm 2.03	2.84	---	---
Heptanal	0.27 \pm 0.01	2.08	0.56 \pm 0.02	3.13

(* expresado como media \pm desviación estándar)

d.4). *Exactitud*

Se determina mediante ensayos de recuperación de los compuestos hexanal y pentano adicionados a la muestra. Se preparan siete alícuotas de la muestra, a cuatro de ellas se les adiciona una cantidad conocida de patrón y a todas ellas se les aplica el método descrito. El porcentaje de recuperación se calcula aplicando la fórmula: % Recuperación = $(X_{\text{ad}} - X) \times 100 / Y$; donde X = contenido de las muestras no adicionadas, X_{ad} = contenido de las muestras adicionadas de patrón, Y = cantidad de patrón adicionado a las muestras.

Los resultados se muestran en el cuadro n° 41.

Cuadro n° 41. Determinación de compuestos volátiles. Validación del método: exactitud.

Contenido ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Muestra A		Muestra B
	Pentano	Hexanal	Pentano
Presente	26.30	24.13	22.04
Adicionado	25.25	21.15	18.52
Hallado	50.39 ± 0.99	46.67 ± 1.81	42.3 ± 1.17
% Recuperación*	95.39 ± 4.28	106.60 ± 7.01	109.45 ± 6.70

(* expresado como media \pm desviación estándar)

B.4.2. Aplicación del método a fórmulas para lactantes

Para la aplicación del método a la determinación de hexanal en FL, las muestras C, D, E y F se disuelven en agua destilada al 0.5% (p/v), concentración idónea para detectar el analito sin saturar la fibra. 4 ml de la disolución se introducen en un vial, se aplica el tratamiento de la muestra descrito para las papillas líquidas y se analiza por CG-FID en las condiciones descritas en el cuadro n° 34.a.

Para confirmar la presencia de hexanal, se analizan las FL por CG-EM aplicando las condiciones descritas en el cuadro n° 34.b. Es de resaltar que incluso a una concentración del 4% (p/v), no se detecta pentano en las FL.

a). Linealidad – interferencias de matriz

El PI (4-metil-2-pentanona) se usa para la cuantificación. Se preparan dos series de curvas de calibrado: con patrones acuosos y con patrones adicionados de matriz (muestra C). Para ello, a 4 ml de agua destilada, o de FL al 0.5%, se les adiciona una cantidad fija del PI (240 ng) y cantidades crecientes de hexanal (120 a 417 ng). Las

ecuaciones de regresión y los coeficientes de correlación obtenidos se muestran en el cuadro nº 42.

Se comprueba que en los intervalos estudiados la respuesta es lineal.

Cuadro nº 42. Determinación de compuestos volátiles. Aplicación del método a fórmulas para lactantes: ecuaciones de las curvas de calibrado acuosa y adicionada de matriz.

Ecuaciones de regresión		
Recta acuosa	$y = 0.010 x - 0.325$	$r = 0.998$
Recta matriz (muestra C)	$y = 0.012 x + 1.348$	$r = 0.997$

(y: área del hexanal/área del PI; x: concentración del analito (ng); r: coeficiente de correlación)

Se comparan las pendientes de las rectas de calibrado mediante un test "t" al 95%, para detectar posibles diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellas, lo que indicaría la existencia de interferencias de matriz. Los intervalos de confianza de las pendientes se solapan (acuosa: 0.0091 a 0.0111, matriz: 0.0094 a 0.0154). En consecuencia, se pueden utilizar patrones acuosos para la cuantificación de hexanal en FL.

b). Precisión

Se evalúa mediante el cálculo del C.V. de tres medidas efectuadas expresadas en ng hexanal/g de muestra. El valor medio obtenido, la desviación estándar y el coeficiente de variación se muestran en el cuadro nº 43.

Cuadro n° 43. Determinación de compuestos volátiles. Aplicación del método a fórmulas para lactantes: precisión.

ng hexanal/g de muestra*	6074.75 ± 212.57
C.V (%)	3.50

(* expresado como media ± desviación estándar; C.V: coeficiente de variación)

B.5. DETERMINACIÓN DE ESTEROLES Y ÓXIDOS DE ESTEROLES

B.5.1. Síntesis de óxidos de fitosteroles

Reactivos

- Patrón β -sitosterol 1 mg/ml en hexano:isopropanol (3:2, v/v).
- Patrón estigmasterol 1 mg/ml en hexano:isopropanol (3:2, v/v).
- Patrones de COP, 0.127 mg/ml en hexano:isopropanol (3:2, v/v).
- Sal sódica de 2',7'-diclorofluoresceína al 0.2% en etanol.
- PI 19-hidroxicolesterol 0.5 mg/ml en hexano:isopropanol (3:2, v/v).
- Mezcla silanzante: Piridina:HMDS:TMCS, 5:2:1 (v/v/v).
- Mezcla hexano:isopropanol (3:2, v/v).
- Mezcla éter dietílico:hexano:etanol (70:30:3, v/v/v).
- Mezclas de hexano:éter dietílico en distintas proporciones (v/v): 95:5, 90:10 y 80:20.
- Mezcla sulfocrómica: ácido sulfúrico al 80% (v/v).

Modo operatorio

Para la síntesis de patrones de óxidos (7α -hidroxi-, 7β -hidroxi-, 7-ceto-, α -epoxi- y β -epoxiderivados) de β -sitosterol, campesterol y estigmasterol se aplica el método descrito por Conchillo *et al.* (2005).

Se colocan 10 ml de cada disolución de patrones de fitosteroles en sendas placas Petri, se evapora el disolvente bajo corriente de N_2 y se llevan a una estufa a 150 °C durante 2 h. A continuación, se

recoge el residuo con hexano:isopropanol (3:2, v/v), que se transfiere a un matraz aforado y se enrasa a 10 ml.

Para la separación e identificación de los POP se realiza una CCF con gel de sílice; para ello se toman 5 ml de la disolución de los POP, se evaporan hasta sequedad y se disuelven en 150 μ l de cloroformo que se siembran en la placa. Una mezcla de patrones comerciales de COP se siembra en la misma placa como referencia para la identificación de derivados análogos de los fitosteroles. La fase móvil es una mezcla de éter dietílico:hexano:etanol (70:30:3, v/v/v). Tras la elución, 1/3 de la placa se pulveriza con una ácido sulfúrico (80%, v/v) y los 2/3 restantes con una disolución metanólica de 2',7'-diclorofluoresceína, se deja secar y las bandas se visualizan bajo luz UV (254 nm).

Las bandas de interés de la parte revelada con 2',7'-diclorofluoresceína se raspan de la placa y se extraen tres veces con 1 ml de cloroformo. A continuación, se añaden 10 μ g de 19-hidroxicolesterol como PI (20 μ l de una disolución de 0.5 mg/ml) y el disolvente se evapora. Para obtener los derivados trimetilsililados (TMSE), se añaden 200 μ l de la mezcla silanizante y se mantienen a 40 °C durante 20 min (Sweeley *et al.*, 1963). Transcurrido este tiempo, se evaporan los restos de reactivo bajo corriente de nitrógeno y se disuelve en 50 μ l de hexano para su análisis en un CG-FID, aplicando las condiciones cromatográficas descritas en el cuadro nº 44.a, y en un CG-EM utilizando las condiciones cromatográficas descritas en el cuadro nº 44.b.

Cuadro n° 44. Síntesis de óxidos de fitosteroles. Condiciones cromatográficas.

	a. CG-FID	b. CG-EM
Aparato	HRGC 5300 Mega Series, Carlo-Erba®	6890N-5973N, Agilent®
Columna	CP-Sil 8CB, 50 m x 0.25 µm; f.e: 0.25 mm, Varian®	HP-5MSi, 30m x 0.25 mm; f.e: 0.25 µm, Agilent®
Programa del horno	T ₁ = 280 °C, t ₁ = 20 min; ΔT ₁ = 0.2 °C/min; T ₂ = 290 °C, t ₂ = 2 min; ΔT ₂ = 30 °C/min; T ₃ = 320 °C, t ₃ = 10 min	T ₁ = 250 °C; ΔT ₁ = 0.8 °C/min; T ₂ = 310 °C
Gas portador (He) (ml/min)	2.6	1
Inyector (°C)	325	310
Split	1:20	1:10
Detector	325 °C (FID)	Temperatura de la fuente: 230 °C; ionización por impacto electrónico a 70 eV; intervalo: 40-650 m/z a 1500 amu/s

Para confirmar la identificación de los POP, se emplean los espectros de masas de los COP y 7-cetoestigmasterol comercializados, así como los espectros de POP hallados en la bibliografía (Nourooz-Zadeh and Appelqvist, 1992; Dutta, 1997; Dutta and Appelqvist,

1997; Bortolomeazzi *et al.*, 1999; Grandgirard *et al.*, 1999; Plat *et al.*, 2001; Dutta, 2002; Lampi *et al.*, 2002; Bortolomeazzi *et al.*, 2003; Johnsson and Dutta, 2003; Grandgirard *et al.*, 2004; Conchillo *et al.*, 2005).

B.5.2. Determinación de esteroides y óxidos de esteroides

Reactivos

- PI 19-hidroxicolesterol 0.5 mg/ml en hexano:isopropanol (3:2, v/v).
- PI 5 α -colestano 1 mg/ml en hexano.
- KOH 1 N en metanol.
- KOH 0.5 N (disolución acuosa).
- Cloruro de sodio (NaCl) al 20% (p/v) (disolución acuosa).
- Mezcla cloroformo:metanol (1:1, v/v).
- Mezclas de hexano:éter dietílico en distintas proporciones (v/v): 95:5, 90:10 y 80:20.
- Mezcla silanizante: Piridina:HMDS:TMCS, 5:2:1 (v/v/v).

Modo operatorio

Se aplica el método descrito por Conchillo *et al.* (2005).

a). Extracción de la fracción grasa

Para la extracción de la fracción grasa se aplica la metodología descrita en el apartado B.1.

b). Saponificación y extracción de la fracción insaponificable

Se pesan, con exactitud, unos 600 mg de grasa en un tubo de ensayo de vidrio Pyrex, con tapón roscado, de 15 ml de capacidad; se

añaden los PI: 10 µg de 19-hidroxicolesterol (20 µl de una disolución de 0.5 mg/ml) y 0.5 mg de 5 α -colestano (0.5 ml de una disolución de 1 mg/ml). Se evapora el disolvente bajo corriente de nitrógeno y se añaden 10 ml de una disolución metanólica de KOH para saponificar en frío (Sander *et al.*, 1989). Se forra el tubo con papel de aluminio y se mantiene a temperatura ambiente, bajo agitación continua, durante 18-20 h.

Pasado este tiempo, se transfiere el contenido del tubo a un embudo de decantación y se enjuaga el tubo consecutivamente con 3 y 7 ml de agua, y 3, 7 y 10 ml de éter dietílico, transfiriendo dichos volúmenes al embudo. Se agita el embudo durante 30 s, se deja reposar para que se separen las fases y se transfieren en matraces diferentes las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa se extrae dos veces más con 10 ml de éter dietílico, reuniendo todas las fases etéreas, las cuales son lavadas dos veces con 5 ml de una disolución acuosa de KOH 0.5 N y, a continuación, con una disolución acuosa de NaCl al 20%, hasta que el pH del último lavado es neutro. Se transfiere la fase orgánica a un matraz, se le añade Na₂SO₄ granulado y se mantiene en refrigeración durante 2 h. Tras filtrar el contenido del matraz, el éter dietílico se evapora con un rotavapor a 40 °C.

c). Determinación del contenido de esteroides

Se toma 1/10 del material insaponificable obtenido y se derivatiza para obtener los TMSE (Sweeley *et al.*, 1963). Tras evaporar el resto de reactivo, se disuelve en 250 µl de hexano. Para la cuantificación de los esteroides, 1 µl de esta disolución se inyecta en un CG-FID (cuadro nº 44.a) y, con fines identificativos, el mismo volumen se inyecta en un CG-EM (cuadro nº 44.b).

La identificación de los esteroides se realiza por comparación de su tiempo de retención y espectro de masas con patrones comercializados. La cuantificación de los esteroides se realiza por comparación de las áreas cromatográficas del PI 5 α -colestano y su concentración con las áreas de los picos de los esteroides de los cromatogramas de las muestras. El factor de respuesta en CG de los esteroides con respecto al PI se considera igual a 1.

d). Purificación y determinación de los óxidos de esteroides

Se toman 9/10 del material insaponificable y se disuelven en 100 μ l de una mezcla hexano:éter dietílico (95:5, v/v). La purificación se realiza mediante SPE según el método descrito por Guardiola *et al.* (1995b) con cartuchos previamente acondicionados con 5 ml de hexano, y se añade la siguiente secuencia de disolventes: 5 ml de hexano, 10 ml de hexano:éter dietílico (95:5, v/v), 30 ml de hexano:éter dietílico (90:10, v/v) y 10 ml de hexano:éter dietílico (80:20, v/v). A continuación, los SOP se eluyen con 10 ml de acetona, el disolvente se evapora bajo nitrógeno, se someten a siliación (Sweeley *et al.*, 1963) y, finalmente, se disuelven en 40 μ l de hexano para su análisis por CG-FID y en 30 μ l para el CG-EM. Las condiciones cromatográficas utilizadas son las descritas en el cuadro nº 44.a y 44.b).

Los SOP son identificados por comparación de su tiempo de retención y espectro de masas con los de patrones comercializados de COP y 7-cetoestigmasterol, y con los patrones de POP sintetizados (apartado B.5.1).

La cuantificación de los SOP se realiza por comparación de las áreas cromatográficas del PI 19-hidroxicolesterol y su concentración

con las áreas de los picos de los SOP de los cromatogramas de las muestras. El factor de respuesta en CG de los SOP con respecto al PI se considera igual a 1.

B.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la aplicación de los tratamientos estadísticos, se recurre a la ayuda del paquete informático Statgraphics v. 3.1.

Para detectar las posibles diferencias entre los contenidos de AG de las muestras A, B, C, D, E y F, se aplica un ANOVA de un factor y un test de Tukey (HSD, honest significant difference) a un nivel de probabilidad del 95% ($p < 0.05$). Se procede del mismo modo para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos de esteroides en las muestras A y B.

La influencia de los tres factores estudiados, tipo de muestra (A y B), temperatura (25, 30 y 37 °C) y tiempo de almacenamiento (0, 1, 2, 4, 5, 7, 8 y 9 meses) en los contenidos de MDA, pentano, pentanal y heptanal, es estudiada mediante un ANOVA de tres factores y un test de Tukey para identificar diferencias significativas. Para analizar el efecto de la muestra B con respecto a la muestra A en los contenidos de pentano, pentanal y heptanal, se utilizaron variables cualitativas (*dummy variables*). En el caso del hexanal, para evaluar la influencia de temperatura y tiempo de almacenamiento, se aplica un ANOVA de dos factores y un test de Tukey.

En cuanto a los óxidos de esteroides, el ANOVA aplicado es de dos factores (tiempo de almacenamiento y tipo de muestra) y también se aplica un test de Tukey.

En el caso de los componentes volátiles, se realizan análisis de regresión múltiple, con el fin de obtener modelos predictivos del contenido en función del tiempo de almacenamiento, la temperatura y/o tipo de muestra.

**RESULTADOS, EVALUACIÓN ESTADÍSTICA Y
DISCUSIÓN**

*RESULTS, STATISTICAL EVALUATION AND
DISCUSSION*

A. FAT CONTENT

The fat content of the ready-to-eat infant foods is shown in table 45. The results are presented as mean value \pm standard deviation of five replicates of each sample.

Table 45. Fat content. Amount (g and percentage of 100 g of sample) and extraction yield (% with respect to fat content declared by manufacturer in labeling, (2.6%)) of lipid extraction.

Sample A					
Sample (g)	Extracted fat			Yield (%)	
	g	% of sample			
50.63	1.22	2.41	2.52 \pm 0.11*	92.68	96.83 \pm 4.04*
50.40	1.34	2.66		102.26	
50.24	1.29	2.57		98.76	
50.53	1.28	2.53		97.43	
50.45	1.22	2.42		93.01	
Sample B					
Sample (g)	Extracted fat			Yield (%)	
	g	% of sample			
50.70	1.22	2.41	2.52 \pm 0.10*	92.55	96.92 \pm 3.72*
50.19	1.26	2.51		96.56	
50.24	1.23	2.45		94.16	
50.23	1.31	2.61		100.31	
50.63	1.33	2.63		101.03	

*Expressed as mean \pm standard deviation

The fat content of both types of samples is 2.5% and the extraction yields surpass in both cases the 95% of the declared fat content.

B. FATTY ACID PROFILE

B.1. MILK AND CEREAL-BASED INFANT FOODS

In order to better understand the oxidative behavior of ready-to-eat infant foods, as well as to obtain more information about the quality and unsaturation degree of their lipid fraction, total fatty acid (FA) composition of these food products was determined.

A chromatogram, corresponding to the FA profile (main FA identified) of the milk and cereal-based infant foods (sample A) obtained by GC-FID is reported in figure 14.

The FA profile of the liquid infant foods, determined by GC-FID as fatty acid methyl ester (FAME) is presented in table 46. The composition in FA is expressed in g/100 of lipids as mean value \pm standard deviation of three replicates of lipid extract. Since no significant differences ($p > 0.05$) were found between the FA composition of A and B, only FA of sample A are reported.

The most abundant FA were the C18:1 isomers, followed by linoleic acid and saturated FA (SFA) - palmitic, lauric, myristic, stearic.

The total FA composition of the samples here analyzed displayed a wide range of FA, which reflect the original composition of the raw materials and/or ingredients.

Figure 14. Fatty acid profile of cereal-based infant foods (sample A). Main fatty acids are identified.

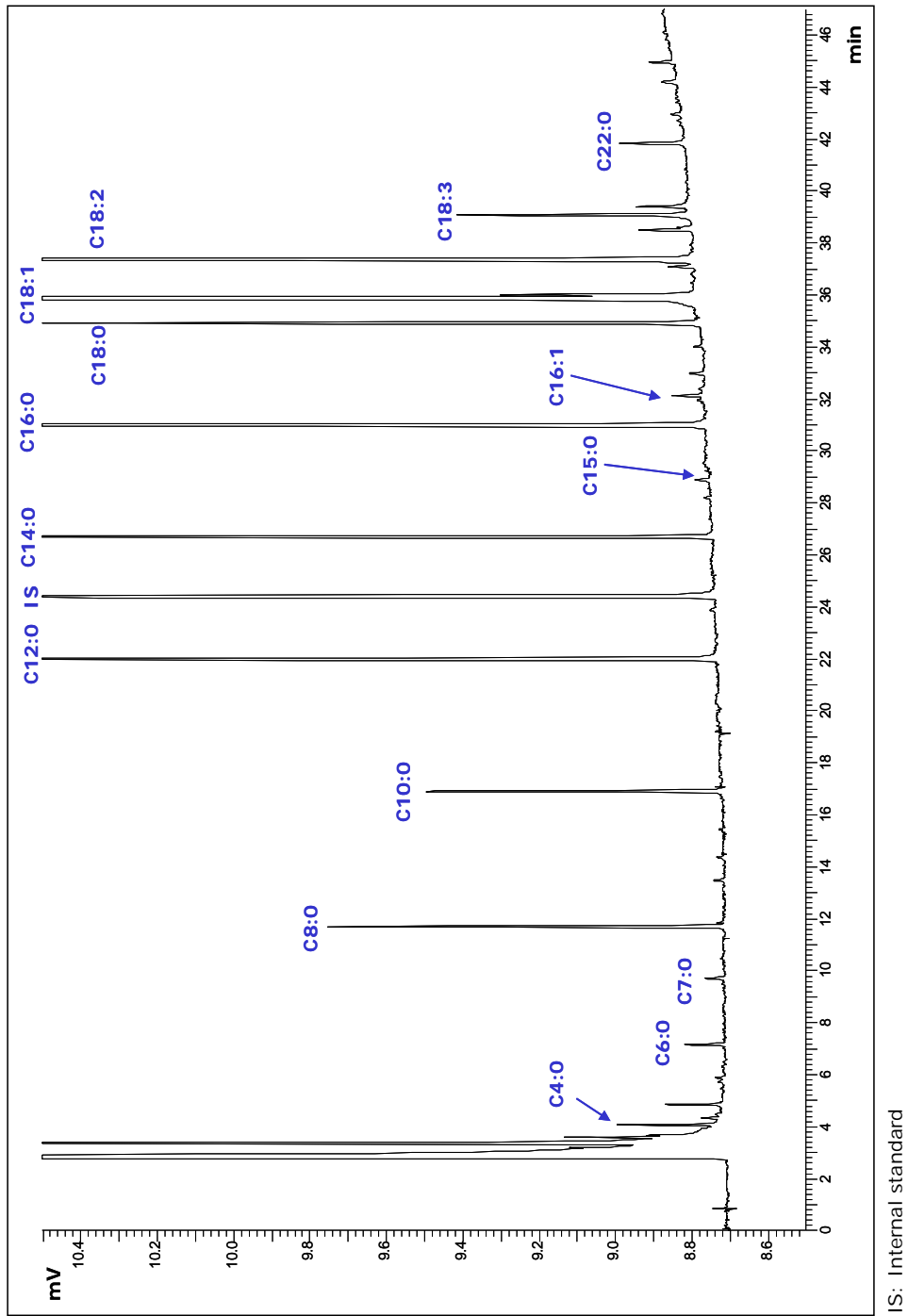


Table 46. Fatty acid profile (g/100 g of lipids) of sample A (values are given as mean value \pm standard deviation of three replicates), fatty acid classes (g/100 g of lipids) and their ratios.

Fatty acid	g/100 g lipids
C4:0	0.25 \pm 0.04
C6:0	0.17 \pm 0.02
C7:0	0.07 \pm 0.00
C8:0	1.63 \pm 0.08
C9:0	0.02 \pm 0.00
C10:0	1.31 \pm 0.10
C12:0	10.52 \pm 0.62
C12:1	0.02 \pm 0.00
C14:0	4.40 \pm 0.00
C14:1	0.03 \pm 0.00
C15:0	0.06 \pm 0.00
C16:0	18.55 \pm 1.06
C16:1 ^t	0.03 \pm 0.00
C16:1	0.13 \pm 0.02
C17:0	0.05 \pm 0.00
C17:1	0.03 \pm 0.00
C18:0	3.20 \pm 0.01
C18:1 ^c + C18:1 ^t ^b	38.23 \pm 3.66
C18:1 ^c 11 ^c	0.84 \pm 0.04
C18:2 ^t ^d	0.17 \pm 0.03
C18:2 ^e	18.92 \pm 1.36
C20:0	0.27 \pm 0.00
C18:3 ^t ^f	0.16 \pm 0.01
C18:3 ^g	1.04 \pm 0.07
C20:1	0.25 \pm 0.03
C22:0	0.35 \pm 0.02
C22:1	0.04 \pm 0.01
C24:0	0.13 \pm 0.02
Fatty acid class (%) ^h	
SFA	40.98
MUFA	39.57
PUFA	19.96
TFA	0.36
PUFA/SFA	0.49
UFA/SFA	1.45
n-6/n-3	18.19

^aC18:1^c is the oleic acid; ^bC18:1^t is the sum of all positional *trans* isomers (*t*₄ C18:1 to *t*₁₆ C18:1); ^cC18:1 ^c11 is the *cis* vaccenic acid; ^dC18:2^t is the sum of the positional *trans* isomers of linoleic acid (*c*₉,*t*₁₂ C18:2; *c*₉,*t*₁₃ C18:2; *t*₈,*c*₁₂ C18:2; *t*₉,*t*₁₂ C18:2; *t*₉,*c*₁₂ C18:2); ^eC18:2 is the linoleic acid; ^fC18:3^t is the sum of the positional *trans* isomers of linolenic acid (*c*₉,*c*₁₂,*t*₁₅ C18:3; *c*₉,*t*₁₂,*c*₁₅ C18:3; *t*₉,*c*₁₂,*t*₁₅ C18:3; *t*₉,*c*₁₂,*c*₁₅ C18:3); ^gC18:3 is the linolenic acid; ^hFatty acid class (expressed as percentages in 100 g of lipids): SFA (saturated fatty acids); MUFA (monounsaturated fatty acids); PUFA (polyunsaturated fatty acids); UFA (unsaturated fatty acids); TFA (*trans* fatty acids)

Short-chain FA (C4-C8) probably derive from skimmed milk. The high oleic acid content, as well as the relatively limited amount of linoleic acid (18.9 g/100 g lipids), may correspond to the addition of high-oleic sunflower oil as ingredient; this can be further confirmed by the occurrence of 7-stigmastenol, which is characteristic of this type of vegetable oil. Such level of linoleic acid, nevertheless, could be also attributed to soybean and rapeseed oils. On the other hand, the presence of large amounts of saturated FA (mainly palmitic, lauric and myristic acids) could be ascribable to palm oil, coconut or palm kernel oil. Other essential FA α -linolenic, which may be from rapeseed or soybean oil, exhibited lower amounts (1.04 g/100 g lipids) (Kamm *et al.*, 2001).

Since the contents of the long-chain fatty acid C22:1 (erucic acid) are very low, canola oil or other kind of low erucic rapeseed oil could have also been used in the formulation.

Trans isomers of C16:1, C18:2 and C18:3 were the predominant *trans* FA (TFA) group, reaching levels of 0.03, 0.17 and 0.16 g/100 g of lipids, which can be considered within the usual TFA range for refined, non hydrogenated fats. Although total TFA content is relatively low (0.36 g TFA/100 g lipids), their occurrence should be taken into account since TFA can be absorbed, metabolized and incorporated into blood and tissue lipids by unweaning babies, according to the ESPGHAN (Aggett *et al.*, 1991). TFA have been suggested to exhibit potential adverse effects on fetal and infant growth and development, possibly through inhibition of desaturation of the parent n-6 and n-3 FA, linoleic acid and α -linolenic acid, respectively to their respective long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) metabolites (Koletzko, 1992; Sugano and Ikeda, 1996;

Decsi *et al.*, 2001; Elias and Innis, 2001). The maximum level of TFA in infant formulas (IF) and follow-on formulas is proposed to be 3% of the total FA (European Commission (EC), 2003; Koletzko *et al.*, 2005). A recent EC Directive states that TFA content in IF shall not exceed 3% of the total fat content (Directive 2006/141/CE); however, no regulations have been published about TFA content in processed cereal-based baby foods yet (Directive 2006/125/CE). Furthermore, according to this Directive, as our samples do not exceed 4.5 g of lipid/100 kcal, any regulations exist on lauric, myristic and linoleic acids contents.

Table 46 shows the sums of the different FA fractions (expressed as percentages in 100 g of lipids) as well as the polyunsaturated FA (PUFA)/SFA and the unsaturated FA (UFA)/SFA ratios. UFA approximately accounted for 60% of total FA, resulting in a linoleic/ α -linolenic ratio of 18.2, higher than the one suggested by the EC Directive for IF (5-15) (Directive 2006/141/CE) which is used to ascertain a proper balance between the precursors of the n-6 and n-3 fatty acid series, as well as the LC-PUFA and eicosanoids resulting from their metabolism (Koletzko *et al.*, 2005).

B.2. INFANT FORMULAS

Figure 15 exhibits the GC trace of the FA profile of sample C obtained by GC-FID under the assay conditions above-mentioned; main FA are identified.

Table 47 reports the FA profiles of samples C, D, E and F, determined by GC-FID as FAME. The FA composition is given as percentages of the total FA content.

Figure 15. Fatty acid profile of infant formulas (sample C). Main fatty acids are identified.

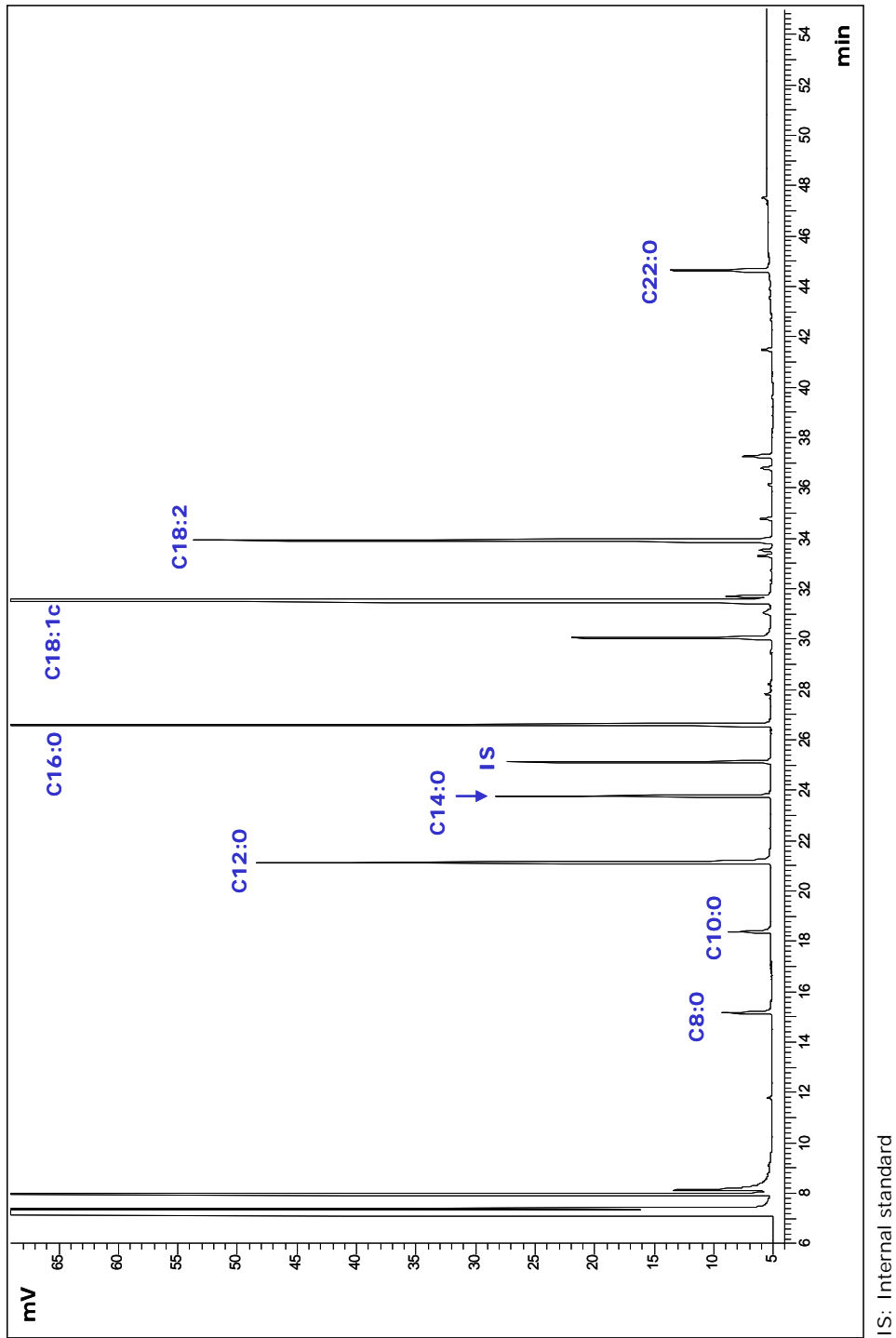


Table 47. Fatty acid profile (percentage of total fatty acids) of infant formulas (samples C, D, E and F) (values are given as mean value \pm standard deviation of three replicates), fatty acid classes (percentage of total fatty acids) and their ratios.

Fatty acid (%)	Sample			
	C	D	E	F
C6:0	0.11 \pm 0.01	0.21 \pm 0.09	0.03 \pm 0.05	0.09 \pm 0.02
C8:0	1.25 \pm 0.15	0.95 \pm 0.31	1.04 \pm 0.10	1.07 \pm 0.16
C10:0	1.08 \pm 0.05	1.37 \pm 0.08	0.99 \pm 0.17	1.32 \pm 0.20
C12:0	9.98 \pm 0.57	10.15 \pm 1.72	10.43 \pm 0.38	11.09 \pm 0.89
C14:0	4.74 \pm 0.10	5.88 \pm 0.23	4.87 \pm 0.02	5.06 \pm 0.10
C16:0	20.94 \pm 0.15	22.58 \pm 0.30	21.96 \pm 0.22	20.41 \pm 0.12
C16:1	0.12 \pm 0.01	0.40 \pm 0.04	0.15 \pm 0.04	0.15 \pm 0.01
C18:0	4.35 \pm 0.42	5.76 \pm 0.39	4.49 \pm 0.15	4.35 \pm 0.38
C18:1 ^a	40.04 \pm 0.70	36.49 \pm 1.16	39.54 \pm 0.63	39.04 \pm 0.75
C18:2 ^b	15.07 \pm 0.25	13.42 \pm 0.38	13.69 \pm 0.14	14.97 \pm 0.33
C20:0	0.32 \pm 0.01	0.29 \pm 0.02	0.32 \pm 0.02	0.33 \pm 0.01
γ -C18:3 ^c	0.13 \pm 0.00	0.12 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01
α -C18:3 ^d	0.91 \pm 0.04	0.85 \pm 0.03	0.91 \pm 0.01	0.97 \pm 0.03
C22:0	0.31 \pm 0.00	0.29 \pm 0.02	0.30 \pm 0.02	0.33 \pm 0.01
C20:4 ^e	n.d.	0.09 \pm 0.01	n.d.	n.d.
C20:5 ^f	0.12 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01
C22:6 ^g	n.d.	0.20 \pm 0.01	n.d.	n.d.
Fatty acid class (%)^h				
SFA	43.08	47.48	44.43	44.05
MUFA	40.16	36.89	39.69	39.19
PUFA	16.23	14.79	14.90	16.20
PUFA/SFA	0.38	0.31	0.34	0.37
UFA/SFA	1.31	1.09	1.23	1.26
n-6/n-3 (*)	14.76 (16.56)	11.75 (15.79)	13.61 (15.04)	13.73 (15.43)

^aC18:1c is the oleic acid; ^bC18:2 is the linoleic acid; ^c γ -C18:3 is the γ -linolenic acid; ^d α -C18:3 is the α -linolenic acid; ^eC20:4 is the eicosatetraenoic acid; ^fC20:5 is the eicosapentaenoic acid; ^gC22:6 is the docosahexaenoic acid; ^hFatty acid class (expressed as percentages of total fatty acids): SFA (saturated fatty acids); MUFA (monounsaturated fatty acids); PUFA (polyunsaturated fatty acids); UFA (unsaturated fatty acids (MUFA + PUFA)); n.d. = not determined (below the limit of quantitation (LOQ = 0.01 g/100 g of lipids)); * linoleic/ α -linolenic ratio as requested by EC regulation (Directive 2006/141/CE)

When a one way factor (type of sample) ANOVA was applied to FA contents, except for C20:4 and C22:6 FA, no significant differences (p value = 0.99) in the individual FA contents among the analyzed samples were found.

In all the samples, the most abundant FA was the oleic acid, followed by palmitic, linoleic acid and SFA - lauric, myristic, stearic (table 46).

The oleic acid content could be attributed to high-oleic sunflower or soybean oils used in the formulation, which could have also provided linoleic acid. Other vegetable oils, as palm oil and coconut or palm kernel oils, could have been used as ingredients in order to provide palmitic acid and lauric and myristic acids, respectively. Other essential FA α -linolenic, which may derive from rapeseed or soybean oil, exhibited lower amounts (Kamm *et al.*, 2001).

MUFA approximately accounted for 39% of total FA. Regarding SFA, a mean percentage of 44.8% was found in the samples and, as the EC Directive 2006/141 described, lauric and myristic acids did not surpass the 20% of the total fat content when are separately or as a whole. Moreover, the milk fat used only for the formulation of sample D did not result in significant ($p < 0.05$) higher short-chain SFA contents. The PUFA supply was 15.5% (mean percentage) of total FA.

As it can be seen from table 46, the LC-PUFA C20:4 (n-6) and C22:6 (n-3) were only detected in sample D as expected, due to fish oils and egg phospholipids added in the formulation; furthermore, this fact was also reflected in a lower n-6/n-3 ratio, but it still was within the range of 5-15 as recommended for a correct LC-PUFA and eicosanoids metabolism (Koletzko *et al.*, 2005). The corresponding n-6/n-3 ratios of the rest of samples were also in this range. However, when only linoleic and α -linolenic acids were considered, their ratios were above the range specified in the EC regulations (Directive

2006/141/CE). Specifically, the highest contents for LC-PUFA (20 and 22 carbon atoms) regulated by this Directive, were accomplished when they are added in the formulation of IF: 1% of the total fat content for n-3 LC-PUFA and 2% for n-6 LC-PUFA.

Regarding C20:5, it was identified in all samples although only one of them is enriched in LC-PUFA; it could have been provided by the choline used in the formulation of all the IF.

C. THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES

After checking the validity of the proposed method for evaluating MDA variations of IF during storage (see experimental part, section B.3.3), recovery assays were performed throughout the study, in order to confirm the accuracy of the method. For every assay, six aliquots of infant foods were prepared, three of them were spiked with known amounts of TEP standard just before the distillation, and all of them were treated for TBARS determination as the samples. Results are shown in table n° 48.

When a one-way factor ANOVA (time of storage) was applied to the different recovery values obtained, no significant differences were found (*p value* = 0.522) and, therefore the mean recovery factor (2.23) was applied to MDA contents obtained throughout the storage.

Other authors that applied also the distillation method have obtained similar recovery values: Hoyland and Taylor (1989) used a steam distillation apparatus for MDA determination in different food samples and percentage recoveries ranged from 36 to 46%. In another study (Cesa, 2004), recoveries ranging from 40 to 80% were

obtained when applying a HPLC method. Although the TBA test was mostly used to compare similar samples, the results obtained confirm the need of determining recovery values for different types of sample if absolute values are to be recorded.

Table 48. Thiobarbituric acid reactive substances. Recovery assays performed throughout the study (expressed as mean \pm standard deviation).

Month	Present*	Added*	Found*	Recovery (%)
1	58.95	234.92	155.12	41.23 \pm 0.72
		233.02	153.85	
		233.23	157.30	
2	60.13	67.28	97.71	47.64 \pm 7.18
		69.85	90.62	
		69.72	90.32	
5	64.92	43.52	83.21	48.33 \pm 9.97
		44.68	91.61	
		43.96	83.85	
7	63.56	61.68	89.13	44.51 \pm 2.74
		61.03	91.07	
		60.39	91.84	
8	74.36	61.94	102.30	42.23 \pm 4.02
		61.63	101.41	
		60.57	97.14	
Mean recovery (%) = 44.79 \pm 3.16				
Mean recovery factor = 2.23				

(* μ g/kg sample)

The MDA contents quantified in the infant foods stored at 25, 30 and 37 °C are presented in table 49 and in figure 16; a recovery

factor of 2.23 was applied. The results are expressed in $\mu\text{g}/\text{kg}$, as the mean value \pm standard deviation of three aliquots of each sample.

As it can be seen in figure 16, it was not possible to find a trend or behavior of MDA contents throughout the study.

When a three-way factor ANOVA (type of sample, time and temperature of storage) was applied, significant differences were found (p value = 0.01) according to the storage time (figure 17). Application of Tukey's test showed differences between months 2 and 8 with respect to 9. An unpredictable response was observed along the study, with no clear increase or decrease trend of MDA contents.

The observed irregular behavior of MDA values throughout storage time has already been reported in studies on lipid oxidation in different foods (Angulo *et al.*, 1998; Manglano *et al.*, 2005); this is partly due to the volatility of some of the formed compounds, and partly to reaction between these compounds and amino groups from different matrix components. Thermal treatments favor the reaction between carbonyl groups from reducing sugars and amine groups from amino acids (Maillard reaction, MR) which, among other compounds, yields furfural and HMF products. Furfural and HMF can be volatilized in steam and, for this reason, can also react with TBA to increase the TBARS values (see literature review, section E.3.1 Burcham and Kuhan, 1996; Vidaud *et al.*, 1999; Manglano *et al.*, 2005).

Table 49. Thiobarbituric acid reactive substances. MDA contents ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in samples A and B at different storage times (expressed as mean \pm standard deviation of three replicates).

Month	Sample A			Sample B		
	25 °C	30 °C	37 °C	25 °C	30 °C	37 °C
0		121.24 \pm 13.98			132.96 \pm 5.27	
1	138.30 \pm 3.28	151.50 \pm 7.99	111.99 \pm 1.45	138.30 \pm 3.28	131.64 \pm 3.01	118.71 \pm 1.12
2	152.57 \pm 1.67	150.00 \pm 8.04	147.95 \pm 1.34	150.20 \pm 3.39	157.53 \pm 20.17	147.32 \pm 2.66
4	148.55 \pm 0.69	144.71 \pm 2.50	151.43 \pm 12.33	145.18 \pm 3.51	134.19 \pm 1.32	98.21 \pm 3.57
5	96.63 \pm 4.49	95.58 \pm 0.47	144.98 \pm 5.74	143.46 \pm 1.21	138.77 \pm 4.47	134.28 \pm 0.67
7	125.90 \pm 1.38	140.31 \pm 12.53	128.85 \pm 8.46	161.41 \pm 17.95	141.13 \pm 5.56	140.58 \pm 3.95
8	152.90 \pm 3.37	148.33 \pm 5.27	142.07 \pm 9.56	138.77 \pm 2.48	138.30 \pm 5.65	166.06 \pm 4.15
9	104.98 \pm 8.60	109.98 \pm 3.24	125.70 \pm 4.87	106.52 \pm 6.14	131.06 \pm 6.32	142.21 \pm 8.33

Figure 16. Thiobarbituric acid reactive substances. MDA evolution during storage at different temperatures (expressed as $\mu\text{g}/\text{kg}$ sample).

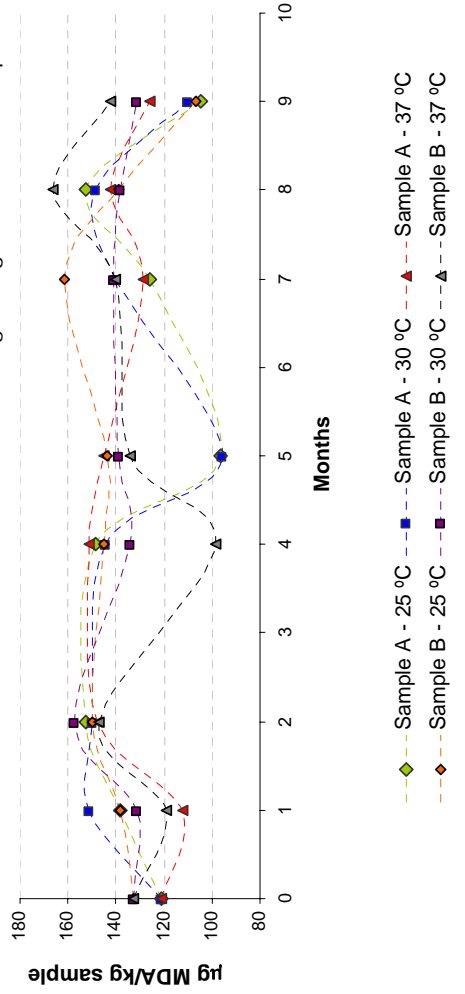
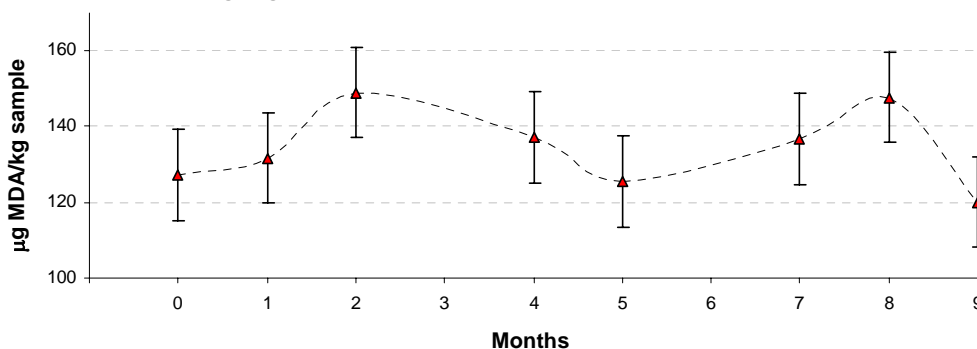


Figure 17. Thiobarbituric acid reactive substances. Tukey's honest significant difference test on MDA contents at different storage times (expressed as $\mu\text{g}/\text{kg}$ sample).



Therefore, although the TBA assay used in this study resulted in good analytical parameters, it was not suitable for monitoring lipid oxidation in this type of sample, because of the reasons aforementioned, which may either increase or decrease MDA contents.

D. VOLATILE COMPOUNDS

D.1. MILK AND CEREAL-BASED LIQUID INFANT FOODS

The contents of volatile compounds indicative of lipid oxidation in infant foods stored at 25, 30 and 37 °C are presented in table 50 and in figure 18. The results are expressed in $\mu\text{g}/\text{kg}$, as the mean value \pm standard deviation of three aliquots of each sample. As it can be observed, there was an important decrease in pentanal, hexanal and heptanal contents throughout storage, while pentane contents increased in contrast.

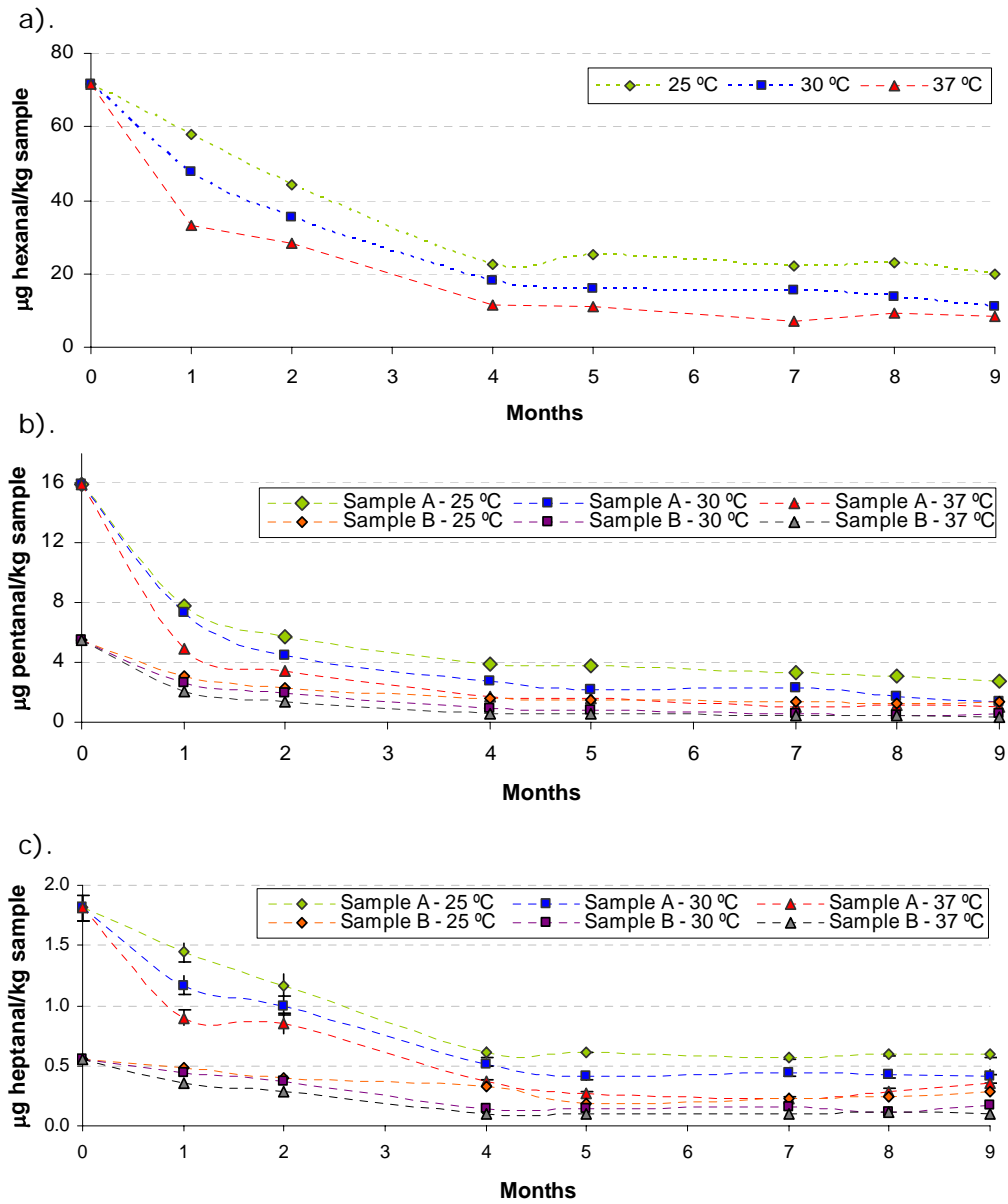
Table 50. Volatile compounds. Pentanal, hexanal, heptanal and pentane contents ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in samples A and B at different storage times (expressed as average \pm standard deviation).

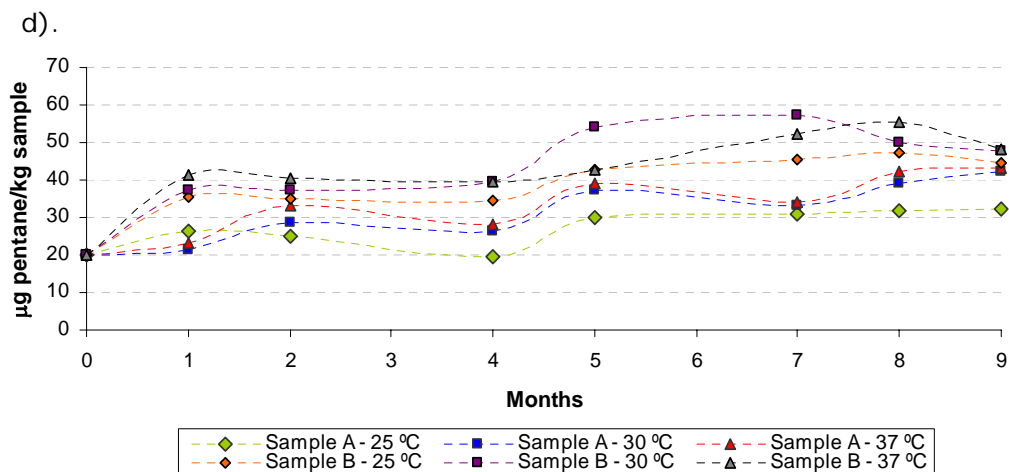
Month	Sample A						Sample B					
	25 °C		30 °C		37 °C		25 °C		30 °C		37 °C	
0												
1	58.04 \pm 1.67	47.85 \pm 2.13	33.30 \pm 2.12									
2	44.24 \pm 2.69	35.25 \pm 2.54	28.34 \pm 2.61									
4	22.34 \pm 0.95	18.00 \pm 1.25	11.58 \pm 0.56									
5	25.33 \pm 0.38	15.96 \pm 1.37	10.97 \pm 0.53									
7	22.03 \pm 2.98	15.59 \pm 0.44	7.23 \pm 0.66									
8	22.89 \pm 2.05	13.64 \pm 0.75	9.08 \pm 0.45									
9	19.91 \pm 0.42	11.03 \pm 0.54	8.18 \pm 0.39									
				Hexanal ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								
0												
1	7.79 \pm 0.08	7.32 \pm 0.30	4.91 \pm 0.23									
2	5.77 \pm 0.25	4.50 \pm 0.32	3.39 \pm 0.12									
4	3.86 \pm 0.17	2.74 \pm 0.03	1.74 \pm 0.06									
5	3.82 \pm 0.02	2.19 \pm 0.10	1.57 \pm 0.06									
7	3.28 \pm 0.28	2.24 \pm 0.02	1.07 \pm 0.03									
8	3.12 \pm 0.24	1.72 \pm 0.06	1.14 \pm 0.03									
9	2.75 \pm 0.01	1.33 \pm 0.06	0.99 \pm 0.13									
				Pentanal ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								
0												
1	15.93 \pm 0.60	7.32 \pm 0.30	4.91 \pm 0.23									
2	7.32 \pm 0.30	4.50 \pm 0.32	3.39 \pm 0.12									
4	5.49 \pm 0.17	2.74 \pm 0.03	1.74 \pm 0.06									
5	2.68 \pm 0.00	2.19 \pm 0.10	1.57 \pm 0.06									
7	2.68 \pm 0.00	2.24 \pm 0.02	1.07 \pm 0.03									
8	1.92 \pm 0.04	1.72 \pm 0.06	1.14 \pm 0.03									
9	0.86 \pm 0.03	1.33 \pm 0.08	0.99 \pm 0.13									
				Hexanal ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								
0												
1	5.49 \pm 0.17	7.32 \pm 0.30	4.91 \pm 0.23									
2	2.68 \pm 0.00	4.50 \pm 0.32	3.39 \pm 0.12									
4	2.68 \pm 0.00	2.74 \pm 0.03	1.74 \pm 0.06									
5	1.92 \pm 0.04	2.19 \pm 0.10	1.57 \pm 0.06									
7	0.86 \pm 0.03	2.24 \pm 0.02	1.07 \pm 0.03									
8	0.62 \pm 0.02	1.72 \pm 0.06	1.14 \pm 0.03									
9	0.58 \pm 0.01	1.33 \pm 0.08	0.99 \pm 0.13									
				Pentanal ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								
0												
1	5.49 \pm 0.17	7.32 \pm 0.30	4.91 \pm 0.23									
2	2.68 \pm 0.00	4.50 \pm 0.32	3.39 \pm 0.12									
4	2.68 \pm 0.00	2.74 \pm 0.03	1.74 \pm 0.06									
5	1.92 \pm 0.04	2.19 \pm 0.10	1.57 \pm 0.06									
7	0.86 \pm 0.03	2.24 \pm 0.02	1.07 \pm 0.03									
8	0.47 \pm 0.03	1.72 \pm 0.06	1.14 \pm 0.03									
9	0.45 \pm 0.03	1.33 \pm 0.08	0.99 \pm 0.13									

Table 50. Volatile compounds. Pentanal, hexanal, heptanal and pentane contents ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in samples A and B at different storage times (expressed as average \pm standard deviation) (continuation).

Month	Sample A						Sample B					
	25 °C		30 °C		37 °C		25 °C		30 °C		37 °C	
0	1.44 \pm 0.08		1.17 \pm 0.08		0.90 \pm 0.07		0.48 \pm 0.03		0.56 \pm 0.02		0.36 \pm 0.02	
1	1.17 \pm 0.09		1.00 \pm 0.08		0.85 \pm 0.08		0.40 \pm 0.04		0.44 \pm 0.02		0.29 \pm 0.01	
2	0.61 \pm 0.04		0.51 \pm 0.01		0.37 \pm 0.02		0.33 \pm 0.03		0.37 \pm 0.01		0.29 \pm 0.01	
4	0.61 \pm 0.00		0.41 \pm 0.03		0.27 \pm 0.01		0.19 \pm 0.01		0.14 \pm 0.01		0.10 \pm 0.01	
5	0.57 \pm 0.02		0.44 \pm 0.03		0.23 \pm 0.01		0.22 \pm 0.00		0.14 \pm 0.01		0.10 \pm 0.01	
7	0.60 \pm 0.02		0.42 \pm 0.02		0.29 \pm 0.02		0.24 \pm 0.01		0.15 \pm 0.01		0.10 \pm 0.01	
8	0.59 \pm 0.02		0.41 \pm 0.06		0.36 \pm 0.07		0.29 \pm 0.02		0.12 \pm 0.03		0.12 \pm 0.01	
9									0.17 \pm 0.00		0.10 \pm 0.01	
	Heptanal ($\mu\text{g}/\text{kg}$)											
0	26.40 \pm 0.91		21.51 \pm 1.68		23.36 \pm 2.18		35.55 \pm 2.01		19.96 \pm 0.66		41.44 \pm 0.97	
1	24.79 \pm 1.75		28.85 \pm 1.82		33.31 \pm 3.82		34.94 \pm 2.87		37.48 \pm 1.41		40.50 \pm 1.35	
2	19.60 \pm 2.44		26.30 \pm 0.89		28.40 \pm 1.06		34.74 \pm 1.79		37.08 \pm 1.52		39.52 \pm 3.99	
4	29.83 \pm 1.51		37.20 \pm 2.30		38.92 \pm 3.48		42.55 \pm 4.07		39.73 \pm 2.70		42.53 \pm 0.65	
5	30.85 \pm 3.58		33.32 \pm 0.68		34.19 \pm 3.28		45.54 \pm 3.54		53.94 \pm 2.21		52.17 \pm 0.75	
7	31.92 \pm 0.88		39.30 \pm 2.60		42.10 \pm 1.63		47.41 \pm 2.38		57.43 \pm 1.95		55.68 \pm 4.87	
8	32.36 \pm 1.16		42.18 \pm 1.56		43.38 \pm 3.36		44.77 \pm 4.02		50.17 \pm 4.99		48.11 \pm 1.64	
9									47.72 \pm 3.39			
	Pentane ($\mu\text{g}/\text{kg}$)											
0	19.79 \pm 3.25		19.79 \pm 3.25		19.79 \pm 3.25		19.79 \pm 3.25		19.79 \pm 3.25		19.79 \pm 3.25	
1	26.40 \pm 0.91		21.51 \pm 1.68		23.36 \pm 2.18		35.55 \pm 2.01		19.96 \pm 0.66		41.44 \pm 0.97	
2	24.79 \pm 1.75		28.85 \pm 1.82		33.31 \pm 3.82		34.94 \pm 2.87		37.48 \pm 1.41		40.50 \pm 1.35	
4	19.60 \pm 2.44		26.30 \pm 0.89		28.40 \pm 1.06		34.74 \pm 1.79		37.08 \pm 1.52		39.52 \pm 3.99	
5	29.83 \pm 1.51		37.20 \pm 2.30		38.92 \pm 3.48		42.55 \pm 4.07		39.73 \pm 2.70		42.53 \pm 0.65	
7	30.85 \pm 3.58		33.32 \pm 0.68		34.19 \pm 3.28		45.54 \pm 3.54		53.94 \pm 2.21		52.17 \pm 0.75	
8	31.92 \pm 0.88		39.30 \pm 2.60		42.10 \pm 1.63		47.41 \pm 2.38		57.43 \pm 1.95		55.68 \pm 4.87	
9	32.36 \pm 1.16		42.18 \pm 1.56		43.38 \pm 3.36		44.77 \pm 4.02		50.17 \pm 4.99		48.11 \pm 1.64	

Figure 18. Volatile compounds. Evolution during storage at different temperatures (expressed as $\mu\text{g}/\text{kg}$). a). Hexanal (in sample A); b). Pentanal (in samples A and B); c). Heptanal (in samples A and B), and d). Pentane (in samples A and B).





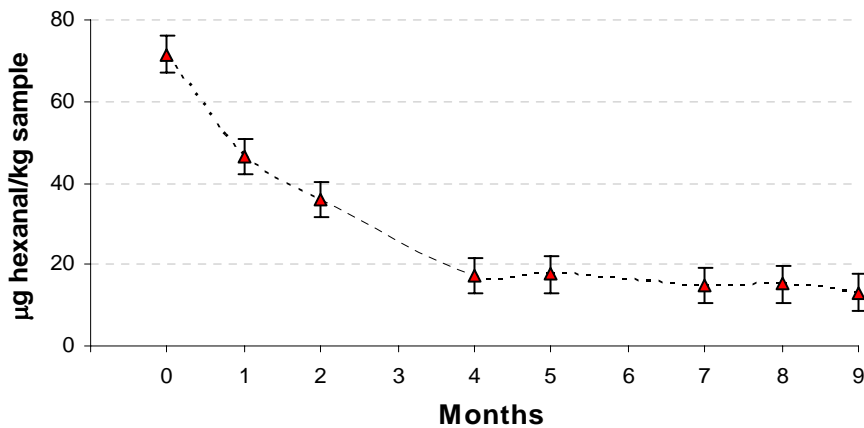
The highest aldehyde (pentanal, hexanal and heptanal) contents corresponded to just-manufactured samples (zero time). Consequently, the formation of these aldehydes can be mainly ascribed to thermal lipid degradation (Frankel, 1982) as a consequence of the heating processes included in the manufacture of these infant foods.

The values obtained show that from zero time and until the fourth storage month, the aldehyde reduction rate depends on length of the carbon chain: 82.2% for pentanal, 75.8% for hexanal and 71.4% for heptanal. The different reactivity according to the number of carbon atoms has been reported elsewhere (Pokorný *et al.*, 1977).

Storage temperature exerted a significant effect on the decrease in hexanal content, being lower at higher temperatures (37 °C < 30 °C < 25 °C) (table 50 and figure 18.a).

The two-factors (storage time and storage temperature) ANOVA showed significant differences (p values = 0.00) in hexanal content. Application of Tukey's test (figure 19) indicated that hexanal contents corresponding to months 0, 1 and 2 of storage differed among them and, also, from the rest of storage months. During the first three storage months, the hexanal content decreased with increasing storage time, even though no significant differences among different storage times were found from the fourth storage month onwards.

Figure 19. Volatile compounds. Tukey's honest significant difference test on hexanal contents at different storage times (expressed as $\mu\text{g}/\text{kg}$ sample).

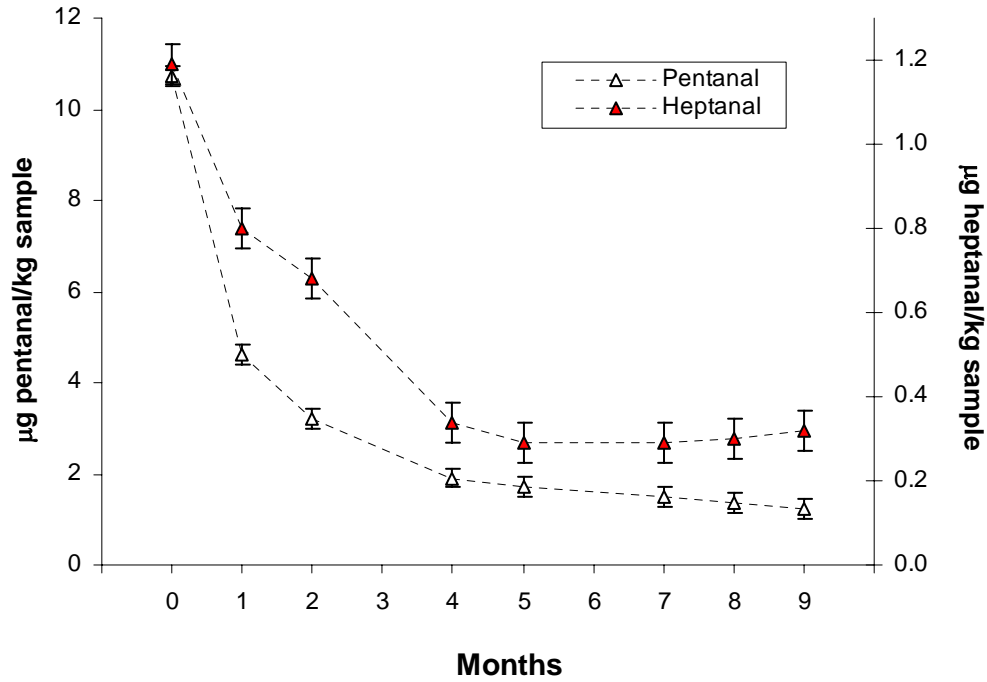


Regarding to pentanal and heptanal, as shown in table 50 and figure 18. b and 18.c., the contents were lower in sample B than in sample A and, as in the case of hexanal, contents were lower at higher storage temperatures.

When an ANOVA was applied, significant differences (p values = 0.00) were found with respect to storage time, storage temperature and type of sample. Application of Tukey's test indicated that pentanal

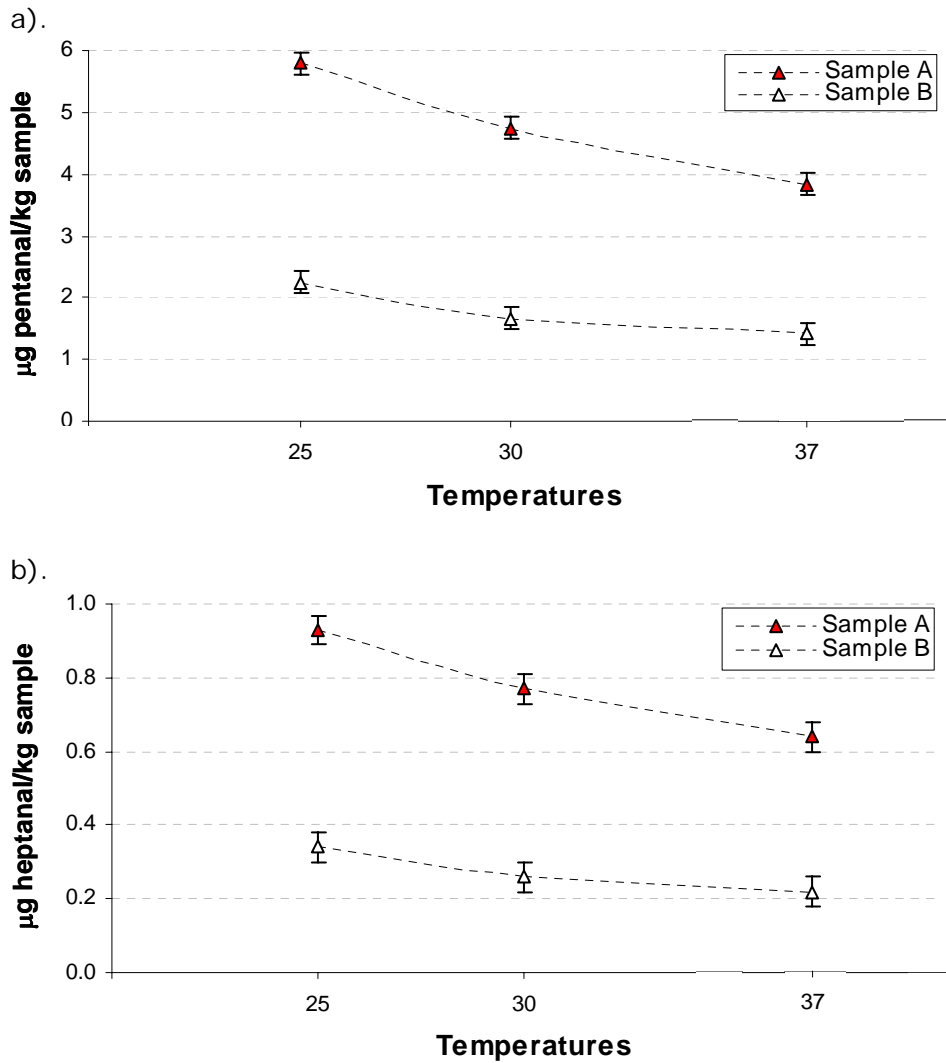
and heptanal (figure 20) contents corresponding to storage months 0, 1 and 2 differed from the rest, and both decreased with increasing storage time, as occurred with hexanal.

Figure 20. Volatile compounds. Tukey's honest significant difference test on pentanal and heptanal contents at different storage times.



When pentanal and heptanal interactions were evaluated, it was shown that, for both aldehydes, their behavior throughout storage time or at a specific storage temperature depended on the type of samples (p values = 0.00) (figure 21).

Figure 21. Volatile compounds. Interactions between type of sample and storage temperature. a). Pentanal and b). Heptanal.



Throughout storage of samples, no rancid odor of fats was detected. However, a conspicuous increase in the color of the infant foods with storage temperature and time was consistent with the development of MR as the main cause of aldehyde degradation in the analyzed samples (see literature review, section E.1.5; Pokorný,

1977; Pokorný *et al.*, 1977; Pokorný, 1981). Oxidation did not seem to be the main cause of the aldehyde degradation during storage, because samples were packed in an inert atmosphere from manufacture until analysis.

Changes in physical properties as a consequence of the interactions between oxidized lipids and proteins may also affect the organoleptic value of foods (see literature review, section E.1.5). These reactions are enhanced at water activities (a_w) higher than 0.4 (Pokorný *et al.*, 1983), this being the case in our samples.

In just-manufactured samples (zero time), no differences in pentane contents (mean: 19.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$) among samples were found. Pentane contents increased throughout storage (table 50 and figure 18.d.). Therefore, degradation of the lipid fraction initiated in the manufacturing process continues throughout storage. However, hydrocarbons (pentane) are more stable than aldehydes (Lölinger, 1990), and pentane steadily accumulates during the considered storage period.

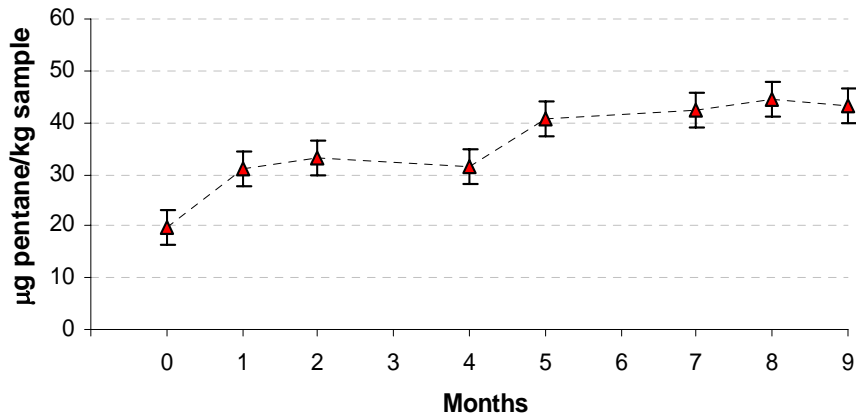
The increase in pentane content throughout storage underscores the oxidation of linoleic acid in the samples, which would also produce volatile aldehydes from the hydroperoxide decomposition (see literature review, section E.1.4) (Frankel, 1982); however, the samples evolution shows that the aldehyde disappearance rate, due to MR, exceeds the rate of aldehyde formation due to lipid oxidation.

Pentane formation is favored by the increase in storage temperature, and its presence is greater in B samples (table 50 and figure 18.d.). This fact could be attributed to a more effective prevention of lipid oxidation by honey (A) as compared to dehydrated fruits (B) (Wang *et al.*, 2004).

In the case of pentane, the application of a three-factor ANOVA indicated significant differences (p values = 0.00) with respect to storage time, temperature and type of sample. Tukey's test showed that only samples stored at 25 °C differed from the rest, having pentane contents lower than those stored at 30 and 37 °C. Regardless of the storage temperature, B samples had higher pentane contents than A.

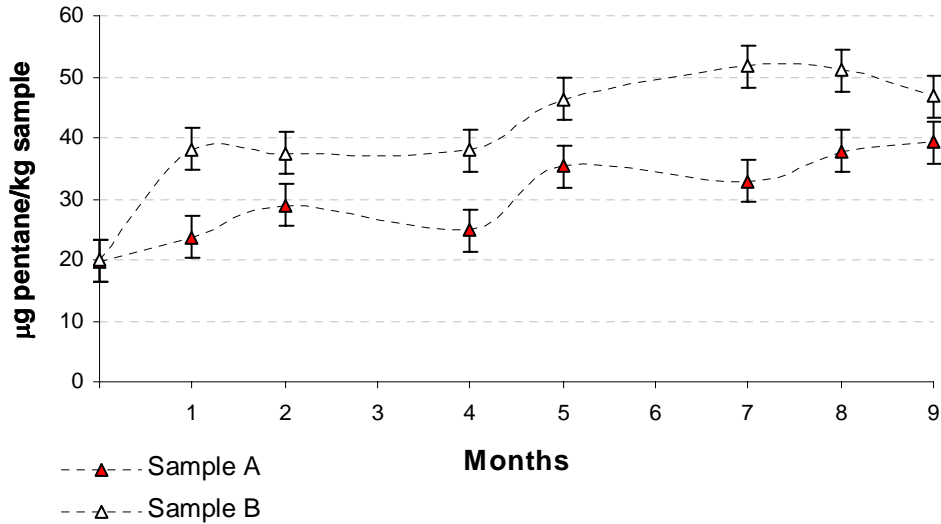
With regard to storage time, pentane contents increased (figure 22) in three steps: the lowest pentane contents corresponded to just-manufactured samples (month 0), followed by higher pentane contents in samples stored for 1, 2 and 4 months (without differences among these timepoints), and further higher levels during the following storage months (5, 7, 8 and 9) (without differences among these months).

Figure 22. Volatile compounds. Tukey's honest significant difference test on pentane contents at different storage times.



Interactions between the type of sample and storage time (p value = 0.00) were found (figure 23): the pentane contents in sample B stood out in this sense, because they experienced a greater increase than A in the first storage month.

Figure 23. Volatile compounds. Pentane interactions between type of sample and storage time.



The evolution of the analyzed volatile compound contents according to the storage variables (month and temperature) was adjusted (p value = 0.00) to the models shown in table 51. In pentanal and heptanal equations, the effect of z (indicator-*dummy* variable) was negative, i.e., pentanal and heptanal contents were lower in B than in A. The opposite occurred in relation to pentane behavior. Considering a given storage time and temperature, the correlations obtained can provide information on the level of analyzed volatile compounds and the effects of storage.

A correlation (p value = 0.00) between pentanal, heptanal and storage time was also noted in table 51, which could be used to estimate the storage time of the infant food from the corresponding pentanal and heptanal contents.

Table 51. Volatile compounds. Correlations between volatile contents, storage variables and type of sample.

Analytes	Model	R ²
Hexanal	$y = 65.186 - 0.624 T\sqrt{t}$	0.908
Pentanal	$y = 9.969 - 3.015z - 0.089 T\sqrt{t}$	0.721
Heptanal	$y = 1.348 - 0.507z - 0.01 T\sqrt{t}$	0.798
Pentane	$y = 15.812 + 10.893z + 0.250 T\sqrt{t}$	0.830
Pentanal and heptanal	$\text{pentanal} = 1.143 + 6.840 \text{ heptanal} - 0.765\sqrt{t}$	0.920

y : analyte content ($\mu\text{g}/\text{kg}$ sample); T : storage temperatura ($^{\circ}\text{C}$); t : storage time (months); z : indicator (*dummy*) variable ($z = 0$ for sample A, $z = 1$ for sample B); R^2 : squared correlation coefficient)

A review of the literature shows that several studies have evaluated the evolution of volatile compounds content as a consequence of oxidation of the lipid fraction in different foodstuffs (Robards *et al.*, 1988, Frankel, 1993; Brunton *et al.*, 2000; Sunesen *et al.*, 2001; Sanches-Silva *et al.*, 2004; Kalua *et al.*, 2006).

Increases in volatile aldehyde contents in milk exposed to different types and intensities of light have been reported (Marsili, 1999; Chung *et al.*, 2002; van Aardt *et al.*, 2005), but comparison with the results of the present study was not possible, because of the differences in the origin of the lipid fraction; the analyzed samples had greater linoleic acid contents than milk and also contained cereals, thus yielding a more complex matrix.

A general increase in volatile compound contents in UHT milk, as a consequence of thermal treatment - with differences according to the intensity of such treatment and the compound considered (pentanal, hexanal and heptanal) – even though also a decrease throughout storage (90 days at room temperature), have been reported (Contarini *et al.*, 1997). However, increases in aldehydes in UHT milk during storage have also been reported (Jeon *et al.*, 1978).

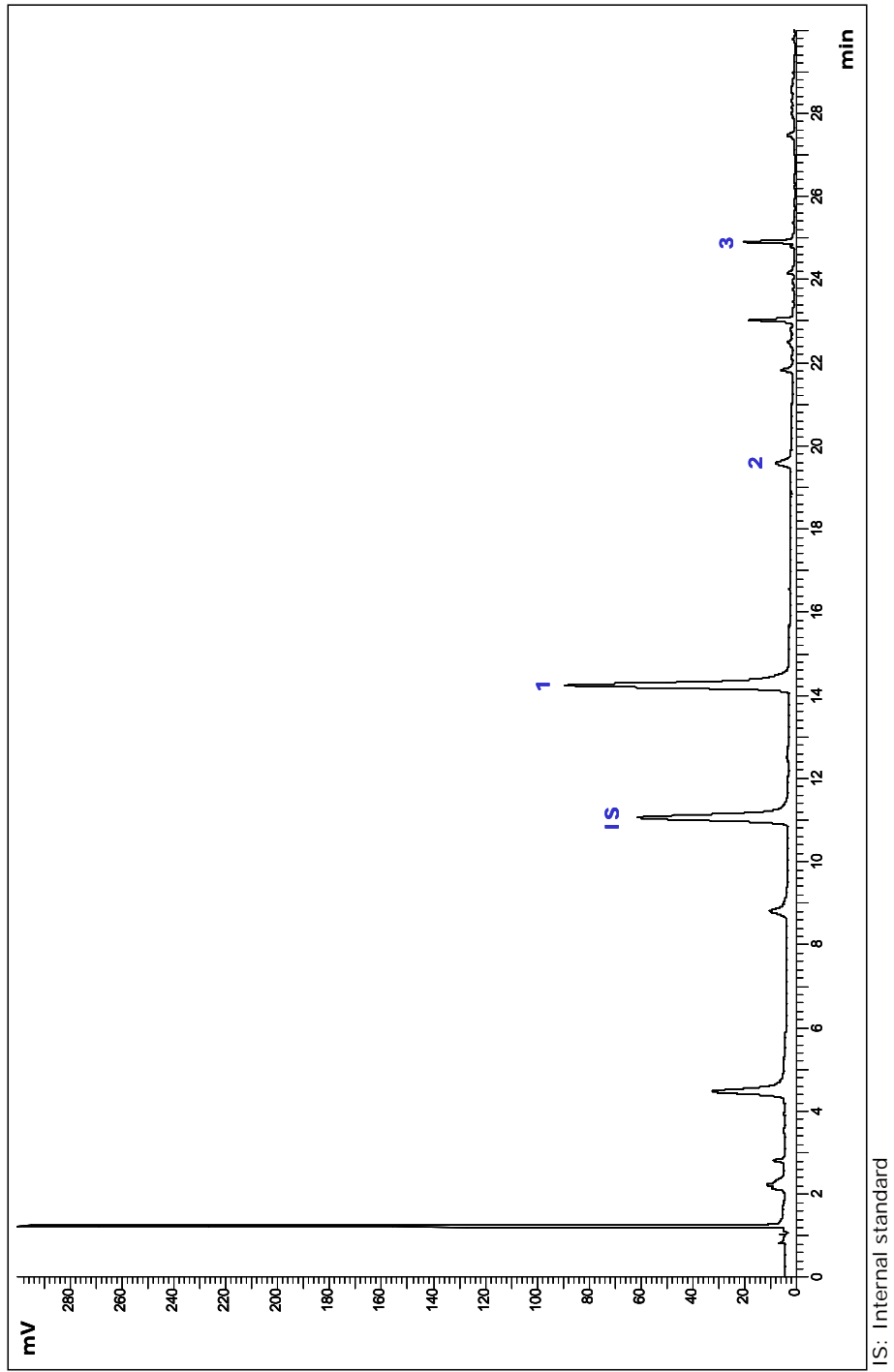
In the present study, hexanal was the most abundant volatile compound, followed by pentanal and heptanal - though the contents of these aldehydes decrease as the storage time increases. In the liquid infant foods, their high a_w does not allow important development of lipid oxidation, which can be monitored through pentane formation. In addition, some products of nonenzymatic browning with antioxidant activity, can affect lipid oxidation (Ahmad *et al.*, 1998).

The results obtained show that pentane is a good indicator of lipid oxidation in the analyzed liquid infant foods, and can be used to monitor the stability of their lipid fraction and, anyway, these products show a low oxidation level.

D.2. INFANT FORMULAS

The chromatogram from a powdered IF (sample C) obtained under the mentioned assay conditions is reported in figure 24. The peaks corresponding to hexanal, heptanal and nonanal were identified by comparing their retention times to those of the standards and also by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis.

Figure 24. Volatile compounds. Chromatogram obtained from sample C by GC-FID. Peaks numbered correspond to 1) hexanal, 2) heptanal and 3) nonanal.



Hexanal was quantified in IF because it was the most representative. The contents after 4 and 7 months manufacturing are given in table 52 as $\mu\text{g}/\text{kg}$ of powdered formula and as ng/ml of the ready-to-eat reconstituted formula (13%, w/v). The results are expressed as the mean value \pm standard deviation of three aliquots of each sample.

Table 52. Volatile compounds. Hexanal contents in powdered IF (samples C, D, E and F) after four and seven months manufacturing (expressed as average \pm standard deviation).

Sample	Months	Hexanal	
		$\mu\text{g}/\text{kg}$	ng/ml^*
C	4	7172.7 ± 454.2	932.5 ± 59.1
	7	6074.8 ± 212.6	789.7 ± 27.6
	Mean	6623.8	861.1
D	4	5877.7 ± 804.6	764.1 ± 104.6
	7	3482.6 ± 270.5	452.7 ± 35.2
	Mean	4680.2	608.4
E	4	2515.2 ± 135.2	327 ± 17.6
	7	1017.1 ± 139.7	132.2 ± 18.2
	Mean	1766.2	229.6
F	4	4650.8 ± 627.4	604.6 ± 81.6
	7	3627.4 ± 340.5	471.6 ± 44.3
	Mean	4139.1	538.1

*IF reconstituted at 13% (w/v)

The hexanal contents were lower in samples stored for seven than for four months (table 52), which could at first seem amazing, but it must be noted that the samples came from different batches because they were bought from a local supermarket, and their storage conditions before the purchase were unknown. The decrease in hexanal content could be due to its reaction with other sample components such as the MRP (see literature review, section E.1.5), although this assertion can not be categorical, because the differences

could also be ascribed to the manufacturing process (two different batches) and also to different storage conditions.

Hexanal contents from IF are also expressed as ng/ml (table 52) of the reconstituted formula to allow comparison with the analyzed cereal and milk-based liquid infant foods (samples A and B) (see section D.1). The values obtained show that in all cases, the hexanal content in IF was higher than in liquid infant foods at any storage time, partly because in IF the low a_w and a fat content of 25% (w/w) favour oxidation process.

It has to be noted that the liquid infant foods were provided by the manufacturer so they came from the same batch, the storage conditions were controlled and the same for both samples.

Despite the similarity in FA profile between the IF and the liquid infant foods, they differ in their physical state; in fact, IF were available as powder, while the analyzed milk-cereal based infant foods were liquid; in addition, the lower a_w in IF favors lipid oxidation. Furthermore, it should be noted that reconstituted IF and liquid milk and cereal-based products have rather, the same vitamin E contents (1 mg/100 ml in both types of products), whereas vitamin C contents were 6.5 and 9.7 mg/100 ml in IF and liquid infant foods, respectively (see experimental part, sections A.2 and A.3). However, in the storage conditions, IF had higher antioxidant contents than liquid infant foods and a lower a_w favouring the antioxidant activity. In this sense, Frankel (1991) indicates that α -tocopherol (hydrogen donor compound) reduces and increases the relative percentages of pentane and hexanal, respectively.

The results obtained by Ulberth and Roubicek (1995) in milk powder samples, with a fat content of 26% and stored for 130 days at

30 °C, support the latter observation; in fact, hexanal contents rose up to 106 µg/kg but no pentane was found.

Studies on the evolution of volatile compounds during milk-based infant foods storage are scarce in the reviewed literature, and only on powdered milk-based IF have been found.

The effect of antioxidant addition to stored powdered IF was evaluated by Fenaille *et al.* (2003); hexanal, pentanal and heptanal were detected, but only hexanal contents were reported. Hexanal contents ranged from 1181 to 3430 µg/kg (after 3 weeks of storage at 37 °C), and from 466 to 1022 µg/kg (after 4 weeks of storage at 37 °C) in IF without and with added antioxidants, respectively. In another study (Romeu-Nadal *et al.*, 2004), the amounts (µg/kg) of propanal, pentanal and hexanal detected in powdered IF just manufactured and stored for 4 weeks, were as follows: 1440, 1510 and 4660 in just-manufactured IF, and 5630, 8970 and 39840 after 4 weeks of storage at 50 °C, respectively. In both studies, the principal product of fat oxidation that increase during storage was hexanal, and its contents were similar to those obtained in our study, except for the 4-week storage at 50 °C.

The stability of n-3 and n-6 LC-PUFA added to powdered IF was evaluated throughout a 15-month storage (at 25 and 37 °C) by measuring hydroperoxides, headspace aldehydes (propanal, pentanal and hexanal), fatty acid content and sensory analysis (Romeu-Nadal *et al.*, 2007). Logically, propanal resulted the most abundant aldehyde in IF supplemented with higher amounts of n-3 LC-PUFA (up to 45000 µg/kg after 15 months of storage at 37 °C), and pentanal and hexanal were the most abundant in n-6 LC-PUFA supplemented IF (20000 and 45000 µg/kg after 15 months of storage at 37 °C). The sample D from

our study was the one supplemented with LC-PUFA, but this fact was not reflected in higher hexanal amounts with respect to the other samples, probably due to their non-controlled storage.

A recent study (Fenaille *et al.*, 2006) analyzed the modifications in lipid and protein fractions induced by manufacturing production in powdered and liquid IF randomly sampled (without considering their storage time or temperature); hexanal was not quantified but it was monitored by mass spectrometry response for m/z 56 (corresponding to hexanal). The highest lipid oxidation corresponded to powdered IF, followed by liquid IF, whereas hypoallergenic powdered IF gave even a lower oxidized level, which could be due to the tendency of aldehydes to react with peptides in this type of sample.

Following this last study, the results obtained in the determination of volatiles in the milk and cereal-based infant foods and the IF show that, in any case, the lipid fraction is more stable in the liquid products than in powdered IF.

E. DETERMINATION OF STEROL AND STEROL OXIDATION PRODUCTS

E.1. SYNTHESIS OF PHYTOSTEROL OXIDATION PRODUCTS

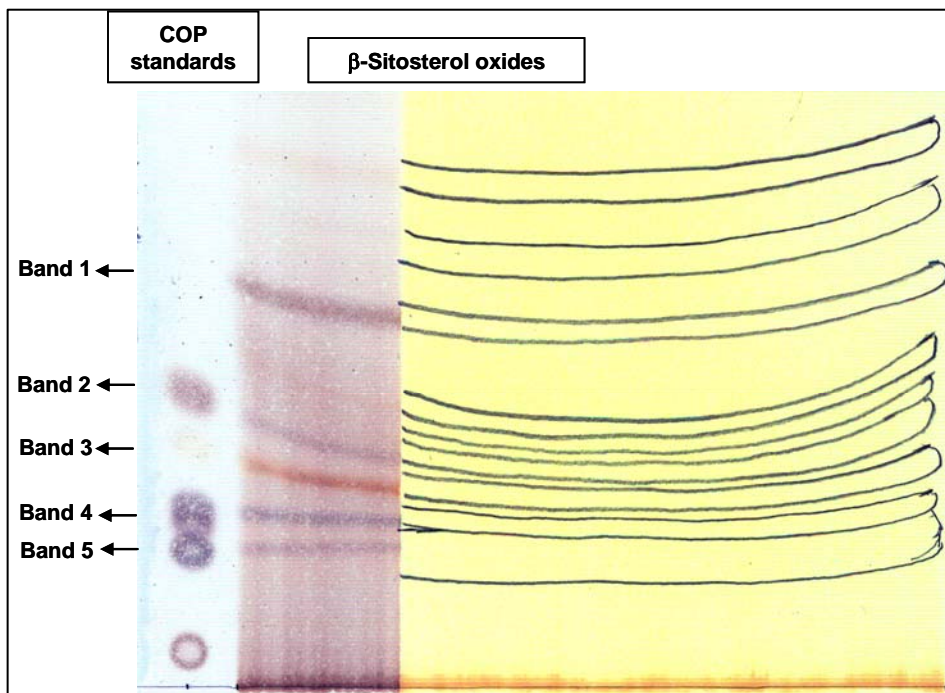
Standards of POP are not commercially available, so 7α -hydroxy, 7β -hydroxy, 7-keto, α -epoxy and β -epoxy derivatives of β -sitosterol, campesterol and stigmasterol were produced by thermo-oxidation according to Conchillo *et al.* (2005). The thin-layer chromatography (TLC) plates performed in order to separate the synthesized derivatives of each sterol (β -sitosterol and stigmasterol)

are shown in figure 25. Bands corresponding to different oxidation compounds are identified by comparing their R_f with those of COP standards also loaded on the same plates as reference. Five TLC bands were identified (table 53), from the non-oxidized phytosterols ($R_f = 0.59$, band 1) to the 7α -hydroxy derivatives ($R_f = 0.21$, band 5).

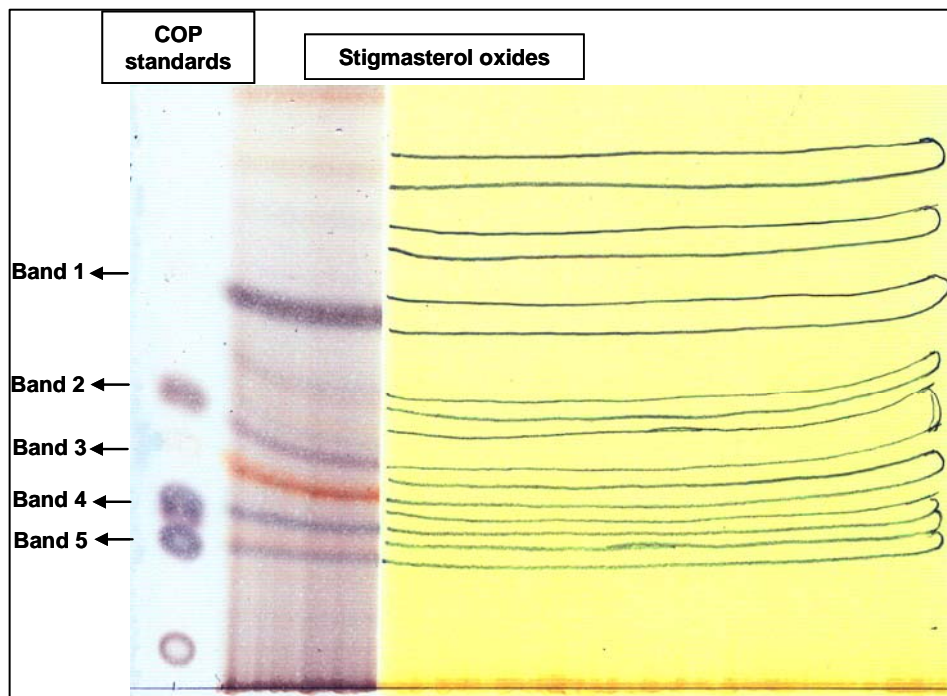
As it can be observed from the figure 25, the bands corresponding to 7α -hydroxy and 7β -hydroxy derivatives displayed a blue color after treatment with sulfuric acid (80% v/v), which is in agreement with Chicoye *et al.* (1968), Daly *et al.* (1983) and Bortolomeazzi *et al.* (1999).

Figure 25. Synthesis of POP. TLC plates of synthesized oxides: (a) β -sitosterol and (b) stigmasterol.

a). β -Sitosterol



b). Stigmasterol



The R_f of the TLC bands, the RRT (with respect to 19-hydroxycholesterol, used as IS) from gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) and GC-MS analysis and the identification of the main synthesized POP are shown in table 53. The GC elution order of the different classes of oxidation products was identical for every phytosterol: 7α -hydroxy, non-oxidized phytosterol, 7β -hydroxy, β -epoxy, α -epoxy and 7-keto derivatives; the serie of campesterol derivatives were the first to elute, followed by those of stigmasterol and β -sitosterol derivatives.

Table 53. Synthesis of POP. TLC characteristics of β -sitosterol and stigmasterol synthesized oxides, identification, RRT from GC-FID and GC-MS analysis and major significant ions of the main compounds extracted from the TLC bands.

Band	R_f	Identification	GC-FID		GC-MS	
			RRT	RRT	Main fragments (base peak, bold)	
β-Sitosterol TLC						
2	0.37	β -Epoxycampesterol	1.40	1.29	488 , 485, 473, 459, 431, 398, 384, 381, 370, 366, 355, 343, 305, 261, 253, 197, 182, 163, 135, 129	
			1.44	1.32	488 , 485, 473, 459, 431, 398, 384, 381, 370, 366, 355, 343, 261, 253, 197, 182, 159, 129	
			1.64	1.35	500, 485, 482, 457, 410, 383, 359, 349, 271, 253, 227, 211, 197, 159, 123, 83	
			1.68	1.38	500, 485, 471, 439, 410, 393, 383, 367, 359, 349, 273, 271, 253 , 227, 197, 157, 129, 83	
			1.88	1.59	502, 487, 473 , 445, 412, 373, 345, 305, 211, 185, 159, 133, 107	
3	0.32	7-Ketocampesterol	1.93	1.62	486 , 473, 470, 429, 381, 341, 315, 253, 208, 161, 129	
			2.02	1.69	498 , 483, 455, 386, 359, 357, 345, 334, 317, 269, 241, 187, 161, 129	
			2.19	1.79	488 , 473 , 459, 429, 398, 359, 341, 253, 229, 211, 183, 159, 121	
			2.25	1.82	500 , 485, 272, 444, 410, 395, 359, 317, 269, 253, 227, 187, 161, 129	
			1.29	1.24	560, 488, 470 , 455, 404, 381, 365, 339, 305, 255, 233, 183, 159, 145, 129	
4	0.26	7 β -Hydroxystigmasterol	1.33	1.27	572, 482 , 253, 147, 119	
			1.53	1.41	574, 484, 469, 444, 395, 379, 353, 327, 297, 233, 208, 183, 159, 145, 129, 105	
			1.01	1.02	560, 470 , 456, 381, 366, 353, 297, 253, 208, 183, 157, 129	
5	0.21	7 α -Hydroxystigmasterol	1.04	1.06	572, 557, 533, 482 , 467, 377, 343, 297, 253, 157, 129	
			1.15	1.16	572, 557, 533, 482 , 467, 406, 370, 341, 315, 281, 253, 221, 208, 183, 168	
			Stigmasterol TLC			
2	0.37	β -Epoxytigmasterol	1.51	1.35	500, 485, 482, 457, 410, 383, 359, 349, 271, 253, 227, 211, 197, 159, 123, 83	
			1.55	1.38	500, 485, 471, 439, 410, 393, 383, 367, 359, 349, 273, 271, 253 , 227, 197, 157, 129, 83	
3	0.31	7-Ketocampesterol	1.93	1.62	486 , 473, 470, 429, 381, 341, 315, 253, 208, 161, 129	
			2.02	1.69	498 , 483, 455, 386, 359, 357, 345, 334, 317, 269, 241, 187, 161, 129	
			2.25	1.82	500 , 485, 272, 444, 410, 395, 359, 317, 269, 253, 227, 187, 161, 129	
4	0.26	7 β -Hydroxystigmasterol	1.33	1.27	572, 482 , 253, 147, 119	
5	0.21	7 α -Hydroxystigmasterol	1.04	1.06	572, 482 , 377, 343, 297, 253, 157, 129	

TLC: Thin-layer chromatography; RRT: Relative retention times (with respect to 19-hydroxycholesterol, IS); GC-FID: Gas chromatography-flame ionization detector; GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry; R_i = distance travelled by the compound/distance travelled by the solvent front

E.2. CONTENTS OF STEROLS AND STEROL OXIDATION PRODUCTS

The amount of unsaponifiable fraction obtained from the samples is shown in table 54 as the mean value \pm standard deviation of ten replicates. The percentage of unsaponifiable fraction with respect to 100 g of lipids was 3.7% for both types of samples.

A GC chromatogram of the sterol composition of sample A obtained under the analytical conditions described is shown in figure 26.

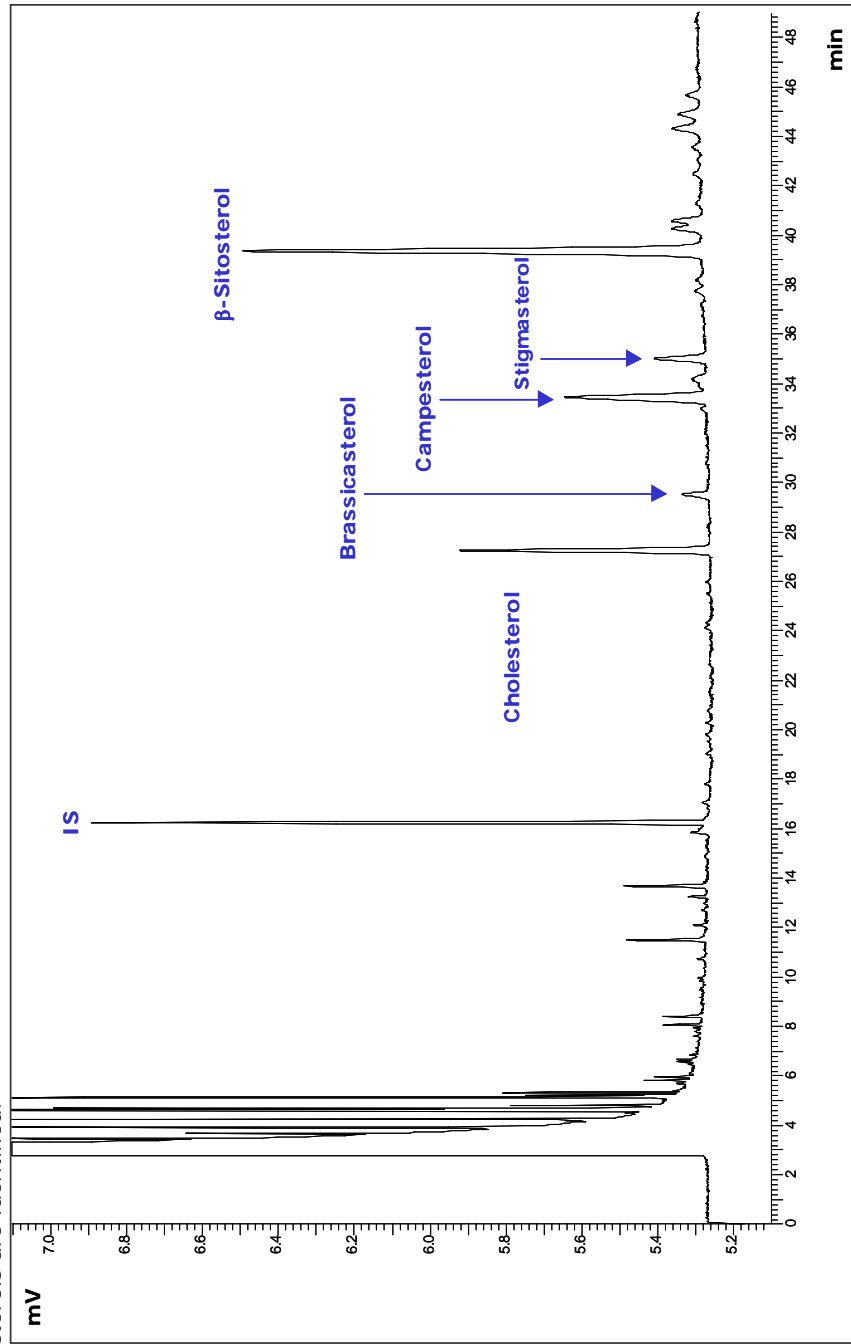
Table 55 shows the sterol composition of the analyzed infant foods. β -Sitosterol was the most representative sterol (3.37 and 3.47 mg/100 g of B and A, respectively) followed by cholesterol (1.31 and 1.34 mg/100 g of B and A, respectively) and campesterol (1.16 and 1.18 mg/100 g of B and A, respectively). Stigmasterol and brassicasterol were the less abundant sterols (0.36 and 0.18 mg/100 g, respectively); the latter might derive from rapeseed oil added as vegetable oil in the product formulation. Cholesterol occurrence may be attributed to skimmed milk and palm or palm-kernel oil (up to 7% cholesterol in these oils) (Kamm *et al.*, 2001), as deduced from the FA composition.

Table 54. Contents of sterols and sterol oxidation products. Amount (mg/100 g of lipids) and percentage (expressed in lipid basis) of the unsaponifiable fraction of samples A and B.

Sample A			
Fat extract (g)	Unsaponifiable fraction		
	mg		%
0.61	26	4.26	3.72 ± 0.53*
0.61	24.4	4.00	
0.67	18.4	2.75	
0.67	19	2.84	
0.65	26.2	4.06	
0.65	23.3	3.61	
0.64	25.4	3.97	
0.64	23.2	3.63	
0.61	24.4	4.00	
0.61	24.9	4.08	
Sample B			
Fat extract (g)	Unsaponifiable fraction		
	mg		%
0.61	22.4	3.67	3.70 ± 0.43*
0.61	18.1	2.97	
0.63	26	4.13	
0.63	22.8	3.62	
0.62	24.7	4.02	
0.62	22.8	3.71	
0.66	24.9	3.80	
0.66	26.2	4.00	
0.67	27.5	4.14	
0.67	19.6	2.95	

*With respect to 100 g of lipids expressed as mean ± standard deviation

Figure 26. Contents of sterols and sterol oxidation products. Chromatogram obtained from sample A by GC-FID. Main sterols are identified.



IS: internal standard

Table 55. Contents of sterols and sterol oxidation products. Main sterols (mg/100 g of product) found in samples A and B (values are given as mean value \pm standard deviation of three replicates).

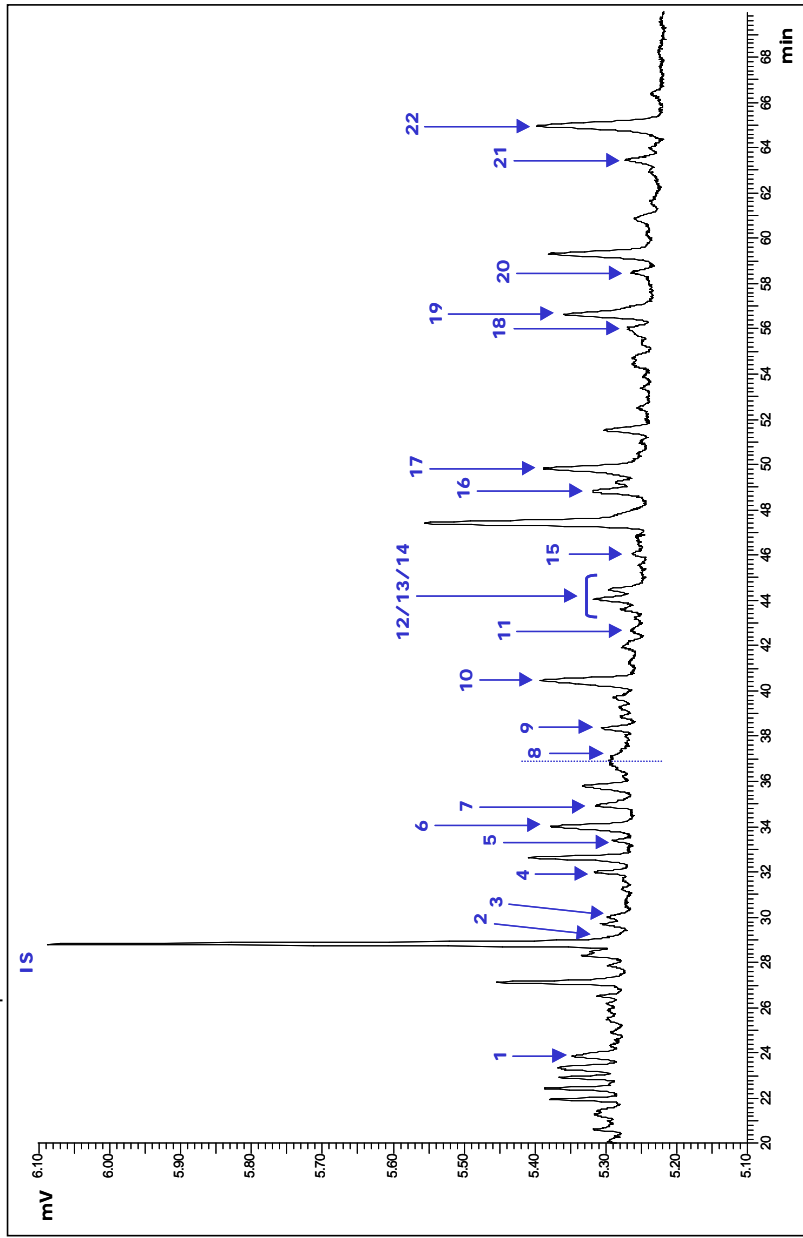
Sterol	mg/100 g of sample A	mg/100 g of sample B
Cholesterol	1.34 \pm 0.13	1.31 \pm 0.10
Brassicasterol	0.18 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02
Campesterol	1.18 \pm 0.09	1.16 \pm 0.07
Stigmasterol	0.37 \pm 0.05	0.35 \pm 0.04
β -Sitosterol	3.47 \pm 0.37	3.37 \pm 0.31
Total phytosterols	5.20 \pm 0.53	5.06 \pm 0.44
Total sterols	6.54 \pm 0.66	6.37 \pm 0.54

Limit of quantitation (LOQ) = 0.1 mg/100 g of sample calculated at a signal to noise ratio equal to 6:1)

A one way factor (type of sample) ANOVA was applied to sterol contents and no significant differences (p value = 0.09) in the individual sterol contents among the analyzed samples were found.

In figure 27, a chromatogram of the SOP present in sample A at zero time of storage is shown.

Figure 27. Contents of sterols and sterol oxidation products. Chromatogram obtained from sample A by GC-FID. Main sterol oxidation products are identified.



- 1: 7 α -Hydroxycholesterol; 2: 7 α -Hydroxycampesterol; 3: 7 α -Hydroxystigmasterol; 4: 7 β -Hydroxycholesterol; 5: 7 α -Hydroxysitosterol;
6: β -Epoxycholesterol + stigmasterol; 7: α -Epoxycholesterol; 8: 7 β -Hydroxycampesterol; 9: 7 β -Hydroxystigmasterol; 10: Cholestanetriol;
11: α -Epoxyampesterol; 12: β -Epoxystigmasterol; 13: 7 β -Hydroxysitosterol; 14: α -Epoxystigmasterol; 15: 7-Ketocholesterol;
16: β -Epoxysitosterol; 17: α -Epoxysitosterol + stigmasteranetriol; 18: 7-Ketocampesterol; 19: Sitostanetriol; 20: 7-Ketostigmasterol;
21: 6-Ketositosterol; 22: 7-Ketositosterol; IS: Internal standard

Table 56 reports the amount of sterol oxides found in ready-to-eat infant foods, during storage. The total amount of SOP ranged from 81.1 to 97.8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ in sample A and from 77.9 to 96.1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ in B. Brassicasterol oxides were not analyzed in these samples.

The main SOP found was 7-ketositosterol, followed by the coeluting pair α -epoxysitosterol+stigmastanetriol and cholestanetriol. Other SOP were detected at trace levels by GC-MS: 25-hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycampestanol (tentative), 5-hydroxysitosterol, 7 β -hydroxysitostanol (tentative) and 6-ketositosterol. Among these SOP, only the latter was quantifiable and ranged from 2.2 to 2.8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of sample.

β -epoxycholesterol coeluted with minor amounts of stigmasterol, so a correction factor was calculated considering sterol concentration before and after SPE purification; cholesterol was used for this scope, assuming that both cholesterol and stigmasterol are sterols with similar SPE adsorption coefficient. About 5.7% of the calculated β -epoxycholesterol corresponded to the coeluting stigmasterol, so it was subtracted from the reported amounts.

Table 56. Determination of sterols and sterol oxidation products. Amount of sterol oxides ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ of sample) found in samples A and B during storage (values are given as mean value \pm standard deviation of three replicates).

Months	$\mu\text{g}/100\text{ g}$ sample A					$\mu\text{g}/100\text{ g}$ sample B				
	0	2	4	7	9	0	2	4	7	9
Cholesterol										
7 α-hydroxy	4.1 \pm 0.4	3.1 \pm 0.1	3.5 \pm 0.6	3.6 \pm 0.7	3.0 \pm 0.4	4.5 \pm 1.6	3.7 \pm 0.8	2.8 \pm 0.5	2.8 \pm 0.8	3.1 \pm 0.1
7 β-hydroxy	0.7 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	ND	0.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2
β-epoxy	7.3 \pm 0.7	5.8 \pm 0.7	7.1 \pm 0.3	7.0 \pm 0.7	5.9 \pm 1.9	6.4 \pm 0.3	6.9 \pm 0.2	7.1 \pm 0.8	6.4 \pm 0.1	4.9 \pm 1.7
α-epoxy	3.7 \pm 0.2	2.8 \pm 0.2	3.5 \pm 0.2	3.8 \pm 0.2	3.1 \pm 0.6	2.8 \pm 0.1	3.7 \pm 0.8	3.7 \pm 0.8	4.5 \pm 0.2	3.1 \pm 0.1
triol	11.1 \pm 1.1	9.0 \pm 0.1	10.1 \pm 0.1	9.2 \pm 0.9	8.7 \pm 1.7	8.3 \pm 0.3	9.6 \pm 0.9	8.8 \pm 0.2	9.1 \pm 1.1	8.3 \pm 0.1
7-keto	1.0 \pm 0.5	0.7 \pm 0.4	0.7 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2	0.9 \pm 0.0	1.5 \pm 0.3	0.5 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
Campesterol										
7 α-hydroxy	0.9 \pm 0.0	0.9 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.3 \pm 0.3	1.2 \pm 0.2	1.0 \pm 0.5	0.7 \pm 0.4	1.1 \pm 0.1	1.1 \pm 0.0	0.9 \pm 0.5
7 β-hydroxy	2.4 \pm 0.1	2.1 \pm 0.2	2.2 \pm 0.6	2.2 \pm 0.5	2.3 \pm 0.9	2.0 \pm 1.2	2.7 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1	2.4 \pm 0.1	2.0 \pm 0.3
β-epoxy	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
α-epoxy	1.3 \pm 0.3	1.0 \pm 0.1	0.8 \pm 0.3	0.9 \pm 0.1	0.8 \pm 0.4	1.2 \pm 0.0	0.9 \pm 0.1	0.7 \pm 0.0	0.7 \pm 0.3	0.4 \pm 0.0
triol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7-keto	2.0 \pm 0.6	2.4 \pm 0.1	2.2 \pm 0.2	2.0 \pm 0.3	1.9 \pm 0.5	1.7 \pm 0.0	2.4 \pm 0.3	2.2 \pm 0.0	2.3 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1
Stigmasterol										
7 α-hydroxy	2.4 \pm 0.1	1.7 \pm 0.0	2.0 \pm 0.6	2.2 \pm 0.2	1.9 \pm 0.1	2.1 \pm 0.2	2.3 \pm 0.5	2.0 \pm 0.2	1.9 \pm 0.1	1.4 \pm 0.3
7 β-hydroxy	2.0 \pm 0.2	1.8 \pm 0.3	2.6 \pm 1.7	3.0 \pm 0.6	1.1 \pm 0.6	3.7 \pm 0.0	2.9 \pm 0.2	4.0 \pm 2.6	2.7 \pm 0.4	1.8 \pm 0.1
β-epoxy	1.9 \pm 0.1	1.6 \pm 0.4	1.5 \pm 0.3	1.7 \pm 0.1	1.5 \pm 0.6	1.3 \pm 0.0	1.7 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	1.6 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1
α-epoxy	3.7 \pm 0.4	3.5 \pm 0.3	3.6 \pm 0.7	3.1 \pm 0.4	3.3 \pm 1.2	2.7 \pm 0.1	3.5 \pm 0.3	3.3 \pm 0.5	3.1 \pm 0.0	2.5 \pm 0.5
7-keto	1.2 \pm 0.4	1.2 \pm 0.0	1.4 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	1.4 \pm 0.0	1.3 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2
β -Sitosterol										
7 α-hydroxy	1.4 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.4	1.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	1.2 \pm 0.0	1.1 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2
7 β-hydroxy	5.1 \pm 0.8	4.5 \pm 0.3	4.6 \pm 0.3	4.4 \pm 0.6	4.5 \pm 1.3	4.5 \pm 0.2	4.8 \pm 0.3	4.8 \pm 0.3	5.0 \pm 0.0	4.1 \pm 0.2
β-epoxy	5.6 \pm 0.9	4.7 \pm 0.1	4.9 \pm 0.4	5.4 \pm 0.1	4.9 \pm 1.5	4.5 \pm 0.1	5.8 \pm 0.7	5.2 \pm 0.0	5.3 \pm 1.0	4.6 \pm 0.2
α-epoxy*	12.7 \pm 2.2	10.7 \pm 0.0	11.9 \pm 0.5	11.0 \pm 1.0	10.3 \pm 3.5	10.0 \pm 0.1	12.1 \pm 1.4	11.3 \pm 0.2	11.6 \pm 0.2	10.1 \pm 0.5
triol	11.2 \pm 0.3	8.9 \pm 0.8	10.2 \pm 0.0	10.9 \pm 1.0	9.8 \pm 2.5	12.5 \pm 1.5	11.5 \pm 0.6	10.9 \pm 0.0	12.1 \pm 0.5	10.0 \pm 0.3
7-keto	16.1 \pm 1.8	13.3 \pm 0.1	14.4 \pm 0.1	14.4 \pm 0.5	13.8 \pm 2.9	13.9 \pm 0.7	16.0 \pm 1.5	14.5 \pm 0.8	14.9 \pm 0.4	13.7 \pm 1.0
Total oxides	97.8	81.1	89.7	89.8	81.3	87.2	96.1	89.5	91.7	77.9

* α -epoxy+stigmastanetriol; ND: Not determined (below the limit of quantification (LOQ = 0.5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of sample calculated at a signal to noise ratio equal to 6:1))

The type and total amount of SOP were similar in both types of infant food, regardless of the flavor ingredients (fruit and honey). No significant differences ($p > 0.05$) in the single SOP content were found with respect to storage time and type of sample, except for α -epoxycampesterol and sitostanetriol. The two-factor (storage time and type of sample) ANOVA, showed significant differences in α -epoxycampesterol content with regard to time of storage (p value = 0.02) and type of sample (p value = 0.04). Application of Tukey's test indicated that α -epoxycampesterol contents corresponding to months 4 and 9 differed from month 0. Regarding to sitostanetriol, significant differences (p value = 0.04) were found with respect to type of sample. However, no clear trends were observed with respect to both factors.

Although 7-keto derivatives of sterols have been previously used as reliable markers of the extent of sterol oxidation in foods (Lercker and Rodriguez-Estrada, 2000; Scopesi *et al.*, 2002; Cercaci *et al.*, 2006), their formation may vary depending on the type of food matrices and their corresponding oxidation phase/status as well (Kemmo *et al.*, 2005). In fact, the large quantitative differences found between 7-ketositosterol (mean value: 14.5 $\mu\text{g}/100$ g of sample) and 7-ketocholesterol (mean value: 0.8 $\mu\text{g}/100$ g) might be due to diverse initial levels of sterol oxidation of the raw materials (milk and vegetable oils), as well as to the processing technologies and conditions used for their production. Vegetable oils are usually subjected to refining, which leads to the formation of different types and amounts of SOP, depending on the sterol content, on the chemical structure of the sterol oxides produced and the refining process applied to the oils (Bortolomeazzi *et al.*, 2003). On the other hand, milk, the other main ingredient, is also subjected to different

processes during manufacturing, such as pasteurization and spray-drying steps, which have been reported to cause sterol oxidation in milk cereals, infant formulas and powdered milks (Zunin *et al.*, 1998; Angulo *et al.*, 1998; Przygonski *et al.*, 2000). All these events may have led to different oxidation stages in vegetable oils and milk fat.

The very low amounts of SOP found in these infant foods should not represent a health risk, because negative biological effects of SOP seem to manifest at relatively higher concentrations as compared to the daily intake that these foods would represent (Sevanian, 1991; Schroepfer, 2000; Ryan *et al.*, 2005).

7-ketositosterol and 7-ketocholesterol detected in ready-to-eat infant foods here analyzed are apparently much lower than those found in a previous study on powdered infant milk cereals (Zunin *et al.*, 1998). Zunin *et al.* (1998) reported that 7-ketositosterol and 7-ketocholesterol contents varied from 5.9 to 49.0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of sample and from 3.3 to 42.1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of sample, respectively. However, the powdered samples require water addition (about 19 g product/100 ml water) before consumption, which would result in a dilution of 7-ketositosterol and 7-ketocholesterol concentrations (1.1-9.3 and 0.6-8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of reconstituted product, respectively). Considering the reconstituted samples, their 7-ketositosterol content was about 3 times lower than those found in the infant foods here analyzed, even though β -sitosterol contents of both reconstituted and ready-to-eat samples were similar. On the other hand, reconstituted samples exhibited 7-ketocholesterol levels about 4 times higher than those detected in this study, due to their higher cholesterol content. β -Sitosterol and cholesterol displayed similar oxidation levels in powdered samples, whereas 7-ketositosterol was significantly higher

in ready-to-eat infant foods, though. The greater extent of β -sitosterol oxidation in the samples here analyzed, evinces that the ingredients from vegetable origin had a higher degree of oxidation, probably due to the quality of the raw materials and/or processing conditions.

Table 57 reports the single sterol oxidation rates (OR) found ready-to-eat infant foods.

No significant differences ($p < 0.05$) were found among the sterol OR of sample A and B and no particular OR trend was observed with respect to storage. In both types of samples, stigmasterol had the highest OR (2.4-3.4%), followed by cholesterol (1.5- 2.1%) and β -sitosterol (1.3-1.5%). Due to its scarce presence, stigmasterol OR might be more influenced by analytical errors, thus leading to a relatively higher OR with respect to those of the other sterols.

Table 57. Contents of sterols and sterol oxidation products. Sterol oxidation rates (SOP/sterol in percentages) found in samples A and B during storage (values are given as mean value \pm standard deviation of three replicates).

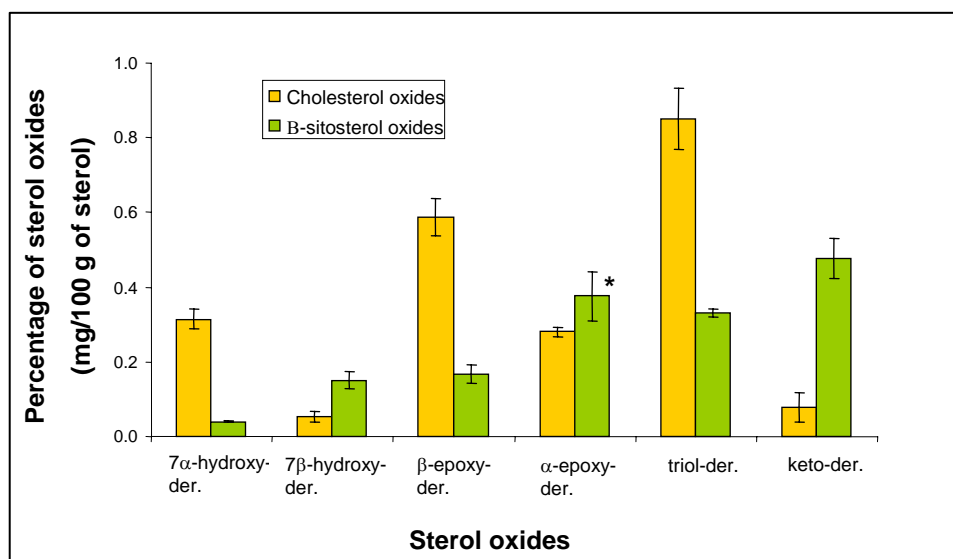
Oxidation rates (%)					
Sample A					
Months	0	2	4	7	9
Cholesterol	2.1 \pm 0.0	1.8 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1	1.9 \pm 0.0	1.7 \pm 0.3
Campesterol	0.6 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2
Stigmasterol	2.8 \pm 0.2	2.8 \pm 0.2	3.1 \pm 0.6	2.9 \pm 0.4	2.3 \pm 0.6
β -Sitosterol	1.5 \pm 0.2	1.3 \pm 0.0	1.4 \pm 0.0	1.4 \pm 0.1	1.3 \pm 0.4
Sample B					
Months	0	2	4	7	9
Cholesterol	1.8 \pm 0.0	2.0 \pm 0.2	1.9 \pm 0.2	1.9 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1
Campesterol	0.3 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
Stigmasterol	2.8 \pm 0.8	3.1 \pm 0.0	3.4 \pm 1.2	3.1 \pm 0.4	2.6 \pm 0.0
β -Sitosterol	1.4 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	1.4 \pm 0.0	1.5 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1

These remarkable differences, anyway, might be caused by the different processing technologies applied to milk and vegetable oils, as well as to the diverse sterol susceptibility to oxidation. Since ready-to-eat infant foods are oil-in-water emulsions, oxidation likely occurs at the emulsion droplet interface. In fact, phytosterols are surface active, so they could be particularly prone to oxidation (Cercaci *et al.*, 2007); this susceptibility also depends on the sterol relative concentrations at the oil-water interface.

If only 7-keto derivatives are considered, cholesterol OR is drastically reduced to 0.05-0.08% and 0.04-0.11% in A and B, respectively, whereas β -sitosterol OR decreases to 0.41-0.48% in both types of samples. Zunin *et al.* (1998) reported 0.02-0.62% and 0.08-0.46% of cholesterol and β -sitosterol OR in powdered infant milk cereals, respectively, which further confirms the higher extent oxidation of raw materials from vegetable origin used in the samples here analyzed.

Figure 38 compares the percentages of β -sitosterol and cholesterol oxides (expressed with respect to the corresponding unreacted sterol), detected in sample A at 0 months of storage. Since sterol oxides remain roughly constant during storage in both A and B, data reported in figure 38 are representative of sterol oxide percentages (%SO) in these infant foods; %SO at the beginning of the storage may provide a better picture of the original sterol oxidation level in the raw materials utilized for these products.

Figure 38. Contents of sterols and sterol oxidation products. Relative percentages of β -sitosterol and cholesterol oxides (expressed with respect to the corresponding unoxidized sterol) found in sample A at 0 months of storage. Data points represent means ($n = 3$) \pm standard deviations (some error bars may lay within the data points).



*The relative amount of α -epoxysitosterol would be likely overestimated, due to its overlapping with an unknown amount of stigmastanetriol under the analytical conditions used in this study

This figure shows that the percentages of the single β -sitosterol oxides are significantly different from those of the corresponding cholesterol oxides. In fact, the ratio between the relative amount of the 7 α -/7 β -hydroxy derivatives of cholesterol and β -sitosterol was 5.99 and 0.27, respectively. The majority of 5,6-epoxy derivatives of cholesterol were present in their β configuration, whereas those of β -sitosterol were mostly present as α -epoxy; this influenced the β -/ α -epoxy derivatives ratio, which was equal to 0.44 and 2.07 for β -sitosterol and cholesterol, respectively. It must be pointed out, though, that the %SO of α -epoxysitosterol would be likely overestimated, due to its overlapping with an unknown amount of stigmastanetriol under the analytical conditions here used. The

percentages of β -sitosterol and cholesterol triol derivatives were equal to 0.33% and 0.85%, respectively. As aforementioned, the large difference between the relative amounts of 7-keto derivatives of β -sitosterol and cholesterol further confirms their diverse stage of oxidation.

Besides the 7-keto derivatives, the other β -sitosterol oxides seem to have reached the most stable forms from the thermodynamics standpoint (Smith, 1981), i.e. 7β -hydroxy and α -epoxy rather than 7α -hydroxy and β -epoxy derivatives; cholesterol exhibits the opposite trend, though. Furthermore, the sums of the relative amounts of 7α -hydroxy, 7β -hydroxy and 7-keto derivatives were 20.6% and 43.3% for cholesterol and β -sitosterol, respectively, whereas the sums of α -epoxy, β -epoxy and triol derivatives of cholesterol and β -sitosterol were 79.4% and 56.7%. Considering that 7-hydroxy and 7-keto compounds are generated by a different oxidation pathway than epoxy and triol derivatives (Smith, 1981), these results confirm the diverse oxidation stage and origin of cholesterol and β -sitosterol in samples here analyzed. Lysis of epoxy derivatives into triols might be partly due to the interaction with hydrogen peroxide, which is released by microbial enzymes before milk UHT treatment (Lewis, 2003).

The ready-to-eat infant foods analyzed showed a low sterol oxidation level, which remains roughly constant during storage.

The low sterol oxidation level observed in these ready-to-eat infant foods might be attributed to the effectiveness of the packaging system (inert atmosphere), to the slight enrichment with vitamins having antioxidant properties (vitamins A, C and E) and to the

presence of Maillard reaction products (MRP) found in these samples (Bosch *et al.*, 2007). The antioxidant capacity of MRP (Alaiz *et al.*, 1997; Ames, 2001) might have prevented sterols from oxidizing during storage, thus maintaining the same oxidative status reached after processing. In addition, the physical state (liquid) of the milk-cereal-based infant foods could have also favored MRP solubilization, thus contributing to the product stability (García-Llatas *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

Del estudio de la estabilidad de la fracción lipídica de alimentos para lactantes se concluye:

1. Las papillas de cereales analizadas tienen un contenido de grasa del 2.5%, con una fracción insaponificable del 3.7% con respecto a 100 g de lípidos. El perfil de ácidos grasos de las papillas recién fabricadas indica que en los dos tipos de papillas (A y B) se utiliza las mismas grasas.

2. Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados se encuentran en igual porcentaje, que duplica al correspondiente de los poliinsaturados. El contenido de isómeros *trans* es de 0.36 g/100 g lípidos, claramente inferior al 3% indicado en la Directiva 141/2006/CE para fórmulas para lactantes; no se dispone de legislación específica para las papillas.

3. El método aplicado para la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico es aceptable desde el punto de vista analítico. No obstante, debido a las reacciones entre los distintos componentes de las papillas, durante el almacenamiento se producen aumentos y disminuciones del malondialdehído, que lo hacen poco útil para monitorizar el estado de oxidación.

4. El método por microextracción en fase sólida-cromatografía gaseosa, puesto a punto y validado para la determinación de compuestos volátiles, es útil para evaluar la estabilidad de la fracción lipídica de fórmulas para lactantes y papillas de cereales con leche.

5. A lo largo del almacenamiento disminuyen los contenidos de pentanal, hexanal y heptanal de las papillas, mientras que el de

pentano aumenta; en ambos casos influye la temperatura. Se propone un modelo predictivo útil para estimar el tiempo de almacenamiento de las papillas a partir de los contenidos de pentanal y heptanal.

6. El aumento del contenido de pentano durante el almacenamiento indica que la degradación lipídica iniciada en el procesado continúa. Su determinación puede usarse para evaluar la oxidación de las papillas.

7. El hexanal es el compuesto volátil mayoritario de papillas y fórmulas para lactantes. El mayor contenido de hexanal de las fórmulas para lactantes puede atribuirse a la menor actividad del agua y al mayor contenido de grasa (25%) de este tipo de productos.

8. Las papillas de cereales tienen un contenido de esteroides de 6.4%, de los cuales el 5.1% son fitosteroides. El β -sitosterol es el mayoritario (3.4%), seguido del campesterol (1.2%); estigmasterol y brassicasterol son menos abundantes.

9. Se han detectado y cuantificado un total de 22 compuestos distintos procedentes de la oxidación de esteroides, siendo mayoritario el 7-cetosterol. El almacenamiento no influye en los contenidos de esteroides oxidados, a excepción del epoxicampesterol y el sitostanol.

10. Las diferencias obtenidas entre los productos de oxidación de esteroides, con respecto a los esteroides de procedencia, indican el distinto grado de oxidación de la grasa de la leche y los aceites vegetales; estas diferencias pueden atribuirse a las distintas condiciones a que han sido sometidos durante su procesado.

Como conclusión general del estudio realizado se señala que durante la vida útil de las papillas de cereales, el grado de oxidación de los ácidos grasos y de los esteroides es bajo. Sin embargo, los potenciales efectos negativos para la salud de los productos de oxidación lipídica hacen necesario su control.

Otro factor a destacar es la gran influencia que ejercen la calidad de las materias primas y el proceso de elaboración sobre el estado de la grasa del producto final, pues sus efectos son superiores a los del almacenamiento.

From the study on the stability of the lipid fraction of infant foods, it can be concluded that:

1. The fat content of the analyzed milk and cereal-based infant foods is 2.5% and the unsaponifiable fraction is 3.7% with respect to 100 g of lipids. The fatty acid profile of the just manufactured cereal-based infant foods indicates that the same fats were used in both types of infant foods (A and B).

2. There is the same percentage of saturated and monounsaturated fatty acids, which is twice as much that of polyunsaturated fatty acids. The content of trans fatty acids is 0.36 g/100 g lipids, markedly lower than what is indicated for infant formulas (3%) in the EC Directive 141/2006/CE; no legislation is established for processed cereal-based baby foods.

3. The method applied for thiobarbituric acid reactive substances determination is suitable from an analytical point of view. However, due to reactions between the different components of the cereal-based infant foods, increases and decreases on malondialdehyde contents are produced, which makes the determination inadequate for monitoring the oxidation status.

4. The solid-phase microextraction-gas chromatography method, developed and optimized in this study, for the determination of volatile compounds, is useful to evaluate the stability of the lipid fraction of infant formulas and milk and cereal-based infant foods.

5. *Pentanal, hexanal and heptanal contents decrease through storage, whereas pentane content increases; temperature has an important effect on both cases. A predictive model useful for estimating the storage time of the cereal-based infant foods from their pentanal and heptanal contents is proposed.*

6. *The increase of pentane content throughout storage points out that lipid oxidation initiated during processing continues. Its determination can be used in order to evaluate the oxidation in cereal-based infant foods.*

7. *Hexanal is the main volatile compound in cereal-based infant foods and infant formula. The major hexanal content in infant formulas may be attributed to their lower water activity and higher fat content (25%).*

8. *The sterol content of cereal-based infant foods is 6.4%, from which a 5.1% are phytosterols. β -Sitosterol is the most representative (3.4%), followed by campesterol (1.2%); stigmasterol and brassicasterol were the less abundant.*

9. *A total of 22 different compounds from sterol oxidation have been identified and quantified, being the 7-ketositosterol the most abundant. The storage do not have influence on sterol oxidation products contents, except for epoxycampesterol and sitostanetriol.*

10. *The differences obtained between sterol oxidation products, with respect to the original sterols, indicate the different oxidation level of milk and vegetable oils; these differences may be attributed to the different conditions applied during processing.*

As a final conclusion of the present study, it can be stated that during the shelf-life of cereal-based infant foods, fatty acids and sterols show a low oxidation pattern. However, the potential negative health effects of the lipid oxidation products confirm the need of their control.

Another notable aspect is the great influence exerted by the quality of the raw materials and the manufacturing process on the lipid status of the final product, because their effects are stronger than those of storage.

BIBLIOGRAFÍA

LITERATURE CITED

A

- Adams RP. **2001**. Appendix II - Compounds listed in order of their retention time and Kovats index on DB-5. En: *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL; p: 25-40.
- Adcox C, Boyd L, Oehrl L, Allen J, Fenner G. **2001**. Comparative effects of phytosterol oxides and cholesterol oxides in cultured macrophage-derived cell lines. *J Agric Food Chem* 49:2090-2095.
- Addis PB. **1986**. Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food Chem Toxic* 24:1021-1030.
- Addis PB, Park PW, Guardiola F, Codony R. **1996**. Analysis and health effects of cholesterol oxides. En: *Food Lipids and Health*. McDonald RM, Min DB, eds. Marcel Dekker Inc., NY; p: 199-240.
- Aggett PJ, Haschke F, Heine W, Hernell O, Koletzko B, Launiala K, Rey J, Rubino A, Schöch G, Senterre J, Tormo R. **1991**. ESPGHAN (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) Committee on Nutrition: Comment on the content and composition of lipids in infant formulas. *Acta Paediatr Scand*, 80:887-896.
- Ahmad I, Alaiz M, Zamora R, Hidalgo FJ. **1998**. Effect of oxidized lipid/amino acid reaction products on the antioxidative activity of common antioxidants. *J Agric Food Chem* 46:3768-3771.
- Akihisa T, Kokke WCMC, Tamura T. **1991**. Naturally occurring sterols and related compounds from plants. En: *Physiology and Biochemistry of sterols*. Patterson GW, Nes WD, eds. AOCS, Champaign, IL; p: 172-228.
- Alaiz M, Hidalgo FJ, Zamora R. **1997**. Antioxidative activity of nonenzymatically browned proteins produced in oxidized lipid/protein reactions. *J Agric Food Chem* 45:1365-1369.
- American Chemical Society (ACS). **1980**. Committee on Environmental Improvement. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal Chem* 52:2242-2249.
- Ames JM. Melanoidins as pro- or antioxidants. **2001**. *Cerevisia* 26:210-216.
- Angulo AJ. **1997**. Indicadores de peroxidación lipídica en productos para nutrición infantil. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

- Angulo AJ, Romera JM, Ramírez M, Gil A. **1997**. Determination of cholesterol oxides in dairy products. Effect of storage conditions. *J Agric Food Chem* 45:4318-4323.
- Angulo AJ, Romera JM, Ramírez M, Gil A. **1998**. Effects of storage conditions on lipid oxidation in infant formulas based on several protein sources. *J Am Oil Chem Soc* 75:1603-1607.
- Ansari S, Garg SK, Johri BN. **1992**. Biotransformation of sterols: selective cleavage of sterol side-chain. *Biotechnol Adv* 10: 1-67.
- Ansorena D, Gimeno O, Astiasarán I, Bello J. **2001**. Analysis of volatile compounds by GC/MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona. *Food Res Int* 34:67-75.
- Ansorena D, Astiasarán I. **2004**. Effect of storage and packaging on fatty acid composition and oxidation in dry fermented sausages made with added olive oil and antioxidants. *Meat Sci* 67:237-244.
- Appleqvist LA. **2004**. Harmonization of methods for analysis of cholesterol oxides in foods – the first portion of a long road toward standardization: interlaboratory study. *J AOAC Int* 87:511-519.
- Apprich S, Ulberth F. **2004**. Gas chromatographic properties of common cholesterol and phytosterol oxidation products. *J Chromatogr A* 1055:169-176.
- Arthur CL, Pawliszyn J. **1990**. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal Chem* 62:2145-2148.
- Asakawa T, Matsushita S. **1979**. Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides. *Lipids* 14:401-406.
- Auestad N, Montalto MB, Hall RT, Fitzgerald KM, Wheeler RE, Connor WE, Neuringer M, Connor SL, Taylor JA, Hartmann EE. **1997**. Visual acuity, erythrocyte fatty acid composition, and growth in term infants fed formulas with long chain polyunsaturated fatty acids for one year. *Pediatr Res* 41:1-10.
- Azevedo Gomes H, Silva EN, Lopes do Nascimento MR, Fukuma HT. **2003**. Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat. *Food Chem* 80:433-437.

B

- Babiker A, Andersson O, Lund E, Xiu RJ, Deeb S, Reshef A, Leitersdorf E, Diczfalusy U, Björkhem I. **1997**. Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism. Comparison with high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *J Biol Chem* 272:26253-26261.
- Baggio SR, Bragagnolo N. **2006**. Cholesterol oxide, cholesterol, total lipid and fatty acid contents in processed meat products during storage. *LWT- Food Sci Technol* 39:513-520.
- Ballabriga A, Carrascosa A. **1998**. Tendencias y controversia en la composición de las fórmulas para la alimentación de los lactantes. En: *Nutrición en la infancia y adolescencia*. Ballabriga A, Carrascosa A, eds. Ergón, Madrid; p: 79-102.
- Basu A, Marnett L. **1984**. Unequivocal demonstration that malonaldehyde is a mutagen. *Carcinogenesis* 4:331-333.
- Beime OR, Heller R, Watson JA. **1977**. Regulation of 3-hydroxy-methylglutaril coenzyme A reductase activity in hepatoma tissue culture cells by pure cholesterol and several cholesterol derivatives. Evidence supporting two distinct mechanism. *J Biol Chem* 251:1745-1758.
- Belitz HD, Grosch W. *Food Chemistry*. **1999**, 2ª edición, Springer-Verlag, Berlin.
- Beljean-Leymarie M, Bruna E. **1988**. Subpicogram determination of malondialdehyde by gas-liquid chromatography with nitrogen phosphorus detector. 1. Standarization. *Anal Biochem* 173:174-184.
- Bergamo P, Fedele E, Balestrieri M, Abrescia P, Ferrara L. **1998**. Measurement of malondialdehyde levels in food by HPLC with fluorimetric detection. *J Agric Food Chem* 46:2171-2176.
- Berliner JA, Heinecke JW. **1996**. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 20:707-727.
- Berk Z. **1976**. *Braverman's introduction to the biochemistry of foods*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- Berset C, Cuvelier ME. **1996**. Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Sci Alim* 16:219-245.

- Bidlack W, Tappel A. **1973**. Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation. *Lipids* 8:203-207.
- Biedermann M, Konrad G, Mariani C. **1993**. Transesterification and on-line LC-GC for determining the sum of free and esterified sterols in edible oils and fats. *Fat Sci Technol* 95:127-133.
- Birch EE, Hoffman DR, Uauy R, Birch DG, Prestidge C. **1998**. Visual acuity and the essentiality of docosahexaenoic acid and arachidonic acid in the diet of term infants. *Pediatr Res* 44:201-209.
- Birch EE, Garfield S, Hoffman DR, Uauy R, Birch DG. **2000**. A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Dev Med Child Neurol* 42:174-181.
- Bird RD, Draper HH. **1984**. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Meth Enzymol* 105:299-305.
- Bjorkhem I. **1986**. Assay of unesterified 7-oxocholesterol in human serum by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal Biochem* 154:497-501.
- Bjorkhem I. **2002**. Do oxysterols control cholesterol homeostasis?. *J Clin Invest* 110:725-730.
- Blackburn GM, Rashid A, Thompson MH. **1979**. Interaction of 5 α -6 α -cholesterol oxide with DNA and other nucleophiles. *J Chem Soc Chem Commun* (9):420-421.
- Blanco A, Tellería JJ. **1995**. Factores inmunológicos en la leche humana. En: *Nuevas perspectivas en nutrición infantil*. Borrajo E, López M, Pajarón M *et al.*, eds. Ergón, Madrid; p: 39-49.
- Bligh EG, Dyer WJ. **1959**. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917.
- Bodin K, Diczfalusy U. **2002**. Analysis of cholesterol oxidation products in plasma, tissues and food. *Eur J Lipid Sci Technol* 104:435-439.
- Bogdanovic N, Bretillon L, Lund EG, Diczfalusy U, Lannfelt L, Winblad B, Russell DW, Björkhem I. **2001**. On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci Lett* 314:45-48.

-
- Boissonneault GA, Hennig B, Ouyang CM. **1991a**. Oxysterols, cholesterol biosynthesis, and vascular endothelial cell monolayer barrier function. *Proc Soc Exp Biol Med* 196:338-343.
 - Boissonneault GA, Hennig B, Wang Y, Ouyang CM, Krahluc K, Cunnup L, Oeltgen PR. **1991b**. Effect of oxysterol-enriched low density lipoprotein on endothelial barrier function in culture. *Ann Nutr Metab* 35:226-232.
 - Bondet V, Cuvelier ME, Berset C. **2000**. Behaviour of phenolic antioxidants in a partitioned medium: Focus on linoleic acid peroxidation induced by iron/asorbic acid system. *J Am Oil Chem Soc* 77:813-818.
 - Bortolomeazzi R, De Zan M, Pizzale L, Conte LS. **1999**. Mass spectrometry characterization of the 5 α , 7 α and 7 β -hydroxy derivatives of β -sitosterol, campesterol, stigmasterol and brassicasterol. *J Agric Food Chem* 47:3069-3074.
 - Bortolomeazzi R, Cordaro F, Pizzale L, Conte LS. **2003**. Presence of phytosterol oxides in crude vegetable oils and their fate during refining. *J Agric Food Chem* 51:2394-2401.
 - Bosch L, Alegría A, Farré R, Clemente G. **2007**. Fluorescence and color as markers for the Maillard reaction in milk-cereal based infant foods during storage. *Food Chem* 105:1135-1143.
 - Boselli E, Velazco V, Caboni MF, Lercker G. **2001**. Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. *J Chromatogr A* 917:239-244.
 - Boselli E, Caboni MF, Rodriguez-Estrada MT, Toschi TG, Daniel M, Lercker G. **2005**. Photooxidation of cholesterol and lipids of turkey meat during storage under commercial retail conditions. *Food Chem* 91:705-713.
 - Bösinger S, Luf W, Brandl E. **1993**. Oxysterols; their occurrence and biological effects. *Int Dairy J* 3:1-33.
 - Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE. **1999**. Percent cholesterol absorption in normal men and women quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res* 40:302-308.
 - Botsoglou NA, Fletouris DJ, Papageorgiou GE, Vassilopoulos VN, Mantis AJ, Trakatellis AG. **1994**. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *J Agric Food Chem* 42:1931-1937.

- Bovenkamp P, Kosmeijer-Schuil TG, Katan MB. **1988**. Quantification of oxysterols in Dutch food. *Lipids* 23:1079-1085.
- Bradley DG, Min DB. **1992**. Singlet oxygen oxidation of foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 31:211-236.
- Brooks CJW, McKenna RM, Cole WJ, MacLachlan J, Lawrie TDV. **1983**. "Profile" analysis of oxygenated sterols in plasma and serum. *Biochem Soc Trans* 11:700-701.
- Brown MS, Goldstein JL. **1975**. Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell* 6:307-316.
- Brown AJ, Leong S, Dean RT, Jessup W. **1997**. 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J Lipid Res* 38:1730-1745.
- Brunton NP, Cronin DA, Monahan FJ, Durcan R. **2000**. A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chem* 68:339-345.
- Bueno M, Sarriá A, Pérez-González JM. **2002**. *Nutrición en pediatría*. 2ª ed., Ergón, Madrid.
- Burcham PC, Kuhan T. **1996**. Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malonaldehyde. *Biochem Biophys Com* 220:996-1001.
- Burcham PC. **1998**. Genotoxic lipid peroxidation products: Their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 13:287-305.
- Burguess JR, Stevens L, Zhang W, Peck L. **2000**. Long-chain polyunsaturated fatty acids in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Clin Nutr* 71(suppl):327S-330S.
- Burkard I, Rentsch KM, von Eckardstein A. **2004**. Determination of 24S- and 27-hydroxycholesterol in plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Lipid Res* 45:776-781.
- Burr GO, Burr MM. **1929**. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from diet. *J Biol Chem* 82:345.

C

- Caboni MF, Costa A, Rodriguez-Estrada MT, Lercker G. **1997**. High performance liquid chromatographic separation of cholesterol oxidation products. *Chromatographia* 46:151-155.
- Calvo MV, Ramos L, Fontecha J. **2003**. Determination of cholesterol oxides content in milk products by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Sep Sci* 26:927-931.
- Cercaci L, Conchillo A, Rodríguez-Estrada MT, Ansorena D, Astiasarán I, Lercker G. **2006**. Preliminary study on health-related lipid components of bakery products. *J Food Protect* 69:1393-1401.
- Cercaci L, Rodriguez-Estrada MT, Lercker G, Decker EA. **2007**. Phytosterol oxidation in oil-in-water emulsion and bulk oil. *Food Chem* 102:66-76.
- Cervera P. **2000**: Alimentación maternoinfantil, 2ª ed, Masson.
- Cesa S. **2004**. Malondialdehyde contents in infant milk formulas. *J Agric Food Chem* 52:2119-2122.
- Chang TY, Limanek JS, Chang C. **1981**. Evidence indicating that inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by low density lipoprotein or by 25-hydroxycholesterol requires mediator protein(s) with rapid turnover rate. *J Biol Chem* 256:6174-6180.
- Chen TC, Waimaleongoraek C. **1981**. Effect of pH on TBA values of ground raw poultry meat. *J Food Sci* 46:1946-1947.
- Chen BH, Chen YC. **1994**. Evaluation of the analysis of cholesterol oxides by liquid chromatography. *J Chromatogr A* 661:127-136.
- Chicoye E, Powrie WD, Fennema O. **1968**. Photooxidation of cholesterol in spray-dried egg yolk upon irradiation. *J Food Sci* 33:581-587.
- Chirico S. **1994**. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. *Methods in Enzymol*, 32:314-318.
- Christie WW. **2003**. Lipid extraction, storage and sample handling. En: *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. The Oily Press, Bridgewater; p: 91-104.
- Chung HY, Partridge J, Harte B. **2002**. Discrimination of light oxidized off-flavors in milk and cheddar cheese using solid-phase microextraction-gas

chromatography and the olfactory sensing technique. Proceedings of the 13th IAPRI Conference on Packaging. E. Lansing, MI (USA).

- Colles SM, Irwin KC, Chilsom GM. **1996**. Roles of multiple oxidized LDL lipids in cellular injury: dominance of 7 β -hydroxycholesterol. *J Lipid Res* 37:2018-2028.

- Conchillo A, Cercaci L, Ansorena D, Rodriguez-Estrada MT, Lercker G, Astiasarán I. **2005**. Levels of phytosterol oxides in enriched and nonenriched spreads: application of a thin-layer chromatography-gas chromatography methodology. *J Agric Food Chem* 53:7844-7850.

- Contarini G, Povo M, Leardi R, Toppino PM. **1997**. Influence of heat treatment on the volatile compounds of milk. *J Agric Food Chem* 45:3171-3177.

- Coxon DT, Price KR, Chan HWS. **1981**. Formation, isolation and structure determination of methyl linolenate diperoxides. *Chem Phys Lipids* 28:365-378.

- Coxon DT, Rigby NM, Chan HWS, Lund BM, George SM. **1987**. The occurrence of hydrogen-peroxide in edible oils: Chemical and microbiological consequences. *J Sci Food Agric* 40:367-379.

- Crastes de Paulet A, Astruc ME, Bascoul J. **1988**. Les oxystèrols: propriétés biologiques et problèmes nutritionnels. En *Biologie des lipides chez l'homme*. Dousty-Blazy L, Mendy F, eds. Editions Médicales Internationales, Paris; p. 154-174.

- Csallany AS, Kindom SE, Addis PB, Lee JH. **1989**. HPLC method for quantification of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. *Lipids* 24:645-651.

D

- Dahl TA, Miden WR, Hartman PE. **1988**. Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage. *Photochem Photobiol* 47:357-362.

- Dahle LK, Hill EG, Colman RT. **1962**. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidation of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys* 98:253-261.

-
- Daly GG, Finocchiaro ET, Richardson T. **1983**. Characterization of some oxidation products of β -sitosterol. *J Agric Food Chem* 31:46-50.
 - Daniel WW. **1990**. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3ª ed. Limusa S.A., México.
 - de Vries JHM, Cansen A, Kromhout D, van de Bovencamp P, van Staveren WA, Mensink RP, Katan MB. **1997**. The fatty acid and sterol content of food composites of middle-aged men in seven countries. *J Food Com Anal* 10:115-141.
 - Dean L. O, Boyd L.C. **2004**. Biological effects and safety aspects of phytosterol oxides. En *Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals*, Dutta, P. D., eds. Marcel Dekker Inc., NY; p: 419-430.
 - Decker EA. **1998**. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends Food Sci Technol* 9:241-248.
 - Decsi T, Koletzko B. **1994**. Polyunsaturated fatty acids in infant nutrition. *Acta Paediatr Suppl* 395:31-37.
 - Decsi T, Burus I, Molnar S, Minda H, Veitl V. **2001**. Inverse association between *trans* isomeric and long-chain polyunsaturated fatty acids in cord blood lipids of full-term infants. *Am J Clin Nutr* 74:364-368.
 - De la Torre MC, López E. **1997**. El papel de los antioxidantes: 1. En la tecnología de los alimentos. 2. En la biodegradación oxidativa del organismo. *Alimentaria* 283:19-27.
 - Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. **1997**. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. *Circulation* 95:1760-1763.
 - Dionisi F, Golay PA, Aeschlimann JM, Fay LB. **1998**. Determination of cholesterol oxidation products in milk powders: Methods comparison and validation. *J Agric Food Chem* 46:2227-2233.
 - Directiva 91/321/CE, de la Comisión, de 14 de mayo de **1991**, relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 175 de 4 de julio de 1991, 35-49.
 - Directiva 96/4/CE, Euratom de la Comisión, de 16 de febrero de **1996**, por la que se modifica la Directiva 91/321/CE relativa a los preparados para

lactantes y preparados de continuación. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 49 de 28 de febrero de 1996, 12-16.

- Directiva 96/5/CE, Euratom de la Comisión, de 16 de febrero de **1996**, relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 049 de 28 de febrero de 1996, 17-28.

- Directiva 98/36/CE, de la Comisión, de 2 de junio de **1998**, por la que se modifica la Directiva 96/5/CE relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 167 de 12 de junio de 1998, 23-24.

- Directiva 99/39/CE, de la Comisión, de 6 de mayo de **1999**, por la que se modifica la Directiva 96/5/CE relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 124 de 18 de mayo de 1999, 8-10.

- Directiva 1999/50/CE, de la Comisión, de 25 de mayo de **1999**, por la que se modifica la Directiva 91/321/CE relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 139 de 2 de junio de 1999, 29-31.

- Directiva 2003/13/CE, de la Comisión, de 10 de febrero de **2003**, por la que se modifica la Directiva 96/5/CE relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 41 de 14 de febrero de 2003, 33-36.

- Directiva 2003/14/CE, de la Comisión, de 10 de febrero de **2003**, por la que se modifica la Directiva 91/321/CE relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 41 de 14 de febrero de 2003, 37-40.

- Directiva 2006/125/CE, de la Comisión, de 5 de diciembre de **2006**, relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 339 de 6 de diciembre de 2006, 16-35.

- Directiva 2006/141/CE, de la Comisión, de 22 de diciembre de **2006**, relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 401 de 30 de diciembre de 2006, 1-33.

-
- Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. **1993**. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Rad Biol Med* 15:353-363.
 - Du Z, Bramlage WJ. **1992**. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J Agric Food Chem* 40:1566-1570.
 - Dutta PC. **1997**. Studies on phytosterol oxides II. Content in some vegetable oils and in french fries prepared in these oils. *J Am Oil Chem Soc* 74:659-666.
 - Dutta PC. **2002**. Determination of phytosterol oxidation products in foods and biological samples. En: *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence and biological effects*. Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP, eds. AOCS Press Champaign, IL; p: 335-374.
 - Dutta PC. **2004**. Chemistry, analysis, and occurrence of phytosterol oxidation products in foods. En: *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence and biological effects*. Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP, eds. AOCS Press Champaign, IL; p: 397-418.
 - Dutta PC, Przybylski R, Appelqvist L-Å, Eskin NAM. **1996**. Formation and analysis of oxidized sterols in frying fat. En: *Deep Frying. Chemistry, Nutrition and Practical Applications*. Perkins EG, Erickson MD, eds. AOCS Press, Champaign, IL; p: 112-150.
 - Dutta PC, Appelqvist L-Å. **1997**. Studies on phytosterol oxides I. Effect of storage on the content in potato chips prepared in different vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc* 74:647-657.
 - Dutta PC, Savage GP. **2002**. Formation and content of phytosterol oxidation products in foods. En: *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence and biological effects*. Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP, eds. AOCS Press Champaign, IL; p: 114-123.
 - Dwyer J. **1995**. Overview: dietary approaches for reducing cardiovascular disease risks. *J Nutr* 25:656S-665S.
 - Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusy U. **1995**. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal Biochem* 225:73-80.

E

- European Commission. **2003**. Scientific Committee on Food. Report of the scientific committee on food on the revision of essential requirements of infant formulae and follow-on formulae. 18 May.
- Elias SL, Innis SM. **2001**. Infant plasma *trans*, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. *Am J Clin Nutr* 73:807-814.
- Ellsworth JL, Starr JR. **1998**. Inhibition of acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase blocks esterification but not uptake of cholesterol in Caco-2 cells. *Metabolism* 47:325-332.
- El-Zeany BA, Fattah LEA. **1982**. Oxidised lipids-proteins browning reaction. Part 6. Browning produced by the interaction of free fatty acids with proteins. *Grasas y Aceites* 33:216-219.
- Eriksson CE. **1982**. Lipid oxidation catalysts and inhibitors in raw materials and processed foods. *Food Chem* 9:3-19.
- Eriksson CE. **1987**. Oxidation of lipids in food systems. En: *Autoxidation of unsaturated lipids*. Chan HWS, ed., Academic Press, NY; p: 207-231.
- Erickson MC. **2002**. Lipid oxidation of muscle foods. En: *Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Akoh CC, Min DB, eds. Marcel Dekker, NY; p: 365-411.
- Erridge C, Webb DJ, Spickett CM. **2007**. 25-Hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol upregulate interleukin-8 expression independently of Toll-like receptor 1, 2, 4 or 6 signalling in human macrophages. *Free Radic Res* 41:260-266.
- Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Peiraggi MT, Arnal JF, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. **1997**. Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurointricarboxylic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:331-339.
- Espinosa-Mansilla A, Salinas F, Rubio Leal A. **1993**. Determination of malonaldehyde in human plasma: elimination of spectral interferences in the 2-thiobarbituric acid reaction. *Analyst* 118:89-95.

- Esterbauer H, Cheeseman KH. **1990**. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth Enzymol* 186:407-421.
- Evangelisti F, Calcagno C, Zunin P, Nardi S. **1999**. Influenza delle tecnologie di produzione sulla formulazione di alimenti per la prima infanzia. *Ind Alim* 38:1401-1405.
- Evangelisti F, Zunin P, Boggia R, Calcagno C. **2004**. Cholesterol oxidation in meat-based baby foods. *J AOAC Int* 87:505-510.

F

- Fenaille F, Mottier P, Turesky RJ, Ali S, Guy PA. **2001**. Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *J Chromatogr A* 921:237-245.
- Fenaille F, Visani P, Fumeaux R, Milo C, Guy PA. **2003**. Comparison of mass spectrometry-based electronic nose and solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry technique to assess infant formula oxidation. *J Agric Food Chem*, 51:2790-2796.
- Fenaille F, Parisod V, Visani P, Populaire S, Tabet J-C, Guy PA. **2006**. Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study. *Int Dairy J* 16:728-739.
- Fennema, OR. editor. **1993**. "Química de los alimentos". 2ª edición. Acribia S.A..
- Fennema, OR., editor. **1996**. "Food chemistry". 3ª edición. Marcel Dekker, Inc., NY.
- Ferdinandusse S, Denis S, Mooijer PAW, Zhang Z, Reddy JK, Spector AA, Wanders RJA. **2001**. Identification of the peroxisomal β -oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic. *J Lipid Res* 42:1987-1995.
- Fernández J, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López JA. **1997**. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem* 59:345-353.
- Fieser LF, Fieser M. **1967**. Reagents for organic synthesis. John Wiley & Sons Inc., NY.

- Fillion L, Zee JA, Gosselin C. **1991**. Determination of a cholesterol oxide mixture by a single-run high-performance liquid-chromatographic analysis using benzylation. *J Chromatogr A*, 547:105-112.
- Fischer N, Widder S. **1997**. How proteins influence food flavor. *Food Technol*, 51:68-70.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. **1957**. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509.
- Food and Nutrition Board. **2005**. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. National Academy Press, Washington D.C.
- Fraga MJ, Fontecha J, Lozada L, Martínez-Castro I, Juárez M. **2000**. Composition of the sterol fraction of caprine milk fat by gas chromatography and mass spectrometry. *J Dairy Res* 67:437-441.
- Frankel EN. **1980**. Lipid oxidation. *Progr Lipid Res*, 19, 1-22.
- Frankel EN. **1982**. Volatile lipid oxidation products. *Progr Lipid Res*, 22:1-33.
- Frankel, EN. **1984**. Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance. *J Am Oil Chem Soc* 61:1908-1916.
- Frankel, EN. **1985**. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Progr Lipid Res* 23:197-221.
- Frankel EN. **1991**. Recent advances in lipid oxidation. *J Sci Food Agric* 54:495-511.
- Frankel EN. **1993a**. Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oils vs. oxidized vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc* 70:767-772.
- Frankel EN. **1993b**. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends Food Sci Technol* 4:220-225.
- Frankel EN. **1998**. Lipid Oxidation. The Oily Press Ltd, Dundee, pp: 1-303.
- Frankel EN, Evans CD, McConnell DG, Selke E, Dutton HJ. **1961**. Autoxidation of methyl linolenate. Isolation and characterization of hydroperoxides. *J Org Chem* 26:4663-4669.

- Frankel EN, Neff WE, Selke E. **1984**. Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry. IX. Homolytic vs. heterolytic cleavage of primary and secondary oxidation products. *Lipids* 19:790-800.
- Frankel EN, Selke E, Neff WE, Miyashita K. **1992**. Autoxidation of polyunsaturated triacylglycerols. IV. Volatile decomposition products from triacylglycerols containing linoleate and linolenate. *Lipids* 27:442-446.

G

- García-Cruset S, Carpenter KLH, Codony R, Guardiola F. **2002**. Cholesterol oxidation products and atherosclerosis. En: *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence and biological effects*. Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP, eds. AOCS Press Champaign, IL; p: 241-277.
- García-Llatas G, Lagarda MJ, Clemente G, Farré R. **2006**. Monitoring of headspace volatiles in milk-cereal-based liquid infant foods during storage. *Eur J Lipid Sci Technol* 108: 1028-1036.
- Gardner HW. **1979**. Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review. *J Agric Food Chem* 27:220-229.
- Gardner HW. **1989**. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Rad Biol Med* 43: 1784-1788.
- Giammarioli S, Bellomonte G, Denaro M, Milana MR. **1995**. Determination of hexanal in infant formulas by headspace-gas chromatography. *Ital J Food Sci* 1:69-76.
- Giammarioli S, Lammardo AM, Sanzini E, Bellomonte G. **1997**. Preliminary study on lipid oxidation in infant formulas during storage. *Riv Sci Aliment* 26:80-88.
- Gibson RA, Makrides M. **1999**. Polyunsaturated fatty acids and infant visual development: a critical appraisal of randomized clinical trials. *Lipids* 34:179-184.
- Gibson RA, Makrides M. **2000**. N-3 polyunsaturated fatty acid requirements of term infants. *Am J Clin Nutr* 71 (Suppl):251S-255S.
- Gimbrone MA. **1999**. Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherogenesis. *Am J Pathol* 155:1-5.

- Girao H, Mota MC, Ramalho J, Pereire O. **1998**. Cholesterol oxides accumulate in human cataracts. *Exp Eye Res* 66:645-652.
- Glatt H, Jung R, Oesch F. **1983**. Bacterial mutagenicity investigation of epoxides: drugs, drug metabolites, steroids and pesticides. *Mutat Res* 111:99-118.
- Goad LJ. **1991**. Phytosterols. En *Methods in plant biochemistry*, volume 7 , Terpenoids. Charlwood B.V, Banthorpe D.V, eds. Academic Press Ltd, San Diego, CA; p. 369-434.
- Goldstein JL, Brown MS. **1977**. The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 46:897-930.
- Goldstein JL, Kita T, Brown MS. **1983**. Defective lipoprotein receptor and atherosclerosis. *N Engl J Med* 309:288-296.
- Gordon MH. **2001**. The development of oxidative rancidity. En *Antioxidants in Food – Practical applications*. Pokorny J, Yanishlieva, Gordon M, eds. CRC Press, Washington; p. 7-22.
- Grandgirard A. **2002**. Biological effects of phytosterol oxidation products, future research areas and concluding remarks. En: *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence and biological effects*. Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP, eds. AOCS Press Champaign, IL; p. 375-382.
- Grandgirard A, Sergiel JP, Nour M, Demaison-Meloche J, Ginies C. **1999**. Lymphatic absorption of phytosterol oxides in rats. *Lipids* 34:563-570.
- Grandgirard A, Martine L, Joffre C, Juaneda P, Berdeaux O. **2004a**. Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxysterol derivatives. Application to a phytosterol-enriched food. *J Chromatogr A* 1040:239-250.
- Grandgirard A, Martine L, Demaison L, Cordelet C, Joffre C, Berdeaux O, Semon E. **2004b**. Oxyphytosterols are present in plasma of healthy human subjects. *Brit J Nutr* 91:101-106.
- Grandgirard A, Demaison-Meloche J, Cordelet C, Demaison L. **2004c**. Incorporation of oxyphytosterols in tissues of hamster. *Reprod Nutr Dev* 44:599-608.

-
- Grandgirard A, Cabaret S, Martine L, Berdeaux O. **2004d**. New internal standard for quantitative determination of oxyphytosterols by gas chromatography. *J AOAC Int* 87:481-484.
 - Griffiths WJ, Liu S, Alvelius G, Sjoval J. **2003**. Derivatisation for the characterisation of neutral oxosteroids by electrospray and matrix-assisted laser desorption. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:924-935.
 - Griffiths WJ, Wang YQ, Alvelius G, Liu S, Bodin K, Sjoval J. **2006**. Analysis of oxysterols by electrospray tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 17:341-362.
 - Gruenke LD, Wrensch MR, Petrakis NL, Miike R, Ernster VL, Craig JC. **1987**. Breast fluid cholesterol and cholesterol epoxides: Relationship to breast cancer risk factors and other characteristics. *Cancer Res* 47:5483-5487.
 - Grundy SM, Denke MA. **1990**. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* 31:1149-1172.
 - Guardiola F, Codony R, Manich A, Rafecas M, Boatella J. **1995a**. Stability of polyunsaturated fatty acids in egg powder processed and stored under various conditions. *J Agric Food Chem* 43:2254-2259.
 - Guardiola F, Codony R, Rafecas M, Boatella J. **1995b**. Comparison of three methods for the determination of oxysterols in spray-dried egg. *J Chromatogr A*, 705:289-304.
 - Guardiola F, Codony R, Addis PB, Rafecas M, Boatella J. **1996**. Biological effects of oxysterols: Current status. *Food Chem Toxicol* 34:193-211.
 - Guardiola F, Jordán A, Grau A, García S, Boatella J, Rafecas M, Codony R. **1998**. Recent methodological advances in oxysterol determination. *Recent Res Dev Oil Chem* 2:77-88.
 - Guardiola F, Boatella J, Codony R. **2002**. Determination of cholesterol oxidation products by gas chromatography. En: *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence and biological effects*. Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP, eds. AOCS Press Champaign, IL; p: 50-65.
 - Guardiola F, Bou R, Boatella J, Codony R. **2004**. Analysis of sterol oxidation products in foods. *J AOAC Int* 87:441-466.
 - Guillén-Sans R, Guzmán-Chozas M. **1998**. The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38:315-330.

- Gütenperges B, Escher FE. **1994**. Oxidative changes of heat-sterilized meat in trays. *J Food Sci* 56:689-692.
- Gutteridge JM, Halliwell B. **1990**. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochem Sci* 15:129-135.
- Guyton JR, Black BL, Seidel CL. **1990**. Focal toxicity of oxysterols in vascular smooth muscle cell culture. *Am J Pathol* 137:425-434.

H

- Hageman JJ, Bast A, Vermeulen NPE. **1992**. Monitoring of oxidative free radical damage *in vivo*: analytical aspects. *Chem Biol Interac* 82:243-293.
- Halliwell B. **1996**. Diet and antioxidant/oxidant systems. Feeding from toddlers to adolescence. Ángel Ballabriga, editor. Nestlé Nutrition Workshop Series, vol. 37, Nestec Ltd., Vevey/Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Hama Y, Maeda H, Nakamura T. **1990**. Determination of conjugated carbonyls with a prostaglandin-like ring structure in autoxidized lipids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56:147-152.
- Hamberg M, Niehaus WG, Samuelss B. **1968**. Preparation, isolation and characterization of a derivative of malonaldehyde. *Anal Biochem* 22:145-153.
- Hamilton RJ, Kalu C, Prisa E, Padley FB, Pierce H. **1997**. Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chem* 60:193-199.
- Hamosh M. **1995**. Lipid metabolism in pediatric nutrition. *Pediatr Clin North Am* 12:839-859.
- Hara A, Radin NS. **1978**. Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent. *Anal Biochem* 90:420-426.
- Hardwick SJ, Hegyi L, Clare K, Law NS, Carpenter KLH, Mitchinson MJ, Skepper JM. **1996**. Apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein. *J Pathol* 179:294-302.
- Hartmann MA. **1998**. Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plants Sci* 3:170-175.
- Helland IB, Smith L, Saarem K. **2003**. Maternal supplementation with very long-chain fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics* 111:e39-e44.

-
- Hennig B, Boissonneault GA. **1987**. Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol decreases barrier function of cultured endothelial cell monolayers. *Atherosclerosis* 68:255-261.
 - Hernández M, Sastre A. **1999**. Tratado de nutrición. Díaz de Santos, 1ª ed., Madrid.
 - Hidalgo FJ, Zamora R. **1993**. Fluorescent pyrrole products from carbonyl-amine reactions. *J Biol Chem* 268:16190-16197.
 - Hidalgo FJ, Zamora R. **2000**. The role of lipids in nonenzymatic browning. *Grasas y Aceites* 51:35-49.
 - Hidalgo FJ, Zamora R, Alaiz M. **1992**. Modificaciones producidas en las proteínas alimentarias por su interacción con lípidos peroxidados. II. Mecanismos conocidos de la interacción lípido (oxidado)-proteína. *Grasas y Aceites* 43:31-38.
 - Hidalgo FJ, Alaiz M, Zamora R. **2001**. Pyrrolization and antioxidant function of proteins following oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 14:582-588.
 - Highley NA, Taylor SL, Herian AM, Lee K. **1986**. Cholesterol in processed meats. *Meat Sci* 16:17-188.
 - Hirayama T, Kamata K, Kasai T, Watanabe T. **1994**. Determination of saturated aliphatic-aldehydes in edible oil by acetylacetone method high-performance liquid-chromatography. *Jap J Toxic Envir Health* 40:574-581.
 - Hiroko T, Yayoi K, Tomoko H, Ikuyo I, Hiroyoshi S, Masao S, Ikuo I, Katsumi I. **2004**. Phytosterol oxidation products are absorbed in the intestinal lymphatics in rats but do not accelerate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 134:1690-1696.
 - Holland DC. **1971**. Determination of malonaldehyde as an index of rancidity in nut meals. *J Assoc Offic Anal Chem* 54:1024-1026.
 - Holman RT, Johson SB, Hatch TF. **1982**. Linolenic acid deficiency in man. *Nutr Rev* 40:144-147.
 - Homan R, Krause BR. **1997**. Established and emerging strategies for inhibition of cholesterol absorption. *Curr Pharm Design* 3:29-44.
 - Hoyland DV, Taylor AJ. **1989**. A modified distillation method for the detection of fat oxidation in foods. *Int J Food Si Technol* 24:153-161.

- Hu B, Peng SK, Brubaker D, Morin RJ. **1990**. Influence of cholesterol oxides and antioxidants on prostacyclin production by cultured endothelial cells. *FASEB* 4:A910.
- Hu FB. **2001**. The balance between omega-6 and omega-3 fatty acids and the risk of coronary heart disease. *Nutrition* 17:741-742.
- Hubbard RW, Ono Y, Sanchez A. **1989**. Atherogenic effect of oxidized products of cholesterol. *Progr Food Nutr Sci* 13:17-44.
- Hughes H, Mathews B, Lenz ML, Guyton JR. **1994**. Cytotoxicity of oxidized LDL to porcine aortic smooth muscle cells is associated with the oxysterols 7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol. *Arterioscler Thromb* 14:1177-1185.
- Hur SJ, Park GB, Joo ST. **2007**. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. *Food Control* 18:939-947.

I

- Innis SM. **2000**. Essential fatty acids in infant nutrition: lessons and limitations from animal studies in relation to studies on infant fatty acid requirements. *Am J Clin Nutr* 71 (Suppl):238S-244S.
- Innis SM. **2003**. Perineal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr* 143:S1-S8.
- ISO-IDF. **2001**. I.S. milk and milk-products-extraction methods for lipids and liposoluble compounds. ISO 14156; International Dairy Federation: Brussels, Belgium, p. 172.
- Iwami K, Hattori M, Yasumi T, Ibuki F. **1988**. Stability of gliadin-encapsulated unsaturated fatty acids against autoxidation. *J Agric Food Chem* 36:160-164.

J

- Jacob RA. **1995**. The integrated antioxidant system. *Nutr Res* 15:755-766.
- Jägerstad M, Skog K. **2005**. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mut Res* 574:156-172.
- Janero DR, Burghardt B. **1989**. Thiobarbituric acid-reactive malondialdehyde formation during superoxide-dependent, iron-catalyzed lipid-peroxidation: Influence of peroxidation conditions. *Lipids* 24:125-131.

-
- Jensen RG. **1995**. Introduction. En *Handbook of milk composition*. Jensen R.G, ed., Academic Press, San Diego, CA; p. 1-3.
 - Jeon JJ, Thomas EL, Reineccius GA. **1978**. Production of volatile flavor compounds in ultrahigh-temperature processed milk during aseptic storage. *J Agric Food Chem* 26:1183-1188.
 - Jialal I, Devaraj S. **1996**. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 42:498-506.
 - Jiang XT, Ory DS, Han XL. **2007**. Characterization of oxysterols by electrospray ionization tandem mass spectrometry after one-step derivatization with dimethylglycine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21:141-152.
 - Jiménez-Escrig A, Santos-Hidalgo AB, Saura-Calixto F. **2006**. Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. *J Agric Food Chem* 54:3462-3471.
 - Johnson CB. **1996**. Isolation of cholesterol oxidation products from animal fat using aminopropyl solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 736:205-210.
 - Johnson IT. **2001N**. Antioxidants and antitumor properties. En *Antioxidants in Foods*. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M, eds. Woodhead Publ. Ltd, Cambridge; p. 100-123.
 - Johnson RB, Barnett HJ. **2003**. Determination of fat content in fish feed by supercritical fluid extraction and subsequent lipid classification of extract by thin layer chromatography-flame ionization detection. *Aquaculture* 216:263-282.
 - Johnsson RB, Dutta PC. **2003**. Characterization of side-chain oxidation products of sitosterol and campesterol by chromatographic and spectroscopic methods. *J Am Oil Chem Soc* 80:767-776.
 - Johnsson L, Andersson RE, Dutta PC. **2003**. Side-chain autoxidation of stigmasterol and analysis of a mixture of phytosterol oxidation products by chromatographic and spectroscopic methods. *J Am Oil Chem Soc* 80:777-783.
 - Johnsson L, Dutta PC. **2005**. Separation of phytosterol oxidation products by combination of different polarity gas chromatography capillary columns. *J Chromatogr A* 1064:213-217.

- Johnsson L, Dutta PC. **2006**. Determination of phytosterol oxides in some food products by using an optimized transesterification method. *Food Chem* 97:606-613.
- Judge MP, Harel O, Lammi-Keefe CJ. **2007**. Maternal consumption of a docosahexaenoic acid-containing functional food during pregnancy: benefit for infant performance on problem-solving but not on recognition memory tasks at age 9 mo. *Am J Clin Nutr* 85:1572-1577.

K

- Kadis B. **1978**. Steroid epoxides in biological systems: a review. *J Steroid Biochemist* 9:75-81.
- Kakis G, Kuksis A, Myher JJ. **1977**. Injected 7-oxocholesterol and plant sterol derivatives and hepatic cholesterologenesis. *Adv Exp Med Biol* 82:297-299.
- Kalua CM, Bedgood DR, Prenzler PD. **2006**. Development of a headspace solid phase microextraction-gas chromatography method for monitoring volatile compounds in extended time-course experiments of olive oil. *Anal Chim Acta* 556:407-414.
- Kaluzny MA, Duncan LA, Merrit MV, Epps DE. **1985**. Rapid separation of lipid classes in high-yield and purity using bonded phase columns. *J Lipid Res* 26:135-140.
- Kanazawa A, Sawa T, Akaik T, Maeda H. **2000**. Formation of abasic sites in DNA by t-butyl peroxy radicals: implication for potent genotoxicity of lipid peroxy radicals. *Cancer Letters* 156:51-55.
- Kappus H. **1991**. Lipid peroxidation: Mechanisms and biological relevance. En: *Free radicals and food additives*. Aruoma O.I, Halliwell B, eds. Taylor and Francis, NY; p. 59-75.
- Kelsey MI, Pienta RJ. **1979**. Transformation of hamster embryo cells by cholesterol α -epoxide and lithocholic acid. *Cancer Lett* 6:143-149.
- Kemmo S, Soupas L, Lampi A-M, Piironen V. **2005**. Formation and decomposition of stigmaterol hydroperoxydes and secondary oxidation products during thermo-oxidation. *Eur J Lipid Sci Technol* 107:805-814.

- Kleinman RE, Stoker TW. **1995**. Fórmulas adaptadas: la perspectiva americana. En: *Borroso E, López M, Pajarón M, Morán J, eds. Nuevas perspectivas en nutrición infantil*. Ergón, Madrid; p. 109-118.
- Knight HB, Swern DE, Eddy CR. **1951**. Reactions of fatty materials with oxygen. VIII. Cis-trans isomerization during autoxidation of methyl oleate. *J Am Oil Chem Soc* 28:188-192.
- Koletzko, B. **1982**. Trans fatty acids may impair biosynthesis of long-chain polyunsaturates and growth in man. *Acta Paediatr* 81:302-306.
- Koletzko B, Agostoni C, Carlson SE, Clandini T, Hornstra G, Neuringer M, Uauy R, Yamashiro Y, Willatts P. **2001**. Long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) and perinatal development. *Acta Paediatr* 90:460-464.
- Koletzko B, Baker S, Cleghorn G, Neto UF, Gopalan S, Hernell O, Hock QS, Jirapinyo P, Lonnerdal B, Pencharz P, Pzyrembel H, Ramirez-Mayans J, Shamir R, Turck D, Yamashiro Y, Zong-Yi D. **2005**. Global standard for the composition of infant formula: Recommendations of an ESPHGAN coordinated international expert group. *J Pediatr Gastr Nutr* 41:584-599.
- Kolsch H, Lutjohann D, Tulke A, Bjorkhem I, Rao ML. **1999**. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res* 818:171-175.
- Korytowski W, Bachowski GJ, Girotti AW. **1991**. Chromatographic separation and electrochemical determination of cholesterol hydroperoxides generated by photodynamic action. *Anal Biochem* 197:149-156.
- Kubow S. **1990**. Toxicity of dietary lipid peroxidation products. *Trends Food Sci Technol* 1:67-71.
- Kulig MJ, Smith LL. **1973**. Sterol metabolism. XXV. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. *J Org Chem* 38:3639-3642.
- Kunz C, Lonnerdal B. **1992**. Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. *Acta Paediatr* 81:107-112.

L

- Labuza TP. **1971**. Kinetics of lipid oxidation in foods. *Crit Rev Food Technol* 2:355-405.

- Ladikos D, Lougovois V. **1990**. Lipid oxidation in muscle foods: a review. *Food Chem* 35:295-314.
- Lakshminarayana G, Cornwell DG. **1986**. Localization of fatty-acid double-bonds by gas-chromatography of intermediate aldehydes as 1,3-dioxane. *Lipids* 21:175-177.
- Lambelet P, Grandgirard A, Gregoire S, Juaneda P, Sebedio J-L, Bertoli C. **2003**. Formation of modified fatty acids and oxyphytosterols during refining of low erucic acid rapeseed oil. *J Agric Food Chem* 51:4284-4290.
- Lampi AM, Juntunen L, Toivo J, Piironen, V. **2002**. Determination of thermo-oxidation products of plant sterols. *J Chromatogr B* 777:83-92.
- Lauritzen L, Hansen HS, Jurgensen MH, Michaelsen KF. **2001**. The essentiality of long-chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 40:1-94.
- Lea LJ, Hepburn PA, Wolfreys AM, Baldrick P. **2004**. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 8. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity with phytosterol oxides. *Food Chemical Toxicol* 42:771-783.
- Lee K, Herian AM, Higley NA. **1985**. Sterol oxidation products in French fries and in stored potato chips. *J Food Protec* 48:158-161.
- Lee H, Csallany AS. **1987**. Measurement of free and bound malondialdehyde in vitamin-E-deficient and vitamin-E-supplemented rat-liver tissues. *Lipids* 22:104-107.
- Leonarduzzi G, Sevanian A, Sottero B, Arkan MC, Biasi F, Chiarpotto E, Basaga H, Poli G. **2001**. Up-regulation of the fibrogenic cytokine TGF- β 1 by oxysterols: a mechanism link between cholesterol and atherosclerosis. *FASEB J* 15:1619-1621.
- Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. **2002**. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J Nutr Biochem* 13:700-710.
- Leonarduzzi G, Poli G, Sottero B, Biasi F. **2007**. Activation of the mitochondrial pathway of apoptosis by oxysterols. *Front Biosci* 12:791-799.
- Lepage G, Roy CC. **1986**. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27:114-20.
- Lercker G, Rodriguez-Estrada MT. **2000**. Cholesterol oxidation: presence of 7-ketocholesterol in different food products. *J Food Comp Anal* 13:625-631.

-
- Lercker G, Rodriguez-Estrada MT. **2002**. Cholesterol oxidation mechanisms. En: *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence and biological effects*. Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP, eds. AOCS Press Champaign, IL; p: 1-25.
 - Lewis, MJ. **2003**. Improvements in the pasteurization and sterilization of milk. En Smit G, ed. *Dairy Processing: Improving Quality*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
 - Li L, Batt SM, Wannemuehler M, Dispirito A, Beitz DC. **1998**. Effect of feeding of a cholesterol-reducing bacterium, *Eubacterium coprostanoligenes*, to germ-free mice. *Lab Anim Sci* 48:253-255.
 - Ling WH, Jones PJH. **1995**. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci* 57:195-206.
 - Liu S, Sjovall J, Griffiths WJ. **2000**. Analysis of oxosteroids by nano-electrospray mass spectrometry of their oximes. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14:390-400.
 - Liu T, Yang T, Wu C. **2001**. Changes of volatiles in soy sauce-stewed pork during cold storage and reheating. *J Sci Food Agric* 81:1547-1552.
 - Lölliger J. **1990**. Headspace gas analysis of volatile hydrocarbons as a tool for the determination of the state of oxidation of foods stored in sealed containers. *J Sci Food Agric* 52:119-128.
 - Lorenzo JL, Allorio M, Bernini F, Corsini A, Fumagalli R. **1987**. Regulation of low density lipoprotein metabolism by 26-hydroxycholesterol in human fibroblasts. *FEBS Lett* 218:77-80.
 - Louter AJH. **2004**. Determination of plant sterol oxidation products in plant sterol enriched spreads, fat, blends, and plant sterol concentrates. *J AOAC Int* 87:485-492.
 - Love JD. **1983**. The role of heme iron in the oxidation of lipids in red meats. *Food Technol* 37:117-129.
 - Luc G, Fruchart JC. **1991**. Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 53:206S-209S.
 - Lutjohann D, Papassotiropoulos A, Bjorkhem I, Locatekki S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U, Jessen F, Rao ML, von Bergmann K, Heun R. **2000**. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in patients with neurological diseases. *Neurosci Lett* 293:87-90.

M

- Maerker G. **1987**. Cholesterol autoxidation - current status. *J Am Oil Chem Soc* 64:388-392.
- Maerker G, Unruh J. **1986**. Cholesterol oxides I. Isolation and determination of some cholesterol oxidation products. *J Am Oil Chem Soc* 63:767-771.
- Maguire L, Konoplyannikov M, Ford A, Maguire AR, O'Brien NM. **2003**. Comparison of the cytotoxic effects of β -sitosterol oxides and a cholesterol oxide, 7 β -hydroxycholesterol, in cultured mammalian cells. *Br J Nutr* 90:767-775.
- Mahmoodi H, Hadley M, Chang YX, Draper HH. **1995**. Increased formation and degradation of malondialdehyde-modified proteins under conditions of peroxidative stress. *Lipids* 30:963-966.
- Makrides M, Simmer K, Neuman M, Gibson RA. **1995**. Changes in the polyunsaturated fatty acids of breast milk from mothers of full-term infants over 30 wk of lactation. *Am J Clin Nutr* 61:1231-1233.
- Makrides M, Neuman M, Simmer K, Gibson RA. **2000**. A critical appraisal of the role of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids on neural indices of term infants: a randomized, controlled trial. *Pediatrics* 105:32-38.
- Manglano P. **1999**. Estudio de la fracción lipídica de fórmulas para lactantes: Composición e indicadores de oxidación. Tesis de licenciatura. Universitat de València.
- Manglano P, Lagarda MJ, Silvestre MD, Vidal C, Clemente G, Farré R. **2005**. Stability of the lipid fraction of milk-based infant formulas during storage. *Eur J Lipid Sci Technol* 107:815-823.
- Manini P, Andreoli R, Careri M, Elviri L, Musci M. **1998**. Atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry in cholesterol oxide determination and characterization. *Rapid Commun Mass Spectrom* 12:883-889.
- Mariaca R, Bosset JO. **1997**. Instrumental analysis of volatile (flavour) compounds in milk and dairy products. *Lait* 77:13-40.
- Marnett LJ. **1999**. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mut Res* 424:83-95.

-
- Marnett LJ. **2000**. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21:361-370.
 - Márquez-Ruiz G, Dobarganes C. **2005**. Analysis of nonvolatile oxidation compounds by high-performance size-exclusion chromatography. En: *Analysis of Lipid Oxidation*. Kamal-Eldin A, Pokorny J, eds. AOCS Press, Champaign, IL; p. 40-69.
 - Martínez-Sales V, Fornas E, Camañas A. **1985**. Prostacyclin production and lipid peroxidation in the aorta of rats fed with cholesterol oxidation products. *Artery* 12:213-219.
 - Marsili RT. **1999**. Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *J Chrom Sci* 37:17-23.
 - Matsui H, Okumura K, Mukawa H, Hibino M, Toki Y, Ito T. **1997**. Increased oxysterol content in diabetic rat hearts: their involvement in diabetic cardiomyopathy. *Can J Cardiol* 13:373-379.
 - McCarthy FO, Chopra J, Ford A, Hogan SA, Kerry JP, O'Brien NM, Ryan E, Maguire AR. **2005**. Synthesis, isolation and characterisation of β -sitosterol and β -sitosterol oxide derivatives. *Org Biomol Chem* 3:3059-3065.
 - Mensink RP, Katan MB. **1992**. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb* 12:911-919.
 - Meyer W, Jungnickel H, Jandke M, Dettner K, Spiteller G. **1998**. On the cytotoxicity of oxidized phytosterols isolated from photoautotrophic cell cultures of *Chenopodium rubrum* tested on meal-worms *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry* 47:789-797.
 - Meynier A, Andre A, Lherminier J, Grandgirard A, Demaison L. **2005**. Dietary oxysterols induce *in vivo* toxicity of coronary endothelial and smooth muscle cells. *Eur J Nutr* 44:393-405.
 - Michalsky ST, Hammond EG. **1972**. Use of labeled compounds to study mechanism of flavor formation in oxidizing fats. *J Am Oil Chem* 49:563-566.
 - Moghadasian MH. **2000**. Pharmacological properties of plant sterols *in vivo* and *in vitro* observations. *Life Sci* 67:605-615.
 - Moio L, Dekimpe J, Etievant PX, Addeo F. **1993**. The neutral volatile compounds of water buffalo milk. *Ital J Food Sci* 1:43-56.

- Moog C, Hergueux J, Italiano L, Luu B, Bischoff P. **1986**. Inhibition of lymphocyte activation by 7,25-dihydroxy-cholesterol: a preliminary report. *IRCS Med Sci* 14:1207-1208.
- Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. **2002**. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* 41:457-600.
- Morin RJ, Hu B, Peng SK, Sevanian A. **1992**. Cholesterol oxidation and cancer. En: *Biological effects of cholesterol oxides*. Peng SK, Morin RJ, eds. CRC Press, Boca Raton, FL; p. 191-202.
- Moss GP. **1989**. The nomenclature of steroids: recommendations by the IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature. *Eur J Biochem* 186:429-458.

N

- Namiki M. **1990**. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 29:273-300.
- Naseem SM, Heald FP. **1987**. Cytotoxicity of cholesterol oxides and their effects on cholesterol metabolism in cultured human smooth muscle cells. *Biochem Int* 14:71-84.
- Nawar WW. **1996**. Lipids. En: *Food Chemistry*, 3rd ed. Fennema OR, ed. Marcel Dekker Inc., NY; p: 225-320.
- Nourooz-Zadeh J. **1990**. Determination of the autoxidation products from free or total cholesterol: a new multistep enrichment methodology including the enzymatic release of esterified cholesterol. *J Agric Food Chem* 38:1667-1673.
- Nourooz-Zadeh J, Appelqvist L-A. **1992**. Isolation and quantitative determination of sterol oxides in plant-based foods: soybean oil and wheat flour. *J Am Oil Chem Soc* 69:288-293.

O

- Oehrl L, Hansen AP, Rohrer CA, Fenner LB. **2001**. Oxidation of phytosterol in a test food system. *J Am Oil Chem Soc* 78:1073-1078.

- Oehrl Dean L, Boyd LC. **2004**. Biological effects and safety aspects of phytosterol oxides. En: *Phytosterol as Functional Food Components and Nutraceuticals*, Dutta, P. C, ed. Marcel Dekker Inc., NY; p: 419-430.
- OMS. **1981**. Código internacional de comercialización de sucedáneos de la leche materna. WHO, Ginebra.
- Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. **1989**. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 10:281-285.
- Osada K, Kodama T, Yamda K, Sugano M. **1993**. Oxidation of cholesterol by heating. *J Agric Food Chem* 41:1198-1202.
- Osada K, Ravandi A, Kuksis A. **1999**. Rapid analysis of oxidized cholesterol derivatives by high-performance liquid chromatography combined with diode-array ultraviolet and evaporative laser light-scattering detection. *J Am Oil Chem Soc* 66:863-871.
- Osada K. **2002**. Cholesterol oxidation products: other biological effects. En: *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence and biological effects*. Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP, eds. AOCS Press, Champaign, IL; p: 278-318.
- Ostlund RE Jr. **2002**. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 22:533-549.
- Ostlund RE Jr, McGill JB, Zeng C-M, Covey DF, Stearns J, Stenson WF, Spilburg CA. **2002**. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Δ^5 -phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E911-E916.
- Owen CG, Whincup PH, Odoki K, Gilg J, Cook DG. **2002**. Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics* 110:597-608.

P

- Park SW, Addis PB. **1985**. HPLC determination of C7-oxidized cholesterol derivatives in foods. *J Food Sci* 50:1437-1444.
- Park SW, Addis PB. **1986**. Identification and quantitative estimation of oxidized cholesterol derivatives in heated tallow. *J Agric Food Chem* 34:653-659.

- Park SW, Addis PB. **1987**. Cholesterol oxidation products in some muscle foods. *J Food Sci* 52:1500-1503.
- Park SW, Addis, PB. **1992**. Methods of analysis of cholesterol oxides. En: *Biological Effects of Cholesterol Oxides*, Peng S-K, Morin RJ, eds. CRC Press, London; p: 33-71.
- Park PSW, Goins RE. **1992**. Determination of volatile lipid oxidation products by dynamic headspace-capillary gas chromatographic analysis with application to milk-based nutritional products. *J Agric Food Chem* 40:1581-1585.
- Park PW, Guardiola F, Park SH, Addis PB. **1996**. Kinetic evaluation of 3 β -hydroxycholest-5-en-7-one (7-ketocholesterol) stability during saponification. *J Am Oil Chem Soc* 73:623-629.
- Parliment T. **2002**. Solvent extraction and distillation techniques. En: *Marsili R, editor, Flavor, fragrance and odor analysis*. New York: Marcel Dekker, p. 1-23.
- Parsons PG, Goss P. **1978**. Chromosome damage and DNA repair induced in human fibroblasts by UV and cholesterol oxides. *Aust J Exp Biol Med* 56:287-296.
- Pearson AM, Gray JI, Wolzak AM, Horenstein NA. **1983**. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. *Food Technol* 37:121-129.
- Peng SK, Taylor CB, Tham P, Mikkelson B. **1977**. Effect of oxidation derivatives of cholesterol on cultured aortic smooth muscle cells. *Am J Pathol* 86:53-54.
- Peng SK, Wu AY, Colacicco LA, Mikkelson B, Taylor CB. **1983**. Inhibition of prostaglandin synthesis by cholesterol oxidation products in cultured aortic smooth muscle cells. *Fed Proc* 42:809.
- Peng SK, Hu B, Peng AY, Morin RJ. **1993**. Effect of cholesterol oxides on prostacyclin production and platelet adhesion. *Artery* 20:122-134.
- Peng L, Kawagoe Y, Hogan P, Delmer D. **2002**. Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science* 295:147-150.
- Peterson AR, Peterson H, Spears CP, Trosko JE, Sevanian A. **1988**. Mutagenic characterization of cholesterol epoxides in Chinese hamster V79 cells. *Mutat Res* 203:355-366.

-
- Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM. **2000**. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* 80:939-966.
 - Pikul J, Leszczynski DE, Kummerow FA. **1983**. Elimination of sample autoxidation by butylated hydroxytoluene additions before thiobarbituric acid assay for malonaldehyde in fat from chicken meat. *J Agric Food Chem* 31:1338-1342.
 - Pikul J, Leszczynski DE, Niewiarowicz A, Kummerow FA. **1984**. Lipid oxidation in chicken breast and leg meat after sequential treatments of frozen storage, cooking, refrigerated storage and reheating. *J Food Technol* 19:575-584.
 - Pikul J, Leszczynski DE, Kummerow FA. **1989**. Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *J Agric Food Chem* 37:1309-1313.
 - Plat J, Brzezinka H, Lutjohann D, Mensink RP, von Bergmann K. **2001**. Oxidized plant sterols in human serum and lipid infusions as measured by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J Lipid Res* 42:2030-2038.
 - Pokorný J. **1977**. Interactions of oxidized lipids with protein. *Riv Ital Sost Grasse* IV:389-393.
 - Pokorný J. **1981**. Browning from lipid-protein interactions. *Prog Food Nutr* 5:421-428.
 - Pokorný J, Luân NT, Kondratenko SS, Janíček G. **1976**. Changes of sensory value by interaction of alkanals with amino acids and proteins. *Nahrung* 20:267-272.
 - Pokorný J, Svobodová H, Janíček G. **1977**. Reaction of lower alkanals with proteins. Correlation of flavour changes and nonenzymic browning during storage of model systems. *Sb Vys Sk Chem Tech* E49:5-21.
 - Pokorný J, Novotná-Morávková E, Alexcová H, Davídek J. **1983**. Oxidation of polyunsaturated lipids in presence of nonlipidic components. En: *Proceedings of the 16th ISF Congress, Budapest, Hungary 4-7 October*. Hollo J, ed. Elsevier, NY.

- Pokorný J, Kmínek M, Janitz W, Novotná E, Davídek J. **1985**. Reactions of oxidized lipids with protein. Part 13. Autoxidation of hexanal in presence of nonlipidic components. *Nahrung* 29:459-465.
- Pokorný J, Janitz W, Víden I, Velíšek J, Valentová H, Matejírek J, Dlasková Z. **1987**. Reactions of oxidized lipids with protein. Part 14. Aldolization reactions of lower alkanals in presence of nonlipidic substances. *Nahrung* 31:63-70.
- Porter NA. **1990**. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: Initiation, propagation, and product distribution (basic chemistry). En: *Membrane Lipid Oxidation*. Carmen VP, ed. CRC Press, Boca Raton, FL; p. 33-62.
- Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. **1995**. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30:277-290.
- Pryor WA, Stanley JP, Blair E. **1976**. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids. II. A suggested mechanism for the formation of thiobarbituric acid-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* 11:370-379.
- Przygonski K, Jelen H, Wasowicz E. **2000**. Determination of cholesterol oxidation products in milk powder and infant formulas by gas chromatography and mass spectrometry. *Nahrung* 44:122-125.

R

- Radovic BS, Careri M, Mangia A, Musci M, Gerboles M, Anklam E. **2001**. Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chem* 72:511-520.
- Raith K, Brenner C, Farwanah H, Müller G, Eder K, Neubert RHH. **2005**. A new LC/APCI-MS method for the determination of cholesterol oxidation products in food. *J Chromatogr A* 1067:207-211.
- Ramasamy S, Boissonneault GA, Hennig B. **1992**. Oxysterol-induced endothelial cell dysfunction in culture. *J Am Coll Nutr* 11:532-538.
- Rao S, Artz W. **1989**. Effect of extrusion on lipid oxidation. *J Food Sci* 54:1580-1583.
- Razzazi-Fazeli E, Kleineisen S, Luf W. **2000**. Determination of cholesterol oxides in processed food using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J Chromatogr A* 896:321-334.

-
- Read SM, Bacic T. **2002**. Plant biology. Prime time for cellulose. *Science* 295:59-60.
 - Real Decreto 72/1998, de 23 de enero de **1998**, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los preparados para lactantes y preparados de continuación. B.O.E. núm. 30 de 4 de febrero de 1998, 3772-3780.
 - Real Decreto 490/1998, de 27 de marzo de **1998**, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. B.O.E. núm. 83 de 7 de abril de 1998, 11638-11643.
 - Real Decreto 1445/2000, de 31 de julio de **2000**, por el que se modifica el Real Decreto 490/1998, de 27 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. B.O.E. núm. 183 de 1 de agosto de 2000, 27562-27563.
 - Real Decreto 1446/2000, de 31 de julio de **2000**, por el que se modifica el Real Decreto 72/1998, de 23 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los preparados para lactantes y preparados de continuación. B.O.E. núm. 183 de 1 de agosto de 2000, 27563-27564.
 - Real Decreto 480/2004, de 26 de marzo de **2004**, por el que se modifica el Real Decreto 490/1998, de 27 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. B.O.E. núm. 80 de 2 de abril de 2004, 14049-14050.
 - Real Decreto 500/2004, de 1 de abril de **2004**, por el que se modifica el Real Decreto 72/1998, de 23 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los preparados para lactantes y preparados de continuación. B.O.E. núm. 80 de 2 de abril de 2004, 14050-14051.
 - Refsgaard HHF, Tsai L, Stadtman ER. **2000**. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:611-616.

- Reglamento (CE) N° 796/2002 de la Comisión, de 6 de mayo de **2002**, por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis, así como las notas complementarias que figuran en el anexo del Reglamento (CEE) n° 2658/87 del Consejo relativo a la nomenclatura arancelaria y estadística y al arancel aduanero común. Anexo X B. Diario Oficial de la Unión Europea n° L128 de 15 de mayo de 2002, 8-28.
- Reiser RB, O'Brien C, Henderson GR, Morroe RW. **1979**. Studies on a possible function for cholesterol in milk. *Nutr Rep Intl* 19:835-849.
- Robards K, Kerr AF, Patsalides E, Korth J. **1988**. Headspace gas analysis as a measure of rancidity in corn chips. *J Am Oil Chem Soc* 65:1621-1626.
- Roberts DD, Pollien P, Milo C. Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. *J Agric Food Chem* 46:2430-2437.
- Rodriguez-Estrada MT, Caboni MF. **2002**. Determination of cholesterol oxidation products by high-performance liquid chromatography. En: *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence and biological effects*. Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP, eds. AOCS Press, Champaign, IL; p. 66-100.
- Romeu-Nadal M, Castellote AI, López-Sabater MC. **2004**. Headspace gas chromatographic method for determining volatile compounds in infant formulas. *J Chromatogr A* 1046:235-239.
- Romeu-Nadal M, Chávez-Servín JL, Castellote AI, Rivero M, López-Sabater MC. **2007**. Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas. *Food Chem* 100:756-763.
- Ronayne de Ferrer PA. **1998**. Fórmulas infantiles: aporte lipídico y perfil de ácidos grasos. *Rev Soc Arg Nutr* 9:49-52.
- Roozen JP, Linssen JPH. **1992**. Factors affecting lipid autoxidation of a spray-dried milk base for baby food. *ACS Symposium Series* 500:302-309.
- Rose-Sallin C, Huggett AC, Bosset JO, Tabacchi R, Fay LB. **1995**. Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [²H₇]cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts. *J Agric Food Chem* 43:935-941.

- Ross R. **1999**. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126.
- Ryan E, Chopra J, McCarthy F, Maguire AR, O'Brien NM. **2005**. Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *Br J Nutr* 94:443-451.

S

- Saldanha T, Frankland Sawaya ACH, Nogueira Eberlin M, Bragagnolo N. **2006**. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. *J Agric Food Chem* 54:4107-4113.
- Salem N, Litman B, Kim HY, Gawrisch K. **2001**. Mechanism of the action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36:945-959.
- Salonen JT, Nyyssönen K, Salonen R, Porkkala-Sarataho E, Tuomainen TP, Diczfalusy U, Bjorkhem I. **1997**. Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. *Circulation* 95:840-845.
- Sampaio GR, Bastos DHM, Soares RAM, Queiroz YS, Torres EAFS. **2006**. Fatty acids and cholesterol oxidation in salted and dried shrimp. *Food Chem* 95:344-351.
- Sanches-Silva A, Rodríguez-Bernaldo de Quirós A, López-Hernández J, Paseiro-Losada P. **2004**. Determination of hexanal as indicator of the lipidic oxidation state in potato crisps using gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1046:75-81.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA. **1998**. Principales métodos para la determinación de la oxidación lipídica. *Food Sci Tech Int* 4:391-399.
- Sander BD, Addis PB, Park SW, Smith DE. **1989**. Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. *J Food Prot* 52:109-114.
- Satué-Gracia MT, Frankel EN, Rangavajhyala N, German JB. **2000**. Lactoferrin in infant formulas: effect on oxidation. *J Agric Food Chem* 48:4984-4990.

- Säynäjoki S, Sundberg S, Soupas L, Lampi A-M, Piironen V. **2003**. Determination of stigmaterol primary oxidation products by high-performance liquid chromatography. *Food Chem* 80:415-421.
- Schmarr H.-G, Gross HB, Shibamoto T. **1996**. Analysis of polar cholesterol oxidation products: evaluation of a new method involving transesterification, solid phase extraction and gas chromatography. *J Agric Food Chem* 44:512-517.
- Schmedes A, Holmer G. **1989**. A new thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation. *J Am Oil Chem Soc* 66:813-817.
- Schmidt H. **1959**. Thiobarbituric acid number as a measure of the oxidation of edible fats. *Fette Seifen Anstrichm* 61:127.
- Schothorst RC, Jekel AA. **1999**. Oral sterol intake in The Netherlands: evaluation of the results obtained by GC analysis of duplicate 24-h diet samples collected in 1994. *Food Chem* 64:561-566.
- Schroeffer GJ. **2000**. Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other process. *Physiol Rev* 80:361-554.
- Scopesi F, Zunin P, Mazzella M, Testa M, Boggia R, Evangelisti F, Serra G. **2002**. 7-Ketocholesterol in human and adapted milk formulas. *Clin Nutr* 21:379-384.
- Sellemayer A, Koletzko B. **1999**. Long-chain polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in infants - physiological and pathophysiological aspects and open questions. *Lipids* 34:199-205.
- Seppanen CM, Csallany AS. **2001**. Simultaneous determination of lipophilic aldehydes by high-performance liquid chromatography in vegetable oil. *J Am Oil Chem Soc* 78:1253-1260.
- Sevanian, A. Personal communication. En: *The International Symposium "Biological Free Radical Oxidations and Antioxidants"*, Ursini F, Cadenas E, eds. CLUEB University Publisher: Udine (Italia), 1 to 4 July 1991, Padova (Italia).
- Sevanian A, Peterson AR. **1984**. Cholesterol epoxide is a direct acting mutagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4198-4202.
- Sevanian A, Peterson AR. **1986**. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem Toxicol* 24:1103-1110.

-
- Sevanian A, Hodis HN, Hwang J, McLeod LL, Peterson H. **1995**. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. *J Lipid Res* 36:1971-1986.
 - Shamberger R, Andreone T, Willis C. **1974**. Antioxidants and cancer. IV. Initiating activity of malonaldehyde as a carcinogen. *J Natl Cancer Inst* 107:1404-1409.
 - Shantha NC, Decker EA. **1993**. Conjugated linoleic acid concentrations in processed cheese containing hydrogen donors, iron and dairy-based additives. *Food Chem*, 47: 257-261.
 - Sinensky M, Duwe G, Pinkerton F. **1979**. Defective regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaril coenzyme A reductase in a somatic cell mutant. *J Biol Chem* 254:4482-4486.
 - Sinnhuber RO, Yu IC, Yu TC. **1958**. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Food Res* 23:624-634.
 - Smith LL. **1981**. Cholesterol Autoxidation. Plenum Press, NY; p: 1-673.
 - Smith LL. **1987**. Cholesterol Autoxidation 1981-1986. *Chem Phys Lipids* 44:87-125.
 - Smith LL. **1990a**. Mechanisms of formation of oxysterols: a general survey. En: *Free Radicals, lipoproteins, and membrane lipids*. Crastes de Paulet A, Douste-Blazy L, Paoletti R, eds. Plenum Press, NY; p: 115-132,.
 - Smith LL. **1990b**. Cholesterol oxidation. En: *Membrane lipid oxidation*. Vigo-Pelfrey C, ed. CRC Press, Boca Raton, FL; p: 129-154.
 - Smith LL. **1992**. The Oxidation of Cholesterol. En: *Biological Effects of Cholesterol Oxides*. Peng S-K, Morin RJ, eds. CRC Press, London; p: 7-31.
 - Smith LL. **1996**. Review of Progress in Sterol Oxidation: 1987-1995. *Lipids* 31:453-487.
 - Smith LL, Johnson BH. **1989**. Biological activities of oxysterols. *Free Rad Biol Med* 7:285-332.
 - Sporer A, Brill DR, Schaffner CP. **1982**. Epoxycholesterols in secretions and tissue of normal, benign and cancerous human prostate glands. *Urology* 20:244-250.

- Sprecher H, Luthria DL, Mohamed BS, Baykousheva SP. **1995**. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 36:2471-2477.
- Stapelfeldt H, Skibsted LH. **1994**. Modifications of β -lactoglobulin by aliphatic aldehydes in aqueous solution. *J Dairy Res* 61:209-219.
- Steffen A, Pawliszyn J. **1996**. Analysis of flavor volatiles using HS solid-phase microextraction. *J Agric Food Chem* 44:2187-2193.
- Steffen, Y, Wiswedel I, Peter D, Schewe T, Sies H. **2006**. Cytotoxicity of myeloperoxidase/nitrite-oxidized low-density lipoprotein toward endothelial cells is due to a high 7β -hydroxycholesterol to 7-ketocholesterol ratio. *Free Rad Biol Med* 41:1139-1150.
- Sugano M, Ikeda I. **1996**. Metabolic interactions between essential and trans-fatty acids. *Curr Opin Lipidol* 7:38-42.
- Sunesen LO, Dorigoni V, Zanardi E, Staahnke L. **2001**. Volatile compounds released during ripening in Italian dried sausage. *Meat Sci* 58:93-97.
- Sweeley CC, Bentley R, Makita M, Wells WW. **1963**. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J Am Oil Chem Soc* 85:2497-2507.

T

- Tarladgis BG, Watts BM, Younathan MT, Dugan L Jr. **1960**. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J Am Oil Chem Soc* 37:44-48.
- Tarladgis BG, Pearson AM, Dugan LR. **1964**. Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. II. Formation of the TBA-malonaldehyde complex without acid-heat treatment. *J Sci Food Agric* 15:602-607.
- Tatum VL, Changchit C, Chow CK. **1990**. Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Lipids* 25:226-229.
- Taylor CB, Peng SK. **1985**. Cytotoxicity and atherogenicity of oxidized cholesterol. *J Am Oil Chem Soc* 62:633-638.

- Theunissen JJH, Jackson RL, Kempen HJM, Demel RA. **1986**. Membrane properties of oxysterols. Interfacial orientation, influence on membrane permeability and redistribution between membrane. *Biochem Biophys Acta* 860:66-74.
- Thomsen MK, Lauridsen L, Skibsted LH, Risbo J. **2005**. Temperature effect on lactose crystallization, Maillard reactions, and lipid oxidation in whole milk powder. *J Agric Food Chem* 53:7082-7090.
- Tomita M, Okuyama T, Hatta Y, Hawaii S. **1990**. Determination of free malonaldehyde by gas-chromatography with an electron-capture detector. *J Chromatogr B* 526:174-179.
- Tomoyori H, Kawata Y, Higuchi T, Ichi I, Sato H, Sato M, Ikeda I, Imaizumi K. **2004**. Phytosterol oxidation products are absorbed in the intestinal lymphatics in rats but do not accelerate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 134:1690-1696.
- Trombly R, Tappel A. **1975**. Fractionation and analysis of fluorescent products of lipid peroxidation. *Lipids* 10:441-447.
- Tsai LS, Ijichi K, Hudson CA, Meehan JJ. **1980**. A method for the quantitative estimation of cholesterol α -oxide in eggs. *Lipids* 15:124-128.
- Turchetto E, Lercker G, Bortolomeazzi R. **1993**. Oxysterol determination in selected coffees. *Toxicol Ind Health* 9:519-527.
- Turoli D, Testolin G, Zanini R, Bellù R. **2004**. Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paed* 93:1569-1574.

U

- Uauy R, Birch D, Peirano P. **1992**. Visual and brain function measurements in studies of n-3 fatty acid requirements of infants. *J Pediatr* 120:S168-180.
- Uauy R, Hoffman DR. **2000**. Essential fat requirements of preterm infants. *Am J Clin Nutr* 71 (Suppl):245S-250S.
- Uauy R, Castillo C. **2003**. Lipid requirements of infants: implications for nutrient composition of fortified complementary foods. *J Nutr* 133:2962S-2972S.

- Ubhayasekera SJKA, Verleyen T, Dutta PC. **2004**. Evaluation of GC and GC-MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. *Food Chem* 84:149-157.
- Ulberth F, Rossler D. **1998**. Comparison of solid-phase extraction methods for the cleanup of cholesterol oxidation products. *J Agric Food Chem* 46:2634-2637.
- Ulberth F, Roubicek D. **1995**. Monitoring of oxidative deterioration of milk powder by headspace gas chromatography. *Int Dairy J* 5:523-531.
- Ulberth F, Buchgraber M. **2002**. Extraction and purification of cholesterol oxidation products. En: *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence and biological effects*. Guardiola F, Dutta PC, Codony R, Savage GP, eds. AOCS Press, Champaign, IL; p: 26-49.
- Ulu H. **2004**. Evaluation of three 2-thiobarbituric acid methods for the measurement of lipid oxidation in various meats and meat products. *Meat Sci* 67:683-687.

V

- Valenzuela A. **1991**. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci* 48:301-309.
- Valsta LM, Lemström A, Ovaskainen M-L, Lampi A-M, Toivo J, Korhonen T, Piironen V. **2004**. Estimation of plant sterol and cholesterol intake in Finland: quality of new values and their effect on intake. *Br J Nutr* 92:671-678.
- van Aardt M, Duncan SE, Marcy JE, Long TE, O'Keefe SF, Nielsen-Sims SR. **2005**. Aroma analysis of light-exposed milk stored with and without natural and synthetic antioxidants. *J Dairy Sci* 88:881-890.
- van Ruth SM, Floris V, Fayoux S. **2006**. Characterisation of the volatile profiles of infant formulas by proton transfer reaction-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem* 98:343-350.
- Vidaud Z, Barnés E, González E. **1999**. Medida de la fluorescencia como indicador de la peroxidación lipídica en alimentos. *Alimentaria* 307: 27-30.

- Virgili F, Scaccini C, Packer L, Rimbach G. **2001**. Cardiovascular disease and nutritional phenolics. En: *Antioxidants in Foods*. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M, eds. Woodhead Publ. Ltd, Cambridge; p: 87-99.
- Vuoristo M, Miettinen TA. **1994**. Absorption, metabolism, and serum concentrations of cholesterol in vegetarians: effects of cholesterol feeding. *Am J Clin Nutr* 59:1325-1331.

W

- Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G. **1993**. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reagent substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem* 208:10-15.
- Wamper T. **2002**. Analysis of food volatiles using headspace-gas chromatographic techniques. *Flavor, fragrance and odor analysis*. Marsili R, ed. Marcel Dekker, NY; p: 25-54.
- Wang J, Fujimoto K, Miyazawa T, Endo Y. **1991a**. Antioxidative mechanism of maize zein in powder model systems against methyl linoleate. *J Agric Food Chem* 39:351-355.
- Wang J, Miyazawa T, Fujimoto K. **1991b**. Inhibition of methyl linoleate peroxidation by maize zein in powder model system at high water activity. *Agric Biol Chem* 55:1531-1536.
- Wang XH, Gheldof N, Engeseth NJ. **2004**. Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *J Food Sci* 69:C96-C101.
- Washall JW, Wampler T. **1990**. Sources of error in purge and trap analysis of volatile organic compounds. *Am Lab* 22:38-43.
- Wasowicz E. **2003**. Cholesterol and phytosterols. En: *Chemical and functional properties of food lipids*. Sikorski ZE, Koakowska A, eds. CRC Press, Boca Ratón, FL; p: 93-107.
- Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. **1994**. TGF- β 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* 93:2106-2113.

- Weksler BB, Marcus AJ, Jaffe EA. **1977**. Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3922-3926.
- Wen J, Morrisey PA, Walton J, Sheehy PJA. **1997**. Rapid and quantitative determination of hexanal in cooked muscle foods. *Irish J Agric Food Res* 36:75-84.
- Willatts P, Forsyth JS, DiModugno M, Varma S, Colvin M. **1998**. Effect of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant formula on problem solving at 10 months of age. *Lancet* 352:688-691.
- Witztum JL, Steinberg D. **1991**. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88:1785-1792.
- Wrensch MR, Petrakis NL, Gruenke LD, Miike R, Ernster VL, King EB, Hauck WW, Craig JC, Goodson WH. **1989**. Breast fluid cholesterol and cholesterol b-epoxide concentrations in women with benign breast disease. *Cancer Res* 49:2168-2174.
- Wu TC, Sheldon BW. **1988**. Flavor components and factors associated with the development of off-flavors in cooked turkey rolls. *J Food Sci* 3:49-54.
- Wyllie AH. **1981**. En: *Cell death in biology and pathology*. Bowen ID, Lockshin RA, eds. Chapman & Hall, NY; p: 9-34.

Y

- Yagi K. **1976**. A simple fluorimetric assay for pipoperoxide in blood plasma. *Biochem Res* 125:212-216.
- Yanishlieva N, Schiller H, Marinova E. **1980**. Autoxidation of sitosterol II: Main products formed at ambient and high temperature treatment with oxygen. *Riv Ital Sost Grasse* LVII:572-576.
- Yanishlieva N, Marinova E, Schiller H, Seher A. **1983**. Comparison of sitosterol autoxidation in free form, as fatty acid ester and in triacylglycerol solution. Kinetics of the process and structure of the products formed. 16th ISF Congress, Budapest, pp: 619-626.
- Yanishlieva N, Tasheva EM. **1986**. Effect of the unsaturation of lipid media on the autoxidation sitosterol. *Grasas y Aceites* 37:343-347.

- Younathan MT, Watts BM. **1960**. Oxidation of tissue lipids in cooked pork. *Food Res* 25:538-543.

Z

- Zamora R, Alaiz M, Hidalgo FJ. **1997**. Feed-back inhibition of oxidative stress by oxidized lipid/amino acid reaction products. *Biochem* 36:15765-15771.
- Zamora R, Hidalgo FJ. **2001**. Inhibition of proteolysis in oxidized lipid-damaged proteins. *J Agric Food Chem* 49:6006-6011.
- Zamora R, Hidalgo FJ. **2005**. Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to nonenzymatic food browning. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:49-59.
- Zhang Z, Pawliszyn J. **1993**. Headspace solid-phase microextraction. *Anal Chem* 65:1843-1852.
- Zhang H, Lee T. **1997**. Gas-chromatographic-mass spectrometry analysis of volatile flavor compounds in mackerel for assessment of fish quality. En: *Flavor and lipid chemistry of seafoods*. Shahidi F, Cadawllader KR, eds. ACS Symposium Series 674. American Chemical Society, Washington DC; p: 55-63.
- Zhang X, Julien-David D, Miesch M, Geoffroy P, Raul F, Roussi S, Aoudé-Werner D, Marchioni E. **2005a**. Identification and quantitative analysis of β -sitosterol oxides in vegetable oils by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Steroids* 70:896-906.
- Zhang X, Geoffroy P, Miesch M, Julien-David D, Raul F, Aoudé-Werner D, Marchioni E. **2005b**. Gram-scale chromatographic purification of β -sitosterol. Synthesis and characterization of β -sitosterol oxides. *Steroids* 70:886-895.
- Zhang X, Julien-David D, Miesch M, Raul F, Geoffroy P, Aoude-Werner D, Ennahar S, Marchioni E. **2006**. Quantitative analysis of β -sitosterol oxides induced in vegetable oils by natural sunlight, artificially generated light, and irradiation. *J Agric Food Chem* 54:5410-5415.
- Zieden B, Kaminskas A, Kristenson M, Kucinskiene Z, Vessby B, Olsson AG, Diczfalusy U. **1999**. Increased plasma 7β -hydroxycholesterol concentrations

in a population with a high risk for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:967-971.

- Zipser MW, Watts BM. **1962**. A modified 2-thiobarbituric method for the determination of malonaldehyde in cured meats. *Food Technol* 16:102-107.

- Zubillaga MP, Maerker G. **1988**. Transesterification of cholesteryl esters. *J Am Oil Chem Soc* 65:780-782.

- Zubillaga MP, Maerker G. **1991**. Quantification of three cholesterol oxidation products in raw meat and chicken. *J Food Sci* 56:1194-1196.

- Zunin P, Evangelisti F, Calcagno C, Tiscornia E. **1990**. Determinazione del grado di ossidazione del colesterolo in alimenti per l'infanzia. *Riv Ital Sost Grasse* 19:13-18.

- Zunin P, Calcagno C, Evangelisti F. **1998**. Sterol oxidation in infant milk formulas and milk cereals. *J Dairy Res* 65:591-598.

- Zunin P, Salvadeo P, Boggia R, Evangelisti F. **2006**. Sterol oxidation in meat- and fish-based homogenized baby foods containing vegetable oils. *J AOAC Int* 89:441- 446.

ANEXOS

ANNEXES

ANEXO I – ABREVIATURAS - ABBREVIATIONS

γ	Gamma
α Ep	α -Epoxicolesterol
β Ep	β -Epoxicolesterol
ϵ PL	N- ϵ -(2-propenal)lisina
19-OH	19-Hidroxicolesterol
25-OH	25-Hidroxicolesterol
5 α -col	5 α -Colestano
7 α	7 α -Hidroxicolesterol
7 β	7 β -Hidroxicolesterol
7K	7-Cetocolesterol
7k-preg	7-Cetopregnenolona
7k-sit	7-Cetositosterol
AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Acetato de etilo
AG	Ácidos grasos
AGE	Ácidos grasos esenciales
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGPI-CL	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
AGS	Ácidos grasos saturados
Amu	Unidades de masa atómica (<i>Atomic mass units</i>)
ANOVA	Análisis de la varianza
APCI	Ionización química a presión atmosférica (<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>)
ASE	Extracción acelerada con disolventes (<i>Accelerated solvent extraction</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
a _w	Actividad del agua (<i>Water activity</i>)
BHT	Butilhidroxitolueno

BSA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)-acetamida
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
C15	Tripentadecanoína
C23	Ácido tricosanoico
C13-EMAG	Éster metílico del ácido tridecanoico
C.V	Coefficiente de variación (%)
CAR	Carboxen
CCF	Cromatografía en capa fina
CE	Comunidad Europea
CF	Cloroformo
CG	Cromatógrafo de gases/cromatografía gaseosa
CG-EM	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
CG-FID	Cromatografía de gases-detector de ionización de llama
CG-O	Cromatografía de gases-olfatometría
CID	Disociación inducida por colisión (<i>Collision-induced dissociation</i>)
CL	Cromatografía líquida
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CML	N ^ε -(Carboximetil)lisina
COP	Productos de oxidación del colesterol (<i>Cholesterol oxidation products</i>)
DCM	Diclorometano
DE	Dietiléter
D.E.	Desviación estándar
DAD	Detector de matriz de diodos (<i>Diode-array detector</i>)
DHA	Ácido docosahexaenoico (<i>Docosahexaenoic acid</i>)
DVB	Divinilbenceno
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de la luz (<i>Evaporative light-scattering detector</i>)
EM	Espectrometría de masas
EMAG	Ésteres metílicos de los ácidos grasos
EM-Nariz electrónica	Nariz electrónica acoplada a espectrometría de masas

EPA	Ácido eicosapentaenoico (<i>Eicosapentaenoic acid</i>)
ESI	Ionización mediante electrospray (<i>Electrospray ionization</i>)
ESPGHAN	Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (<i>European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition</i>)
FID	Detector de ionización de llama (<i>Flame ionization detector</i>)
FL	Fórmulas para lactantes
GC-FID	<i>Gas chromatography-flame ionization detector</i>
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>
H	Hexano
HDL-colesterol	Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
HMDS	Hexametildisilazano
HMF	Hidroximetilfurfural (<i>Hydroxymethylfurfural</i>)
HMG-CoA reductasa	3-hidroximetilglutaril CoA reductasa
Hp	Heptano
HPSEC	Cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (<i>High-performance size-exclusion chromatography</i>)
IF	<i>Infant formulas</i>
Isop	Isopropanol
IP	Índice de peróxidos
KCl	Cloruro de potasio
K ₂ CO ₃	Carbonato potásico
KOH	Hidróxido de potasio
LAL	Lisinoalanina
LC-NH ₂	Aminopropilo
LC-PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (<i>Long-chain polyunsaturated fatty acids</i>)
L.D.	Límite de detección
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDL-colesterol	Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad
LDL-COP	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas que contienen productos de oxidación del colesterol

LDLr	Receptores de LDL
M	Metanol
MALDI	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MDA	Malondialdehído (<i>Malondialdehyde</i>)
MR	<i>Maillard reaction</i>
n	Número de alícuotas
Na ₂ SO ₄	Sulfato sódico anhidro
NH ₂	Aminopropilo
ODS	Octadecilsílice
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/divinilbenceno
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
PI	Patrón interno
PLE	Extracción con líquidos presurizados (<i>Pressurized liquid extraction</i>)
POP	Productos de oxidación de los fitosteroles (<i>Phytosterol oxidation products</i>)
PTFE	Politetrafluoroetileno
PTR-MS	Reacción de transferencia de protones-espectrometría de masas (<i>Proton transfer reaction-mass spectrometry</i>)
RD	Real Decreto
RDA	Ingestas dietéticas recomendadas (<i>Recommended dietary allowances</i>)
RM	Reacción de Maillard
RRF	Factores de respuesta relativos (<i>Relative response factors</i>)
RRT	Tiempos de retención relativos (<i>Relative retention times</i>)
RTS	Reglamentación técnico-sanitaria
SDE	Destilación y extracción simultánea (<i>Simultaneous distillation and extraction</i>)
SFE	Extracción con fluidos supercríticos (<i>Supercritic fluid extraction</i>)

SIM	Monitorización selectiva de iones (<i>Selected ion monitoring</i>)
S_{n-1}	Desviación estándar
SOP	Productos de oxidación de los esteroides (<i>Sterol oxidation products</i>)
SPE	Extracción en fase sólida (<i>Solid-phase extraction</i>)
SPME	Microextracción en fase sólida (<i>Solid-phase microextraction</i>)
TA	Temperatura ambiente
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico (<i>2-Thiobarbituric acid</i>)
TBARS	Sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (<i>2-Thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TBME	<i>Tert</i> -butilmetil éter
TCA	Ácido tricloroacético (<i>Trichloroacetic acid</i>)
TEP	1,1,3,3- Tetraetoxipropano (<i>1,1,3,3- Tetraetoxopropane</i>)
t	Tiempo
t_{eq}	Tiempo de equilibrado
t_{ex}	Tiempo de extracción
T	Temperatura
TG	Triglicéridos
TMCS	Trimetilclorosilano
TMSE	Éteres de trimetilsilil o trimetilsililéteres
TMSI	<i>N</i> -trimetilsililimidazol
triol	Colestanotriol
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
X	Media aritmética

ANEXO II – INSTRUMENTACIÓN - APPARATUS

- Agitador automático de tubos, Whirlimixer[®], Fisons.
- Balanza (± 0.01 g), Kern 572.
- Balanza de precisión (± 0.0001 g), HA-180M, AND.
- Baño de agua, Digiterm 200, Selecta.
- Centrífuga refrigerada, GT 422, Jouan.
- Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama, Autosystem XL con procesador de datos Totalchrom, Perkin-Elmer[®].
- Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama, Carlo Erba HRGC Fractovap 4160 con procesador de datos Turbochrom, Perkin-Elmer[®].
- Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama, Carlo Erba HRGC 5300 Mega Series con procesador de datos Turbochrom, Perkin-Elmer[®].
- Cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973N, con procesador de datos Chemstation.
- Espectrofluorímetro, RF-5000, Shimadzu.
- Espectrofotómetro, Lambda 2, Perkin Elmer.
- Manta calefactora, para matraces de 1000 ml, Selecta.
- pH-metro GLP 22, Crison.
- Pipetas automáticas de volumen regulable (10 a 100 μ l y 100 a 1000 μ l) Eppendorf[®].
- Pipetas automáticas de volumen regulable (10 a 100 μ l y 100 a 1000 μ l) Eppendorf[®].
- Rotavapor R200, Buchi.
- Ultra-Turrax, T25 Basic, IKA.

ANEXO III- MATERIAL - MATERIALS

- Bola Kjeldahl con alargadera.
- Cápsulas de sellado de aluminio de 20 mm de diámetro, Supelco®.
- Cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) Supelclean® LC-Si 500 mg/3 mL, Supelco®.
- Columna capilar CP-Sil 8CB de 50 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de la fase estacionaria de 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano, Varian®.
- Columna capilar Equity 5 de 30 m de longitud, 0.53 mm de diámetro interno y 5.0 µm de espesor de la fase estacionaria de poli-(5% difenil-95% dimetilsiloxano), Supelco®.
- Columna capilar HP-5MSi de 30m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de la fase estacionaria de 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano, Agilent®.
- Columna capilar RTX 2330 de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.20 µm de espesor de la fase estacionaria de 90% biscianopropil-10%fenilcianopropil-polisiloxano, Restek®.
- Columna capilar SP-2560 de 100 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.2 µm de espesor de la fase estacionaria de biscianopropilo polisiloxano, Supelco®.
- Columna capilar ZB-5 ms de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y 1 µm de espesor de la fase estacionaria de 5% polisilarileno-95% polidimetilsiloxano, Phenomenex®.
- Encapsulador ajustable para viales de 20 mm, Supelco®.
- Fibra de microextracción en fase sólida (SPME) Carboxen®/PDMS (polidimetilsiloxano) Stable-flex® 85 µm, Supelco®.
- Filtros de papel plegados, Ø = 12.5 cm, Albet.
- Filtros de separación de fases, Whatman®, 1 PS. Ø = 110 mm.
- Frascos SVL de vidrio Pyrex de 500 ml de capacidad, con tapón roscado y septum de goma recubierto de PTFE.
- Jeringas de 10 µl con adaptador repetitivo, SGE.
- Jeringas de 10 µl y 25 µl, Hamilton.

- Material de plástico y vidrio de uso común en el laboratorio (matraces aforados, embudos de decantación, matraces de fondo redondo, Erlenmeyers,...)
- Matraz de vidrio topacio de fondo redondo de 1000 ml.
- Obturador de PTFE/silicona de 20 mm de diámetro y 0.3175 cm de grosor, Supelco.
- Placa agitadora-calentadora, IKA, Mod. 2581000, con sonda de temperatura, IKA, Mod. 2666600, IKA.
- Placas de cromatografía en capa fina de Silicagel 60, 20 cm x 20 cm x 0.25 espesor fase estacionaria, Merck.
- Soporte manual para fibra de microextracción en fase sólida (SPME), Supelco®.
- Tubos SVL de vidrio Pyrex® de 10, 15 y 30 ml de capacidad, con tapón roscado y septum de goma recubierto de PTFE.
- Viales de vidrio topacio de 1.5 ml de capacidad, con tapón roscado de baquelita, septum de caucho rojo y junta de PTFE.
- Viales de vidrio topacio de 10 ml de volumen, 20 cm de diámetro de boca y 4.5 cm de altura, Guinama.

ANEXO IV – REACTIVOS - REAGENTS

- 5 β ,6 β - Epoxicolesterol, Sigma, riqueza: 80%.
- 5 α ,6 α -Epoxicolesterol, Sigma, riqueza: 87%.
- β -Sitosterol, Research Plus, riqueza: 60% en β -sitosterol, 30% en campesterol y 5% en estigmasterol.
- 1,1,3,3-Tetraetoxipropano (TEP), d: 0.92 g/ml, Sigma, riqueza: 97%.
- 19- Hidroxicolesterol, Sigma-Aldrich, riqueza: 99%.
- 4-Metil-2-pentanona (metilisobutilcetona), d: 0.801 g/ml, Fluka, riqueza: 99.7%.
- 5 α -Colestano, Sigma-Aldrich, riqueza: 97%.
- 7 β -Hidroxicolesterol, Sigma, riqueza: 90%.
- 7 α -Hidroxicolesterol, Steraloids, riqueza: 99%.
- 7-Cetocolesterol, Sigma, riqueza: 99%.
- 7-Cetoestigmasterol, Steraloids, riqueza: 99%.
- Aceite de silicona (dimetilpolisiloxano 350), Guinama.
- Acetona AnalaR[®], BDH, 99.5%.
- Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), Sigma, riqueza: 98%.
- Ácido acético (glacial) 100% anhidro p.a., Merck.
- Ácido alfa-linolénico, Sigma, riqueza: 99%.
- Ácido aráquico, Supelco, riqueza: 99%.
- Ácido araquidónico (AA), Supelco, riqueza: 99%.
- Ácido behénico, Sigma, riqueza: 99%.
- Ácido cáprico, Sigma, riqueza: 99%.
- Ácido caprílico, Sigma, riqueza: 99%.
- Ácido caproico, Sigma, riqueza: 99%.
- Ácido clorhídrico (HCl) fumante 37%, d: 1.19 g/ml, Merck.
- Ácido docosahexaenoico (DHA), Sigma, riqueza: 99%.
- Ácido eicosapentaenoico (EPA), Supelco, riqueza: 99%.
- Ácido esteárico, Sigma, riqueza: 99%.
- Ácido gama-linolénico, Sigma, riqueza: 99%.
- Ácido láurico, Sigma, riqueza: 99%.
- Ácido linoleico, Sigma, riqueza: 99%.
- Ácido mirístico, Sigma, riqueza: 99%.

- Ácido oleico, Fluka, riqueza: 97%.
- Ácido palmítico, Sigma, riqueza: 99%.
- Ácido palmitoleico, Sigma, riqueza: 99%.
- Ácido tricloroacético (TCA) p.a., Fluka, riqueza: 99.5%.
- Ácido tricosanoico (C23:0), Sigma, riqueza: 99%.
- Agua bidestilada, Carlo Erba.
- Agua desionizada, Millipore.
- Brassicasterol, Steraloids, riqueza: 99%.
- Butilhidroxitolueno (BHT), Sigma, riqueza: 99%.
- Carbonato potásico (K₂CO₃), Merck, riqueza: 99%.
- Cloroformo p.a., Merck.
- Cloruro de acetilo p.a., d = 1.10 g/ml, Merck, riqueza: 99%.
- Cloruro potásico (KCl) p.a., Merck, riqueza: 99%.
- Cloruro sódico (NaCl) p.a., Merck, riqueza: 99%.
- Colestanotriol, Sigma, riqueza: 99%. SOP
- Colesterol, Sigma, riqueza: 99%.
- Dietiléter, Merck, riqueza: 99.5%.
- Éster metílico de ácido tridecanoico, Sigma, riqueza: 98%.
- Estigmasterol, Sigma, riqueza: 93% en estigmasterol, 5.5% en β-sitosterol y 0.7% en campesterol.
- Etanol absoluto, Normapur.
- Etanol p.a. 95-96% (v/v), Prolabo.
- Éter etílico no estabilizado, d = 0.713 g/ml, Carlo Erba, riqueza: 99.8%
- Heptanal, d: 0.817 g/ml, Sigma, riqueza: 95%.
- Hexametildisilazano (HMDS) p.a., Carlo Erba, riqueza: 97.5%.
- Hexanal, d: 0.834 g/ml, Sigma, riqueza: 98%.
- Hexano p.a., Merck.
- Hexano-ISO, d = 0.66 g/ml, Panreac, riqueza: 96%.
- Hidróxido potásico (KOH), Merck, riqueza: 99%.
- Isopropanol.
- Isopropanol-ISO, d = 0.78 g/mL, Scharlau, riqueza: 99.9 %.
- Metanol p.a., d: 0.79 g/ml, Merck, riqueza: 99.8%.
- Metanol, Merck, Lichrosolv HPLC.

- Mezcla de patrones de ésteres metílicos de ácidos grasos (GLC 463). Contiene los ésteres metílicos de los ácidos: butírico (C4:0) (1.0%, p/p), pentanoico (C5:0) (1.0%), caproico (C6:0) (1.0%), heptanoico (C7:0) (1.0%), caprílico (C8:0) (2.0%), nonanoico (C9:0) (1.0%), cáprico (C10:0) (2.0%), undecanoico (C11:0) (1.0%), undecenoico (C11:1) (1.0%), láurico (C12:0) (4.0%), dodecenoico (C12:1) (2.0%), tridecanoico (C13:0) (1.0%), tridecenoico (C13:1) (1.0%), mirístico (C14:0) (4.0%), miristoleico (C14:1) (2.0%), pentadecanoico (C15:0) (1.0%), pentadecenoico (C15:1) (1.0%), palmítico (C16:0) (4.0%), palmitoleico (C16:1) (4.0%), palmitelaídico (C16:1*t*) (1.0%), heptadecanoico (C17:0) (2.0%), 10-heptadecenoico (C17:1) (2.0%), esteárico (C18:0) (4.0%), oleico (C18:1, Δ 9) (4.0%), elaídico (C18:1*t*) (1.0%), petroselínico (C18:1, Δ 6) (1.0%), vaccénico (C18:1, Δ 11) (1.0%), *trans*-vaccénico (C18:1, Δ 11) (1.0%), linoleico (C18:2) (4.0%), linoelaídico (C18:2*t*) (2.0%), *gamma*-linolénico (C18:3) (1.0%), nonadecanoico (C19:0) (1.0%), 7-nonadecenoico (C19:1, Δ 7) (1.0%), linolénico (C18:3) (4.0%), araquídico (C20:0) (4.0%), 5-eicosanoico (C20:1, Δ 5) (2.0%), 8-eicosanoico (C20:1, Δ 8) (2.0%), 11-eicosanoico (C20:1, Δ 11) (2.0%), 11,14-eicosadienoico (C20:2, Δ 11,14) (2.0%), *homogamma*-linolénico (C20:3, Δ 8,11,14) (1.0%), araquidónico (C20:4) (1.0%), eicosatrienoico (C20:3, Δ 5,8,11) (2.0%), behénico (C22:0) (2.0%), erúcido (C22:1) (4.0%), eicosapentaenoico (C20:5) (2.0%), docosadienoico (C22:2, Δ 13,16) (1.0%), docosatrienoico (C22:3, Δ 13,16,19) (2.0%), docosatetraenoico (C22:4, Δ 7,10,13,16) (1.0%), lignocérico (C24:0) (2.0%), docosapentaenoico (C22:5) (2.0%), docosahexaenoico (C22:6) (2.0%), nervónico (C24:1) (1.0%); Nu-Chek.
- Monoetiléter de dietilenglicol, d: 0.999 g/ml, Aldrich, riqueza: 99%.
- Pentanal, d: 0.81 g/ml, Sigma, riqueza: 97%.
- Pentano, d: 0.626 g/ml, Aldrich, riqueza: 99%.
- Piridina p.a., Carlo Erba, riqueza: 99%.
- *p*-toluensulfonilnitrosometilamida (Diazald®), Aldrich, riqueza: 99%.
- Sal sódica de 2',7'-diclorofluoresceína, Carlo Erba.

- Sulfato sódico (Na_2SO_4) anhidro granulado grueso, p.a., Merck.
- Sulfato sódico (Na_2SO_4) anhidro, p.a., Panreac, riqueza: 99%.
- Trimetilclorosilano (TMCS) p.a., d: 0.855 g/ml, Carlo Erba.
- Tripentadecanoína (C15:0), Sigma, riqueza: 99%.

ANEXO V – DIFUSIÓN DE RESULTADOS – RESULTS SPREAD

▪ **PARTICIPACIONES EN CONGRESOS:**

- Autores: **García-Llatas G**, Lagarda MJ, Farré R.

Título: **Determinación de ácidos grasos trans en productos horneados.**

Congreso: **II Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.**

Fecha y lugar de celebración: Del 3 al 6 de junio de 2003, Orihuela (Alicante).

- Autores: **García-Llatas G**, Lagarda MJ, Farré R, Abellán P, Romero F.

Título: **Optimisation of a headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) method to determine hexanal in baby foods.**

Congreso: **Chemical Reactions in Foods V**

Fecha y lugar de celebración: Del 29 de Septiembre a 1 de Octubre de 2004, Praga (República Checa).

Publicación: Proceeding en Czech Journal of Food Sciences 2004; 22: 151, ISSN 1212-1800.

- Autores: **García-Llatas G**, Lagarda MJ, Farré R, Abellán P, Romero F.

Título: **Determinación por SPME-GC de pentano en papillas líquidas como indicador de peroxidación lipídica.**

Congreso: **III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.**

Fecha y lugar de celebración: Burgos, del 29 de mayo al 1 de junio de 2005.

- Autores: **García-Llatas G**, Lagarda MJ, Farré R, Abellán P, Romero F.

Título: **Determinación de TBARS en papillas líquidas: adaptación y validación del método.**

Congreso: **III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

Fecha y lugar de celebración: Burgos, del 29 de mayo al 1 de junio de 2005.

- Autores: **García-Llatas G**, Cercaci L, Rodríguez-Estrada MT, Lagarda MJ, Lercker G.

Título: **Sterol oxidation in ready-to-eat infant foods**

Congreso: **4th Euro Fed Lipid Congress**

Fecha y lugar de celebración: Madrid, del 1 al 4 de octubre de 2006.

- Autores: **Guadalupe García-Llatas**, Luisito Cercaci, María Teresa Rodríguez-Estrada, Rosaura Farré, Giovanni Lercker.

Título: **Evaluation of sterol oxidation in ready-to-eat infant foods**

Congreso: **COST action 927 Thermally processed foods: posible health implications**

Fecha y lugar de celebración: Sofía (Bulgaria), del 3 al 5 de mayo de 2007.

▪ **PUBLICACIONES:**

- Revista: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2006;41:1486-1496.

Título: **Analysis of phytosterols in foods: a review.**

Autores (p.o. de firma): Lagarda M.J, **García-Llatas G**, Farré R.

- Revista: European Journal of Lipid Science and Technology 2006;108:1028-1036.

Título: **Monitoring of headspace volatiles in milk-cereal based liquid infant foods during storage**

Autores (p.o. de firma): **García-Llatas G**, Lagarda M.J, Clemente G, Farré R.

- Revista: Food Chemistry 2007;101:1078-1086.

Título: **A headspace solid-phase microextraction method of use in monitoring hexanal and pentane during storage. Application to liquid infant foods and powdered infant formulas.**

Autores (p.o. de firma): **García-Llatas G**, Lagarda M.J, Romero F, Abellán P, Farré R.

- Revista: Journal of Agricultural and Food Chemistry 2008;56:469-475.

Título: **Sterol oxidation in ready-to-eat infant foods during storage.**

Autores (p.o. de firma): **García-Llatas G**, Cercaci L, Rodríguez-Estrada M.T,
Lagarda M.J, Farré R, Lercker G.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41 (2006) 1486–1496

 JOURNAL OF
 PHARMACEUTICAL
 AND BIOMEDICAL
 ANALYSIS

www.elsevier.com/locate/jpha

Review

Analysis of phytosterols in foods

M.J. Lagarda, G. García-Llatas, R. Farré*

Nutrition and Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Burjassot, Spain

Received 11 January 2006; received in revised form 21 February 2006; accepted 22 February 2006

Available online 18 April 2006

Abstract

Phytosterols are bioactive compounds, one of their most studied and outstanding properties being their cholesterol-lowering activity. This explains the growing interest in the phytosterol contents of foods as either intrinsic or added components. The different steps (extraction, saponification, clean up, chromatographic determination) of plant sterol determination are reviewed, and emphasis is placed on the methods used to assay different phytosterols in food.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Phytosterols; Food; Diet; Gas chromatography; Liquid chromatography

Contents

1. Introduction	1486
2. Physiological functions of phytosterols	1488
3. Phytosterol contents in foods	1488
4. Estimated average intakes of phytosterols	1488
5. Analytical methods	1489
5.1. Sample storage conditions	1489
5.2. Sample preparation	1489
5.2.1. Solvent extraction	1489
5.2.2. Saponification	1490
5.2.3. Purification/enrichment techniques	1490
5.3. Determination	1490
5.3.1. Gas chromatography	1490
5.3.2. Liquid chromatography	1491
6. Conclusions	1495
Acknowledgment	1495
References	1495

1. Introduction

Plant sterols (phytosterols) are bioactive components of all vegetable foods. They are 28- or 29-carbon alcohols and resemble cholesterol in vertebrates in terms of both function (stabilization of phospholipid bilayers in plant cell membranes) and

structure (steroid nucleus, 3 β -hydroxyl group, 5, 6 double bond). Phytosterols contain an extra methyl or ethyl group, or double bond; most phytosterol side chains contain 9–10 carbon atoms, instead of 8 as found in cholesterol. Phytosterols have been classified as 4-demethylsterols of the cholestane series, all of which have double bonds at the C-5 position of the ring [1–3].

In plants, more than 200 different types of phytosterols have been reported the most abundant being β -sitosterol (24- α -ethylcholesterol), campesterol (24- α -methylcholesterol) and

* Corresponding author. Tel.: +34 963544950; fax: +34 963544954.
 E-mail address: rosaura.farre@uv.es (R. Farré).

2. Physiological functions of phytosterols

Initially, it was shown that soybean sterols could inhibit the increases in plasma and liver cholesterol normally seen in cholesterol-fed chicks, and also reduce the severity of atherosclerotic lesions [9–11]. Contrary to popular belief, the use of phytosterols for lowering serum cholesterol levels is not new. For instance, β -sitosterol has been used since the 1950s as a supplement and as a drug for lowering serum cholesterol levels in hypercholesterolemic individuals [12]. Since then, several clinical studies have been made on the effect upon blood lipids of 4-demethyl plant sterols or stanols, either in their free or esterified form. These compounds reduce total cholesterol and LDL-cholesterol levels through a reduction in cholesterol absorption. Properly solubilized free sterols and esterified sterols possess similar cholesterol-lowering activity [13–16].

Phytosterols and phytostanols inhibit the uptake of dietary and endogenously produced cholesterol from the gut. The exact mechanism by which this occurs is not fully understood, though several theories have been proposed. One theory suggests that in the intestine, cholesterol already marginally soluble is precipitated into a non-absorbable state by the presence of added phytosterols and stanols. A second theory is based on the fact that cholesterol must enter bile salt and phospholipids containing “mixed micelles” to be absorbed into the bloodstream. Cholesterol is only marginally soluble in these micelles, and is displaced by phytosterols (and stanols)—thereby preventing its absorption [6].

In addition to the mentioned blood cholesterol-lowering effect, phytosterols have shown the following activities in animals: anti-cancer properties (with a beneficial effect upon the inhibition of colon cancer development) [17–20], and anti-atherosclerotic [21], anti-inflammatory [22] and anti-oxidative effects [23].

The beneficial effect of phytosterols on serum low density lipoprotein (LDL) cholesterol levels has led to many studies of these compounds in foods and the diet. This increased attention on phytosterol research prompted the development of functional foods with added plant sterols.

3. Phytosterol contents in foods

Sterols make up the largest proportion of the unsaponifiable fraction of lipids. Plant fats and oils contain phytosterols as naturally occurring constituents. The most important natural sources of plant sterols in human diets are oils and margarines, although they are also found in a range of seeds, legumes, vegetables and unrefined vegetable oils [4,24–27]. Cereal products are a significant source of plant sterols, their contents, expressed on a fresh weight basis, being higher than in vegetables.

The most abundant sterols in plants are 4-demethylsterols such as sitosterol, campesterol, stigmasterol, Δ^5 -avenasterol, and Δ^7 -avenasterol. Sitosterol is the predominant sterol (90%). Other sterols such as saturated stanols and sterols synthesized earlier in the biosynthesis pathway, such as 4-monomethyl and 4,4-dimethyl sterols, usually appear in lower amounts [28,29].

In foods, plant sterols occur as free sterols, fatty acyl esters, glycosides and fatty acyl glycosides, with substitutions occurring at C3. Accordingly, the total sterol content is defined by the sum of all of them, whereas cholesterol occurs either as free alcoholic sterol or as cholesteryl esters [30–32].

Cereal products are a significant natural plant sterol source (free, esterified and steryl glycosides). The total sterol contents of rye (95.5 mg/100 g, wb), wheat (69.0), barley (76.1) and oat (44.7) have been reported in Finland [28]. A median total phytosterol concentration of 49 mg/100 g (range 4.1–344) edible portion has been reported for some cereal foods commonly consumed in Sweden and in the Netherlands. β -sitosterol generally being the dominant form (62%), followed by campesterol (21%) and, in smaller concentrations, stigmasterol (4%), β -sitostanol (4%) and campestanol (2%) [33]. Free and esterified sterol contents of 52.7 and 52.8 mg/100 g, respectively, have been reported in spelt (*Triticum spelta*) and winter wheat (*Triticum aestivum*), which also contain 123.8 and 112.6 mg/100 g, respectively, of glycosylated sterols [34].

Phytosterols have also been quantified in nuts and seeds commonly consumed in the United States—the highest and lowest phytosterol contents corresponding to sesame seed and wheat germ (400–413 mg/100 g), and the lowest to Brazil nuts (95 mg/100 g). Beta-sitosterol, Δ^5 -avenasterol and campesterol were found to be the predominant forms. It should be noted that the values obtained include steryl glycosides, which represent a significant proportion of total sterols in nuts and seeds [35].

In nuts (walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nuts), β -sitosterol is the most abundant sterol, the total sterol contents ranging from 99.12 to 207.17 mg/100 g oil. Only small differences were found between the campesterol and stigmasterol contents [36]. In walnuts, a campesterol content of 6 mg/100 g, and trace levels of stigmasterol have been reported [24]. The levels of stigmasterol of 3.81 and 3.83 mg/100 g oil in hazel and macadamia nuts mentioned by Maguire et al. [36], are in line with the reports of different authors [37–40].

The free and esterified sterol concentrations in 31 edible oils and fats, including individual values for sitosterol, campesterol, stigmasterol, brassicasterol, Δ^5 -avenasterols, sitostanol, campestanol, and cholesterol, have been reported [41]. A high variability in the proportion of free and esterified sterols has been reported among different oils and fats. In soybean oil, stigmasterol and sitosterol contents of 61 and 118 mg/100 g, respectively, have been recorded [42].

Among foods of animal origin, particularly bivalve shell fish species, 20 different sterols with cholesterol present as the major sterol (19–39%) and *trans*-22-dehydrocholesterol, brassicasterol, 24-methylenecholesterol and campesterol individually accounting for >10% in at least one species, have been detected. This wide range of sterols in bivalves reflects their varied phytoplankton food sources [43].

4. Estimated average intakes of phytosterols

The estimated daily dietary intakes of plant sterols among different populations range from 160 to 400 mg [44].

The average intakes of phytosterols have been estimated between 140 and 360 mg/day in Finland [45] and 163 mg/day in the United Kingdom [46].

In the Netherlands, the mean intakes (mg/day) of cholesterol (202), campesterol (27), stigmasterol (15), and β -sitosterol (102) have been estimated by gas-chromatographic (GC) determination of non-derivatized sterols in duplicate 24-h diets (among 123 people, in the spring and autumn of 1994) [47]. On the other hand, the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer reported a mean intake of 359 mg phytosterols/day, of which 64% corresponded to β -sitosterol, 18% to campesterol, and 9% to stigmasterol [48].

Plant sterols are less efficiently absorbed than cholesterol (2–5 and 60%, respectively) [49,50], while phytostanols are more poorly absorbed than phytosterols.

5. Analytical methods

The physiological effects of phytosterols, and mainly their cholesterol-lowering properties, have increased interest in their occurrence in foods and diets. As a result, there is also growing interest in their determination in foods, where phytosterols and phytostanols can be intrinsic or added, and analytical methods for measuring them have been developed.

As mentioned above, plant sterols are found in foods as free sterols, steryl esters, steryl glycosides and acylated steryl glycosides [30]. In turn, in sterol-enriched foods, phytostanols, phytosterol and phytosterol/phytostanol esters have been used. Thus, the ideal sample preparation procedure for total sterol determination would include the analysis of all possible conjugates of sterols [32].

In most cases, the determination of sterol components is based on the analysis of sterols as alcohols instead of steryl/stanyl esters as such, which is good from the labeling point of view—requiring the free sterol contents to be stated.

It should be noted that no official reference methods has been especially developed for the analysis of phytostanols or phytosterols in sterol-enriched foodstuffs. Some international reference methods exist for the analysis of sterol fractions of fats and oils, such as the ISO 6799 [51], IUPAC methods 2.401 [52] and 2.403 [53], ISO 12228 [54] and AOCS Ch 6-91 [55]. Also, Codex Stan 210 [56] refers to ISO 6799 [51] and IUPAC 2.403 [53] methods. All these methods have been developed for the analysis of sterols as natural minor food components, meaning that the sterol contents are 1% or lower, whereas in functional food products the sterol/sterol concentrations presently may be as high as 8% [5].

An excellent and comprehensive review of the chromatographic methods used in sterol determination has been carried out by Abidi [57]. In the present review, different steps of the analysis will be discussed.

The determination of phytosterols in plant material is usually performed by capillary gas chromatography (GC), with flame ionization detection (FID) or mass spectrometry (MS) to confirm peak identity, although HPLC can also be used. However, it is GC of sterol silyl ether (or acetate derivatives) coupled with electron impact or chemical ionization MS that provides the most effective resolution, identification and quantitation (by selected

ion monitoring) [58]. Validation methods for the determination of sterols in foods, diet samples and in human serum, including quality control checking analyses, using GC–FID have been published [32,33,59].

Typically, the analysis of individual sterols includes the extraction of lipids, saponification or acid hydrolysis and saponification to liberate sterols, extraction of unsaponifiable matter and separation/partial purification of sterols, e.g., by TLC or SPE, the formation of sterols derivatives, and their analysis by capillary GC [5,32,47,60].

5.1. Sample storage conditions

Sterols are unstable components, which is why the storage conditions of the sample prior to determination must be taken into account. As an example, it has been shown that sterols are more stable in non-lyophilized material (homogenized diet) stored at -20°C than in lyophilized material stored at 4°C ; in this case after 6 weeks of storage, the sterol content decreased and the chromatogram showed additional peaks [47].

5.2. Sample preparation

One of the most critical steps in the analysis of biological fluids and compounds in biological matrices is sample preparation. To prevent sterol oxidation, the oxygen has to be removed by blowing nitrogen, and anti-oxidants such as pyrogallol can also be used [47].

A reliable sample preparation method has been developed for the GC measurement of the total contents (including free, esterified and glycosylated forms) of individual sterols in foods [32].

5.2.1. Solvent extraction

The isolation technique to be applied depends on the nature of the matrix, its physical state (liquid or solid), and also on the form (free, esterified and glycosylated) in which sterols occur within the matrix.

Phytosterols in plant tissues and seed oils can be isolated by solvent extraction with chloroform–methanol [61], chloroform–methanol–water [62,63], hexane [64–66], methylene chloride [67,68] or acetone [69] followed by alkaline hydrolysis and chromatographic purification to obtain enriched total sterols.

The solvent system chloroform–methanol–water [62,63] has been applied by Thompson and Merola [70] to determine cholesterol in multicomponent foods as an alternative method to the AOAC [71], and has been reported to be capable of determining major non-glycosidic plant sterols. A modification of this method has been applied for the determination of plant sterol contents in research diets [59].

A solid phase extraction (SPE) method using neutral alumina cartridges has been applied for the extraction of free and esterified sterols from oils and fats [41].

Lipids from vegetables can also be extracted by supercritical fluid extraction (SFE) with supercritical CO_2 , after which sterols can be enriched and isolated following saponification [72,73] or supercritical fluid fractionation (SFF) [74] together

with additional sample clean up using different chromatographic techniques.

To isolate the non-glyceridic components (hydrocarbons, tocopherols, sterols and sterol esters) from the slightly more polar triacylglycerol matrix, solid phase extraction SPE (silicagel) has been used [75]. Prior to SPE, the free hydroxyl group of sterols and tocopherols were silylated to reduce their polarity. The eluted fraction was then analyzed by GC. As compared to solvent extraction, SPE is an environmentally more friendly technique which provides a more convenient way for sample extraction, with a reduced loss of sterol analytes.

5.2.2. Saponification

Direct saponification methods have been applied for the determination of plant sterols in pasta products [76] and in multi-component diet samples [47]. However, the acetal bond between the sterol and the carbohydrate moiety cannot be hydrolyzed in alkaline conditions, and therefore direct saponification methods fail to quantify steryl glycosides [77]. Some matrices such as cereals require acid hydrolysis to release bound sterols in cereals [4].

Acid hydrolysis (6M HCl), alkaline saponification (96% ethanolic KOH) and lipid extraction with toluene have been used for the determination of phytosterols and phytostanols in cereal products [25]. A combination of acid hydrolysis and alkaline hydrolysis is superior to alkaline hydrolysis alone [32,78].

Saponifications are quite laborious for routine analysis, and on the other hand, acid hydrolysis is not applicable to Δ^7 -phytosterols (e.g., Δ^7 -avenasterol, Δ^7 -stigmastenol, etc.), because they decompose or isomerize after a short time of acidic hydrolysis [79]. The occurrence of Δ^7 -sterols appears to be restricted to only a few plant families, e.g. Cucurbitaceae and Theaceae. In refined vegetable oils, sterols occur only in free and esterified form, because steryl glycosides, if originally present, are removed during the oil refining process [1,32].

Saponifications with ethanolic potassium hydroxide, either at room temperature or with heating (hot saponification) have been described: hot saponification with ethanolic potassium hydroxide in the presence of an internal standard (5 β -cholestan-3 α -ol) is adequate for most matrices having added phytosterols/phytostanols, such as spread, milk and yoghurt [5]. In saponification at room temperature, an aliquot of lipid extract or oil sample is stirred overnight at room temperature with 1M ethanolic potassium hydroxide [64,80,81].

To obtain total free, esterified and glycosidic sterols, acid hydrolysis has to be applied to the lipid extract. Acid hydrolysis is carried out with 0.5M methanolic HCl in a Teflon screw-cap test tube with a leak-proof cap at $75 \pm 2^\circ\text{C}$ for 22 h, with constant shaking at 145 rpm [82].

Although the isolation of unsaponifiable material containing, among others, phytostanols and phytosterols, after saponification by organic solvent extraction can be rather time consuming, most methods use multiple extractions in a separator funnel with an organic solvent (diethyl ether, ether, light petroleum or heptane)—followed by evaporation of solvent to dryness. However, during washing and shaking, difficult to break emulsions may be formed. The use of small columns of aluminum

oxide (alumina) in a form of solid phase extraction can replace extractions, avoiding emulsions and saving a lot of time during serial analyses. In addition, reproducibility can be improved. The soap solution is applied as is, i.e., in ethanol, to a small aluminum oxide column. The potassium salts of free fatty acids are strongly bound to the aluminum oxide surface by the formation of highly insoluble aluminum soaps. The unsaponifiable component is then eluted from the column with ether [83].

Sterol extracts usually require further clean up and/or enrichment techniques to remove interferences.

5.2.3. Purification/enrichment techniques

Column chromatography (CC) and thin layer chromatography (TLC) are accessible and affordable separation techniques [79,84], the choice depending on the amount of sample to be processed. Both techniques are adequate for sample clean up, purification, qualitative assays and preliminary sterol estimation studies [57].

TLC on silica gel with suitable mobile phases has been used to fractionate lipid or non-saponifiable lipid extracts [85,86]. Spots can be visualized with a UV lamp on a silicagel plate impregnated with a fluorescence indicator such as dichlorofluorescein.

However, the fractionation of sterols with CC and TLC is time consuming and therefore not suitable for routine analysis. That is why in the purification and/or fractionation of lipid extracts or non-saponifiable fractions, these techniques have often been replaced by solid phase extraction (SPE) cartridges, providing faster fractionation and using smaller volumes of solvent. Solid phase microextraction (SPME) is presently widely used separation/preparation methods for biological samples [29].

SPE has been used in reverse-phase (RP) mode (octadecylsilica) to isolate the sterol fraction from the unsaponifiable extract, and in normal-phase (NP) mode to separate trimethylsilyl (TMS) derivatives from a non-saponified vegetable oil sample [87]. Neutral alumina SPE cartridges have been used for the determination of both free and esterified sterols [41]. To separate free sterols from steryl glycosides, silica SPE cartridges have been employed [38,79].

5.3. Determination

5.3.1. Gas chromatography

Capillary gas chromatography (GC) has been the technique of choice for the analysis of sterols and related compounds. Capillary columns offer shorter analysis times and lesser peak interference, improvement in component resolution, and high thermal stability compared with packed columns [57].

The majority of sterol determinations have been carried out with non-polar stationary phases (100% polysiloxane phases) in capillary columns. However, the use of a slightly polar stationary phase, for instance 5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane of high thermal stability, provides better resolution of the peaks—allowing almost baseline separation of the trimethylsilyl (TMS) ether derivatives from the campesterol/campestanol and sitosterol/sitostanol pairs. Similar separation is not achieved with non-polar stationary phases

coated with 100% methyl polysiloxane. An excellent separation of campesterol and campestanol, and of sitosterol, sitostanol and Δ^5 -avenasterol has been achieved with a fused-silica capillary column (14% cyanopropyl-phenyl-methylpolysiloxane) of low/medium polarity [88].

Although the separation of sterols and stanols as such without derivatization is possible [46], the resolution of a sterol and its corresponding stanol is not as good as that of their trimethylsilyl (TMS) derivatives. Thus, usually prior to capillary GC, sterols and stanols are conventionally transformed into derivatives that yield improved peak shape, resolution and sensitivity, and a higher stability for the thermally labile unsaturated sterols [5]. Sterols are commonly analyzed as their trimethylsilyl (TMS) or acetate derivatives. The former are more suitable for the GC–MS characterization and quantitation of sterols.

Derivatizing agents usually utilized: *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) in anhydrous pyridine and bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) containing 1% of trimethylchlorosilane (TMCS) (1:1, v/v) added to a dried sample.

Simultaneous derivatization with BSTFA and extraction (by SPME) can also be carried out. Prior to extraction, the fiber (polyacrylate) is coated with BSTFA in the vapor phase, and on sampling the analytes (saponified sample) are converted into derivatives that have a high affinity for the coating. The procedure was applied to the determination of three precursors in the cholesterol biosynthesis pathway (desmosterol, lathosterol and lanosterol) and the determination of two phytosterols (sitosterol and sitostanol) in serum. The internal standard (IS) was 5 α -cholestan-3 β -ol. The serum matrix interferes with the SPME method, and the standard addition procedure must be applied for quantitation [29].

Selection of internal standard (IS): to eliminate analytical errors due to fluctuations in instrument operation conditions and other experimental variables, GC peaks of sterols are represented by their retention times relative to a reference standard or an internal standard (IS). On the other hand, losses of sterol analytes during isolation and separation must be corrected for the final results of analyte quantification by using radioisotopes or most frequently internal standardization with standards not present in samples [89].

The IS most commonly used in sterol determinations have been betulin, cholestan-3 β -ol, 5 β -cholestan-3 α -ol (epicoprostanol) and 5 α -cholestan-3 β -ol [5,31,85,90,91]. However, an IS should be similar to the analytes, and cholestan-3 β -ol is a sterol hydrocarbon lacking the position 3 hydroxyl group which is typical of sterols, while betulin has two hydroxyl groups and its structure and chemical properties differ even more from those of sterols. Thus, cholestan-3 β -ol and betulin are not the best choices. In addition, their FID detector responses differ from those of sterols. Thus, the use of cholestan-3 β -ol or betulin as IS would require detector response factors to be determined for sterols [5]. For most matrices 5 β -cholestan-3 α -ol (epicoprostanol) has been found to be adequate. Its structure closely resembles those of sterols, and it is absent from plant sterol samples. Its FID detector response is similar to that of stanols/sterols. Thus, correction factors are not needed for quantitation [5]. A chromatogram of phytosterols

commonly found in foods using cholestan-3 β -ol as IS is shown in Fig. 2.

However, 5 α -cholestan-3 β -ol (β -cholestanol) cannot be used for stanol analysis because samples may contain small amounts of cholestanol (dihydrocholesterol), which is the hydrogenation product of cholesterol.

Cholestanol and sitostanol are not suitable as IS, because they may occur in many fats. For this reason, some sterol determination methods such as for example the European olive oil method [83,92], recommend two analyses—one with cholestanol or sitostanol added as IS, plus one without the IS. In many cases, the use of a standard such as betulin, which is known not to occur in fats, can drastically cut the required number of analyses.

GC methods described for the determination of sterols in foods and published posterior to the comprehensive review carried out by Abidi [57], are included in Table 1. Sterols are routinely analyzed by GC–FID based on retention times, while GC–MS is used to confirm peak identities.

5.3.2. Liquid chromatography

Compared with GC, HPLC offers the advantage of operating under milder column temperatures, and under non-destructive detection conditions. It therefore seems suitable for the analysis of thermally unstable compounds such as sterols. However, the high lipophilicity of sterols can make sample processing and chromatography difficult. Potential contamination in the column or autoinjector has been minimized by using a high organic solvent content.

Normal-phase (NP) and reversed-phase (RP) HPLC techniques have been widely used for the analysis of lipid classes and individual sterols in various sample matrices. RP-HPLC uses less volatile polar organic solvents in water, and offers ready equilibration in a bonded silica stationary phase with the mobile phase solvents, compared with NP-HPLC; in general, RP-HPLC has been more frequently and more widely used than NP-HPLC for the separation of individual sterols [57].

The most frequently used options have been alkylsilica stationary phases, and among them octadecylsilica (ODS) columns. As mobile phases, organic solvents (acetonitrile, methanol) or their aqueous solutions (depending on the analyte structures and sample matrices involved) have been used.

HPLC methods described for the determination of sterols in foods and published posterior to the comprehensive review carried out by Abidi [57], are included in Table 2. Sterol detection has been carried out by UV (200–210 nm), photodiode array detection (DAD), refractive index (RI) detection, evaporative light scattering detection (ELSD), nuclear magnetic resonance (NMR) detection and mass spectrometry (MS), see Table 2.

RP-HPLC in combination with UV or light scattering detection has been shown to be useful for the analysis of molecular species of steryl glycosides and acylated steryl glycosides [93,94]. Prior to LC separation, TLC was applied for sample clean up and for the separation of different steryl species. The acylated species (steryl esters and acylated steryl glycosides) were converted to the corresponding non-acylated species (free sterols and steryl glycosides) by alkaline hydrolysis. Using

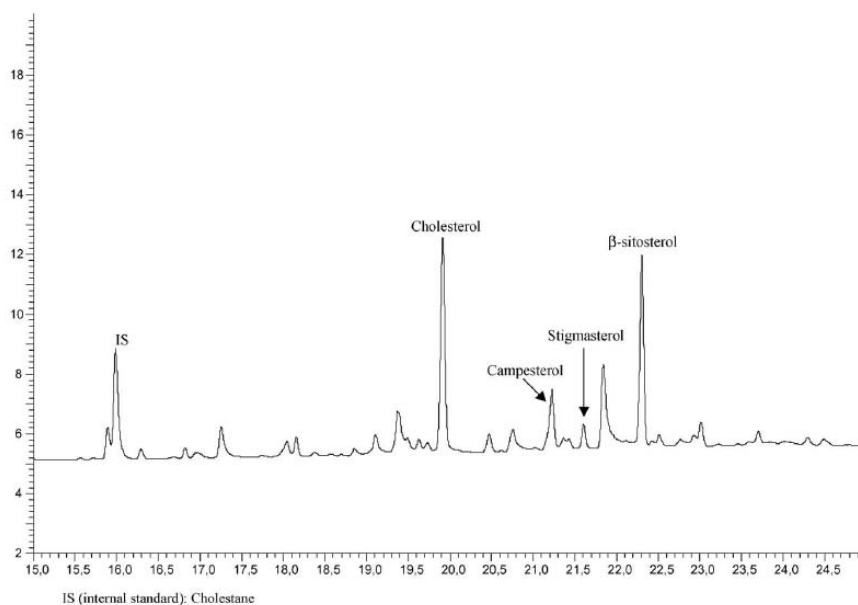


Fig. 2. GC-FID of TMS-phytosterols from a milk-cereal based infant food. Column Equity-5—poly(5% diphenyl/95% dimethylsiloxane) 30 mm \times 0.25 mm, d_f = 0.25 μ m.

HPLC in combination with UV detection (200 nm), free sterol standards can be used to quantify steryl glycosides, since at low wavelengths the glycosidic residues do not affect the UV absorption properties of steryl glycosides [94].

In HPLC-MS analysis, baseline separation of peaks is not always necessary, due to the high specificity and selectivity of the detection method. Recently, atmospheric pressure chemical ionization (APCI) with liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) was found to be suitable for sterol analyses in different samples matrices. LC-APCI-MS has been used to identify sterols in soybean oil [42], to characterize phytosterols in spelt [95], to determine ergosterol levels in bulrush [96] and to measure cholesterol oxides in different food supplies [97]. Because sterols are highly lipophilic with few polar functional groups, they are difficult to ionize through conventional electrospray methods [95]. APCI ionization is usable but is not the most sensitive method. Electron impact (EI) ionization in particular, and the recently developed atmospheric pressure photoionization (APPI) technique, are effective alternatives for lipophilic compounds [98]. However, APCI ionization is most widely used for the sterols analysis. APCI instruments are moreover commonly available, and APCI ionization can be easily coupled to the HPLC system.

MS yields the most effective resolution, identification and quantitation (via selected ion monitoring) [58]. Intense fragment

ions (m/z 369, 395, 397 and 399 for cholesterol, stigmasterol, sitosterol and sitostanol, respectively) have been observed, indicating the loss of water $[M+H-H_2O]^+$. This seems to be characteristic of sterols, as dehydration was observed in earlier reports with cholesterol oxides [97], phytosterols [42,95] and ergosterol [96].

MS/MS detection is known to be specific and selective. However, in MS/MS spectra of sterols, the product ion spectra of the $[M+H-H_2O]^+$ ions were quite similar to those obtained with MS.

The response factors expressed by the ratio of free sterols over ergosterol peak areas at 100 μ g/ml in the determination of several sterols in cereal by LC/MS² have been calculated [34]. It was found that response factors were related to sterol structure. Indeed, saturated sterols, with no double bond in the ring structure, exhibited low response factors (0.25–0.31), whereas unsaturated sterols with one double bond in the ring structure had high response factors (0.89–1.42). Further differences observed within free sterol response factors could be explained by differences in the sterol side chains [94].

On-line liquid chromatography-gas chromatography (LC-GC) has been applied to the detection of vegetable oils in milk fat using β -sitosterol as marker. The method involves *trans*-esterification of the fat, pre-separation of the sterol fraction from other lipid constituents, and on-line transfer to

Table 1
GC analysis of phytosterols in foods

Method detection	Stationary phase (supplier)	Internal standard	Sterol investigated (derivative)	Food	Reference
FID	HP-5, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$, $30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$ (Hewlett-Packard)	Betulin	Brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol (SYLON BFT/pyridine, 1:1)	Milk, margarine	[102]
FID	DB-5, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$, $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ (J&W)	Cholesteryl heptadecanoate	Brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, Δ^7 -stigmasterol	Vegetable oils	[103]
FID	Rtx-5, $d_f = 0.1 \mu\text{m}$, $60 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ (Restek)	Dihydrocholesterol (=cholestanol)	Cholesterol, brassicasterol, campesterol, stigmasterol, sitosterol, Δ^5 -avenasterol, others (stanols) (TMS), sitostanol) (BSTFA with 1% of TMS in pyridine) (TMS)	Whole-wheat flour and diet composite	[32]
FID-MS	Rtx-5 (Restek)		Brassicasterol, campesterol, sitosterol, others (stanols) (TMS)	Oils, margarines, cereal products, vegetables, fruits, berries	[26]
FID-MS	CP Sil-8, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$, $30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$ (Varian) or HP-5, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$, $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$		Cholesterol, 24-nordihydrocholesterol, <i>trans</i> -22-dihydrocholesterol, brassicasterol, 24-methylcholesterol, campesterol, sitosterol	Seafood: bivalves	[43]
FID-MS	HP-55, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$, $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$	Dihydrocholesterol	Brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol (BSTFA/pyridine, 2:1 in TBME)	Plant matrices	[79]
FID-MS	Rtx-1701, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$, $60 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$, HP-5, $30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$ (Restek)	Epicholesterol	Sitosterol, campesterol, stigmasterol, brassicasterol, Δ^5 -avenasterol, cholesterol, others (sitosterol, campestanol), (BSTFA with 1% of TMS) (TMS)	Edible oils and fats	[41]
FID-MS	Rtx-5 (Restek)		β -Sitosterol, campesterol, stigmasterols, Δ^5 -avenasterol, sitostanol, campestanol	Nuts and seeds	[27]
FID	Rtx-5, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$, $15 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$ (Restek)	Epicholesterol	β -Sitosterol and other (β -sitosterol glucoside) (BSTFA/TMCS, 1:1) (TMS)	Dietary supplements, whole wheat flour, peanut butter, flaxseed, granola bars, soybeans, dried figs, lyophilized mixed vegetables, almonds, pine nuts, diet homogenate	[35]

FID: flame ionization detector; MS: mass spectrometry; SYLON BFT *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide containing 1% trimethylchlorosilane; BSTFA: bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide; TMCS: trimethylchlorosilane; TMS: trimethylsilane.

Table 2
HPLC analysis of phytosterols in foods

Method/detection	Stationary phase [mobile phase] (supplier)	Internal standard	Sterol investigated (derivative)	Food	References
UV 238nm, APCI-MS	C ₁₈ narrow-bore 5 µm, 150 mm × 2.1 mm [MeCN-water (86:14)] (Supelco)	6-Katocholestanol	Sitosterol and stigmasterol	Vegetable oils	[42]
DAD	Luna C8 250 mm × 4.6 mm [MeCN-water (86:20)] (Phenomenex)		Campesterol, stigmasterol, β-sitosterol	Edible nuts: walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts, macadamia nut	[36]
DAD	Luna C8 3 µm, 150 mm × 2 mm [MeCN-water (86:20)] (Phenomenex)		β-Sitosterol	Vegetable oils	[104]
ELSD-MS	Hypersil BDS RP18 5 µm, 250 mm × 4 mm [MeOH-MeCN-water (75:15:10)] (Hewlett-Packard)	Cholesterol-β-D-glucoside	Steryl glycosides and acylated sterol glycosides: brassicasterol, campesterol + stigmasterol, β-sitosterol, Δ ⁵ -avenasterol	Plant matrices	[79]
APCI-MS	Luna Hexyl-Phenyl 3 µm, 100 mm × 2 mm [A=MeCN, B=water, gradient elution] (Phenomenex)	Cholesteryl decanoate	Campesterol, stigmasterol, β-sitosterol, sitosterol, campestanol	Juices and margarine spreads	[105]
APCI-MS	C ₁₈ Phenyl 2 µm, 150 mm × 2.1 mm [A=MeOH, B=water (16: MeCN), gradient elution]		Glycosylated and free sterols: ergosterol, Δ ⁵ -avenasterol, Δ ⁷ -avenasterol, stigmasterol, campesterol, β-sitosterol, campestanol, β-sitosterol	Cereals (spelt and wheat)	[95,34]
DAD	Luna C ₁₈ 5 µm, 250 mm × 2 mm [MeOH] (Phenomenex)		γ-Oryzanol; campesterylferulate, cycloartenylferulate, 24-methylcycloartenylferulate	Crude rice bran oil	[106]
APCI-MS	Protonal 200-3-C30 3 µm, 250 mm × 2 mm [MeOH- <i>t</i> -BME (80:20)] (Bioshield)				
On-line LC UV-GC-FID	Hypersil 2.1 mm × 100 mm, 60 Å, 5 µm, Agilent [0.8% 2-propanol in <i>n</i> -hexane] (GC, CP-Si8CB 4 _r = 0.4 µm, 25 m × 0.25 mm, Chromopack)	Stigmasterol	β-Sitosterol (as marker of milk fat adulteration with vegetable oils)	Milk fat	[99]
APCI-MS	X-Terra MS C8 3.5 µm, 150 mm × 2.1 mm [MeOH-water (90:10)] (Waters)	Stigmasterol	Sitosterol, sitosterol	Caco-2 cells (availability assay)	[107]

APCI-MS: atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrum; DAD: diode array detection; ELSD: evaporative light scattering detection; MeCN: acetonitrile; MeOH: methanol; *t*-BME: *tert*-butyl methyl ether.

the capillary GC system. This method avoids time-consuming sample preparation steps prior to GC analysis [99].

Supercritical fluid chromatography (SFC) employs inert supercritical carbon dioxide as mobile phase eluent. The technique is suitable for the analysis of phytosterols in vegetable oils [100]. Coupling supercritical fluid extraction (SFE) with SFC enables sample extraction, pre-concentration, preparative fractionation and chromatographic quantitation in a single operation [72,101].

6. Conclusions

According to their sensitivity and precision, the currently available techniques for sterol analysis can be classified as follows: GC>HPLC>SFC. The sensitivity order may vary depending on the sterol structures and detectors coupled to the chromatographic instruments. As reported above, GC–FID (or MS, when peak identity confirmation is needed) can be considered the method of choice for the determination of phytosterols in foods and diets.

It should also be noted that each matrix is unique, and conditions have to be selected to optimize the accuracy/yield of all forms of sterols in different sample types. On the other hand, faster procedures must be developed to facilitate the control of functional foods with added phytosterols.

Acknowledgment

This review is part of the project BIO4-72 financially supported by the University of Valencia (Spain).

References

- [1] S.P. Kochhar, *Prog. Lipid Res.* 22 (1983) 161–188.
- [2] R.A. Moreau, B.D. Whitaker, K.B. Hicks, *Prog. Lipid Res.* 41 (2002) 457–500.
- [3] D. Kritchevsky, S.C. Chen, *Nutr. Res.* 25 (2005) 413–428.
- [4] P.C. Dutta, L.A. Appelqvist, *J. Sci. Food Agric.* 71 (1996) 383–391.
- [5] P. Laakso, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107 (2005) 402–410.
- [6] K.B. Hicks, R.A. Moreau, *Food Technol.* 55 (2001) 63–67.
- [7] EU-Scientific Committee on Food: European commission, Opinion of SCF on a request for the safety assessment of the use of phytosterol esters in yellow fat spreads, 2000. Available: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out56_en.pdf.
- [8] EU-Commission Regulation (EC) No. 608/2004 of 31 March 2004 concerning the labelling of foods and food ingredients with added phytosterols, phytosterol ester, phytostanols and/or phytostanol esters, *Of L97 of 1.04.2004*, pp. 0044–0045.
- [9] D.W. Peterson, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 78 (1951) 143–147.
- [10] D.W. Peterson, C.W. Nichols Jr., E.A. Shneour, *J. Nutr.* 47 (1952) 57–65.
- [11] D.W. Peterson, E.A. Schneour, N.F. Peck, H.W. Gaffey, *J. Nutr.* 50 (1953) 191–201.
- [12] O.J. Pollak, *Circulation* 7 (1953) 702–706.
- [13] H.F.J. Hendriks, J.A. Weststrate, T. van Vliet, G.W. Meijer, *Eur. J. Clin. Nutr.* 53 (1999) 319–327.
- [14] A. Sierksma, J.A. Weststrate, G.W. Meijer, *Br. J. Nutr.* 82 (1999) 273–282.
- [15] FDA, Food labelling: Health claims: Plant sterol/stanol esters and coronary heart disease, *Food Drug Admin. Fed. Reg.* 65, 54686–54739. www.access.gpo.gov/su_docs/fedreg/a000908c.html.
- [16] A. De Jong, J. Plat, R.P. Mensink, *J. Nutr. Biochem.* 14 (2003) 362–369.
- [17] A.V. Rao, S.A. Janezic, *Nutr. Cancer* 18 (1992) 43–52.
- [18] A.V. Rao, R. Koratkar, in: F. Shahidi (Ed.), *Antinutrients and Phytochemicals in Food*, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC, 1997, pp. 313–324.
- [19] A.B. Awad, R.L. von Holtz, J.P. Cone, C.S. Fink, Y.C. Chen, *Anticancer Res.* 18 (1998) 471–473.
- [20] A.B. Awad, R. Roy, C.S. Fink, *Oncol. Rep.* 10 (2003) 497–500.
- [21] M.H. Moghadasian, B.M. McManus, D.V. Godin, B. Rodrigues, J.J. Frohlich, *Circulation* 99 (1999) 1733–1739.
- [22] P.J. Bouie, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 4 (2001) 471–475.
- [23] S.J. van Rensburg, W.M. Daniels, J.M. van Zyl, J.J. Taljaard, *Metab. Brain Dis.* 15 (2000) 257–265.
- [24] J.L. Wehrauch, J.M. Gardner, *J. Am. Diet. Assoc.* 73 (1978) 39–47.
- [25] L. Normén, M. Johansson, H. Andersson, Y. van Gasteren, P. Dutta, *Eur. J. Nutr.* 38 (1999) 84–89.
- [26] V. Piironen, J. Toivo, A.M. Lampi, *J. Food Comp. Anal.* 13 (2000) 619–624.
- [27] K.M. Phillips, D.M. Ruggio, M. Ashraf-Khorassani, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 9436–9445.
- [28] V. Piironen, J. Toivo, A.M. Lampi, *Cereal Chem.* 79 (2002) 148–154.
- [29] C. Domeño, B. Ruiz, C. Nerín, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1576–1583.
- [30] T. Akihisa, W. Kokke, T. Tamura, in: G.W. Patterson, W.D. Ness (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Sterols*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, 1991, pp. 172–228.
- [31] M. Fenton, *J. Chromatogr.* 624 (1992) 369–388.
- [32] J. Toivo, K. Phillips, A.M. Lampi, V. Piironen, *J. Food Comp. Anal.* 14 (2001) 631–643.
- [33] L. Normén, S. Bryngelsson, M. Johnsson, P. Evheden, L. Ellegard, H. Brants, H. Andersson, P. Dutta, *J. Food Comp. Anal.* 15 (2002) 693–704.
- [34] N.L. Ruibal-Mendieta, R. Rozenberg, D.L. Delacroix, G. Petitjean, A. Dekeyser, C. Baccelli, C. Marques, N.M. Delzenne, M. Meurens, J.-L. Habib-Jwain, J. Quetin-Leclercq, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4802–4807.
- [35] K.M. Phillips, D.M. Ruggio, M. Ashraf-Khorassani, *J. Food Lipids* 12 (2005) 124–140.
- [36] L.S. Maguire, S.M. O'Sullivan, K. Galvin, T.P. O'Connor, N.M. O'Brien, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 55 (2004) 171–178.
- [37] G.P. Savage, D.L. McNeill, P.C. Dutta, *JAOCs* 74 (1997) 755–759.
- [38] J. Parcerisa, D.G. Richardson, M. Rafecas, R. Codony, J. Boatella, *J. Chromatogr. A* 805 (1998) 259–268.
- [39] J. Parcerisa, I. Casals, J. Boatella, R. Codony, M. Rafecas, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 149–158.
- [40] A. Kaijser, P. Dutta, G. Savage, *Food Chem.* 71 (2000) 67–70.
- [41] K.M. Phillips, D.M. Ruggio, J.I. Toivo, M.A. Swank, A.H. Simpkins, *J. Food Comp. Anal.* 15 (2002) 123–142.
- [42] M. Careri, L. Elvirí, A. Mangia, *J. Chromatogr. A* 935 (2001) 249–257.
- [43] L.A. Copeman, C.C. Parrish, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4872–4881.
- [44] A. Berger, P.J.H. Jones, S.S. Abumweis, *Lipids Health Dis.* 3 (2004), <http://www.lipidworld.com/content/3/1/5>.
- [45] V. Piironen, A.M. Lampi, in: P.C. Dutta (Ed.), *Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2004, pp. 1–32.
- [46] G.M. Morton, S.M. Lee, D.H. Buss, P. Lawrence, *J. Hum. Nutr. Diet.* 8 (1995) 429–440.
- [47] A.A. Jekel, H.A.M.G. Vaessen, R.C. Schothorst, *Fresen. J. Anal. Chem.* 360 (1998) 595–600.
- [48] A.L. Normén, H.A.M. Brants, L.E. Voorrips, H.A. Andersson, P.A. van den Brandt, R.A. Goldbohm, *Am. J. Clin. Nutr.* 74 (2001) 141–148.
- [49] M.S. Bosner, L.G. Lange, W.F. Stenson, R.E. Ostlund Jr., *J. Lipid Res.* 40 (1999) 302–308.
- [50] R.E. Ostlund Jr., J.B. McGill, C.-M. Zeng, D.F. Covey, J. Stearns, W.F. Stenson, C.A. Spilburg, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282 (2002) E911–E916.

- [51] ISO 6799, International Organisation for Standardization, Geneva, Switzerland, 1991.
- [52] International Union of Pure Applied Chemistry: Method 2.401, in: C. Paquot, A. Hautfenne (Eds.), *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*, 7th ed., Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK, 1987.
- [53] International Union of Pure Applied Chemistry: Method 2.403, in: C. Paquot, A. Hautfenne (Eds.), *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*, 7th ed., Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK, 1987.
- [54] ISO 12228: International Organisation for Standardization, Geneva, Switzerland, 1999.
- [55] AOCS Official Method Ch 6-91, American Oil Chemists' Society, USA, 1997.
- [56] Codex Standard for Named Vegetable Oils Codex-Stan 210, Codex Alimentarius, 1999.
- [57] S.L. Abidi, J. Chromatogr. A 935 (2001) 173–201.
- [58] P. Volin, J. Chromatogr. A 935 (2001) 125–140.
- [59] K.M. Phillips, D.M. Ruggio, J.A. Bailey, J. Chromatogr. B 732 (1999) 17–29.
- [60] V. Piironen, D.G. Lindsay, T.A. Miettinen, J. Toivo, A.M. Lampi, J. Sci. Food Agric. 80 (2000) 939–966.
- [61] R.P. Evershed, V.L. Male, L.J. Goad, J. Chromatogr. 400 (1987) 187–205.
- [62] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane-Stanley, J. Biol. Chem. 226 (1957) 497–509.
- [63] E.G. Bligh, W.J. Dyer, Can. J. Biochem. Physiol. 37 (1959) 911–917.
- [64] S.L. Abidi, G.R. List, K.A. Rennick, J. Am. Oil Chem. Soc. 76 (1999) 463–467.
- [65] H.M.A. Mohamed, I.I. Awatif, Food Chem. 62 (1998) 269–276.
- [66] R.A. Moreau, M.J. Powell, K.B. Hicks, J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 2149–2154.
- [67] T. Akihisa, Y. Kinura, K. Roy, P. Ghosh, S. Thakur, T. Tamura, Phytochemistry 35 (1994) 1309–1313.
- [68] T. Akihisa, Y. Nishimura, N. Nakamura, K. Roy, P. Ghosh, S. Thakur, T. Tamura, Phytochemistry 31 (1992) 1765–1768.
- [69] F.W. Claesen, C. van de Haar, T.A. van Beek, J. Dorado, M.J. Martínez-Inigo, R. Sierra-Alvarez, Phytochem. Anal. 11 (2000) 251–256.
- [70] R.H. Thompson, G.V. Merola, J. AOAC Int. 76 (1993) 1057–1068.
- [71] AOAC, Official Methods of Analysis, 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1984.
- [72] J.M. Snyder, J.W. King, S.L. Taylor, A.L. Neese, J. Am. Oil Chem. Soc. 76 (1999) 717–721.
- [73] J.W. King, E. Sable-Demessi, F. Temmelli, J.A. Teel, J. Supercrit. Fluids 10 (1997) 127–137.
- [74] S.L. Taylor, J.W. King, J. Chromatogr. Sci. 38 (2000) 91–94.
- [75] M. Lechner, B. Reiter, E. Lorbeer, J. Chromatogr. A 857 (1999) 231–238.
- [76] M.I.P. Kovacs, J. Cereal Sci. 11 (1990) 291–297.
- [77] R.C. Heupel, in: W.D. Nes, E.J. Parish (Eds.), *Analysis of Sterols and other Biologically Significant Steroids*, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1989, pp. 49–60.
- [78] J. Toivo, A.M. Lampi, S. Aalto, V. Piironen, Food Chem. 68 (2000) 239–245.
- [79] P. Breinhölder, L. Mosca, W. Lindner, J. Chromatogr. B 777 (2002) 67–82.
- [80] D. Firestone, *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*, 4th ed., AOCS, Champaign, IL, 1990, Method Ce 3-75.
- [81] N. Ibrahim, R.K. Puri, S. Kapila, N. Unklabay, J. Food Sci. 55 (1990) 271–272.
- [82] S. Nagy, H.E. Nordby, Lipids 6 (1971) 826–830.
- [83] K. Aitzetmüller, L. Brühl, H.-J. Fiebig, Lipid 100 (1998) 429–435.
- [84] C. Paquot, A. Hautfenne, *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*, International Union of Pure and Applied Chemistry, 7th ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1987, Section 2.403.
- [85] S. Ghosat, Phytochemistry 24 (1985) 1807–1810.
- [86] W.D. Nes, R.C. Heupel, P.H. Le, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 20 (1985) 1431–1433.
- [87] J. Toivo, V. Piironen, P. Kalo, P. Varo, Chromatographia 48 (1998) 745–750.
- [88] P.C. Dutta, L. Normen, J. Chromatogr. A 816 (1998) 177–184.
- [89] B.A. Knights, Lipids 17 (1982) 204–208.
- [90] A.M. Lampi, V. Piironen, J. Toivo, in: P.C. Dutta (Ed.), *Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2004, pp. 33–73.
- [91] G.S.M.J.E. Duchateau, H.-G.M. Jansen, A.J.H. Louter, in: P.C. Dutta (Ed.), *Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2004, pp. 75–131.
- [92] Commission Regulation (EEC) No. 2568/91, Annex V, Determination of sterol composition and content gas chromatography with a capillary column, Off. J. Eur. Commun. L248 (1991) 15–22.
- [93] L.J. Goad, T. Akihisa, *Analysis of Sterols*, Blackie, London, UK, 1997.
- [94] J. Kelsemeier, W. Eichenberger, B. Urban, Plant Cell Physiol. 26 (1985) 463–471.
- [95] R. Rozenberg, N.L. Ruibal-Mendieta, G. Petitjean, P. Cani, D.L. Delacroix, N.M. Delzenne, M. Meurens, J. Quetin-Leclercq, J.-L. Habib-Jiwan, J. Cereal Sci. 38 (2003) 189–197.
- [96] J. Headley, K. Peru, B. Verna, R. Roberts, J. Chromatogr. A 958 (2002) 149–156.
- [97] E. Razzazi-Fazeli, S. Kleineisen, W. Luf, J. Chromatogr. A 896 (2000) 149–156.
- [98] L. Heimark, P. Shipkova, J. Greene, H. Munyyer, T. Yarosh-Tomaine, B. DiDomenico, R. Hare, B. Pramanik, J. Mass Spectrom. 37 (2002) 265–269.
- [99] W. Kamm, F. Dionisi, C. Hischenhuber, H.-G. Schmarr, K.-H. Engel, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104 (2002) 756–761.
- [100] Y.M. Choo, M.H. Ng, A.N. Ma, C.H. Chuah, M.A. Hashim, Lipids 40 (2005) 429–432.
- [101] S. Taylor, J.W. King, J. Am. Oil Chem. Soc. 79 (2002) 1133–1136.
- [102] G. Contarini, M. Povolò, E. Bonfitto, S. Berardi, Int. Dairy J. 12 (2002) 573–578.
- [103] P. Kalo, T. Kuuranne, J. Chromatogr. A 935 (2001) 237–248.
- [104] C.M. López Ortiz, M.S. Prats Moya, V. Berenguer Navarro, J. Food Compos. Anal. 19 (2006) 141–149.
- [105] I. Mezine, H. Zhang, C. Macku, R.A.M. Lijana, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 5639–5646.
- [106] W. Stöggel, C. Huck, S. Wongyai, H. Scherz, G. Bonn, J. Sep. Sci. 28 (2005) 1712–1718.
- [107] J.J. Palmgrén, A. Toyrás, T. Mauriala, J. Mönkkönen, S. Auriola, J. Chromatogr. B 821 (2005) 144–152.

Guadalupe García-Llatas^a
María Jesús Lagarda^a
Gonzalo Clemente^b
Rosaura Farré^a

^a Faculty of Pharmacy,
Nutrition and Food Chemistry,
University of Valencia,
Valencia, Spain

^b Department of Statistics,
Polytechnic University,
Valencia, Spain

Monitoring of headspace volatiles in milk-cereal-based liquid infant foods during storage

The effect of storage (time and temperature) on the evolution of pentanal, hexanal, heptanal and pentane as volatile lipid oxidation products in two liquid ready-to-eat milk-cereal-based infant foods was studied. An SPME-GC method was used to this effect. Samples were stored for 9 months at 25, 30 and 37 °C and tested eight times during this period. Freshly produced infant foods contained pentanal, hexanal and heptanal (mean values: 10.71, 71.5 and 1.2 µg/kg, respectively), which decreased during the first 3 months of storage, although from the fourth month onwards no significant differences among storage times were found. Aldehyde content was inversely proportional to storage temperature. Pentane content was directly proportional to storage temperature and increased (19.9 µg/kg at zero time) over all months of storage up to 43.1 µg/kg.

Keywords: Hexanal, infant foods, lipid oxidation, storage, volatiles.

1 Introduction

Lipid oxidation is well recognized as a major cause of quality deterioration during the processing or storage of lipid-rich foods [1]. Hydroperoxides are formed during the oxidation of unsaturated fatty acids, and these hydroperoxides rapidly decompose to yield a complex mixture of secondary lipid oxidation products (alkanes, alkenes, aldehydes, ketones, etc.) that not only introduce off-flavors, but also reduce the nutritional value of the product and shorten shelf life stability [2–4].

Infant foods have a lipid fraction with a relatively large amount of unsaturated fatty acids (>50% of total fatty acids), and contain a non-negligible amount of added minerals, among them iron, which can enhance lipid oxidation. The main polyunsaturated fatty acid in infant foods is linoleic acid. Its autoxidation produces a mixture of 9- and 13-hydroperoxides that decompose into a variety of volatile products (hexanal, 3-nonenal, 2,4-decadienal, pentanal, heptanal, 2-octenal and pentane, among others) [2].

Specifically, saturated aldehydes – propanal, pentanal, heptanal and, above all, hexanal – have been identified in dairy products by headspace (HS) [5] and solid-phase microextraction (SPME) [6, 7]. These compounds have been used to monitor lipid oxidation, in view of their direct relation to oxidative off-flavor development in milk products and low odor threshold [8].

On the other hand, the aldehydes participate in different reactions that lead to their degradation: (1) Aldehydes react either with free amino acids or with free amino groups of proteins, forming Schiff bases (Maillard reaction initiation), and lipid oxidation products are well-known precursors of browning reactions [9–11]. (2) Aldehydes are easily oxidized by atmospheric oxygen, the main products of their autoxidation being the corresponding fatty acids. Therefore, pentanal, hexanal and heptanal can be oxidized to pentanoic, hexanoic and heptanoic acid, respectively [2, 12]. (3) Saturated aldehydes can be oxidized to a multitude of lower-chain aldehydes and dialdehydes [2]. The mentioned reactions are temperature sensitive, *i.e.* a decrease in volatile aldehyde content is increased by temperature increments.

Pentane is the main hydrocarbon formed in linoleic autoxidation [2] and has also been proposed as an indicator of fat oxidation. It is useful for monitoring fat oxidation during storage, because its content increases over time, and compared to aldehydes it offers the advantage of being inert and stable under adequate storage conditions [13].

The present study examines the effect of storage (time and temperature) on the evolution of pentanal, hexanal, heptanal and pentane as volatile secondary oxidation products of the lipid fraction in liquid ready-to-eat milk-cereal-based infant foods, with the final aim of assessing their usefulness as indicators of the stability of the lipid fraction in infant foods. An SPME-gas chromatography (GC) method was used to this effect. It should be noted that the study does not aim to characterize aroma profiles.

Correspondence: Rosaura Farré, Nutrition and Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, E-46100 Burjassot, Spain. Phone: +34 963 544956, Fax: +34 963 544954, e-mail: rosaura.farre@uv.es



To our knowledge, studies on HS evolution of complex systems like our samples (milk, vegetable oils and cereals) have not been reported to date.

2 Materials and methods

2.1 Samples

Two liquid infant foods (LH and LF) containing 88% skimmed milk and 6.8% hydrolyzed eight-cereals flour (wheat, corn, rice, oat, barley, rye, sorghum and millet) and differing in a minor ingredient – LH contained honey (0.9%) and LF 1.1% of fruits (banana, orange and apple) – were used for the study. The fat and protein contents (wt/wt) in both samples were 2.6 and 3.5%, respectively.

Both products were obtained by the same manufacturing process that includes heating at 90 °C and an UHT thermal treatment before packing, in an inert atmosphere, in a commercial 250-mL tetra brick. The products were supplied by the manufacturer (Hero España S.A.).

From each type of sample, a sufficient quantity of tetra bricks from the same batch was obtained. Samples were stored at 25, 30 and 37 °C in their original sealed containers until analyses, which were performed immediately after manufacture (zero time) and after 1, 2, 4, 5, 7, 8 and 9 months of storage. The considered storage period was shorter than the shelf life of these infant foods (12 months), because normally their stay in stores does not surpass this time.

The temperatures of storage selected were 25, 30 and 37 °C, because 25 °C is the usual room temperature in markets and food stores, while the other temperatures can be reached under extreme conditions, for instance in stores lacking air conditioning units in summer.

To carry out the determinations, one tetra brick corresponding to a sample and storage temperature was randomly selected.

Water activity (a_w) of both infant foods measured at the beginning and at the end of the study was 0.992 ± 0.004 (at 24 °C).

The fatty acid profiles of the samples were determined immediately after manufacture by GC-flame ionization detector (FID) as fatty acid methyl esters, as reported in García-Llatas *et al.* [14]. Specifically, the percentage of total fatty acids of oleic, linoleic, α -linolenic and *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acids were 40.33, 18.58, 1.19 and 0.14%, respectively.

2.2 Reagents

Hexanal (Sigma, Steinheim, Germany), pentanal (Aldrich, Steinheim, Germany), heptanal (Sigma), methanol *p.a.* (Merck, Darmstadt, Germany), pentane (Aldrich), 4-methyl-2-pentanone (MIBK) used as internal standard (IS) (Fluka, Buchs, Switzerland), and Millipore MilliQ deionized water (Millipore Ibérica S.A., Barcelona, Spain).

2.3 HS-SPME-GC procedure

The GC-FID method, described in García-Llatas *et al.* [14], is used when a GC-mass spectrometer is not available. Briefly, approximately 4 g of sample was introduced into a 10-mL HS glass vial that was immediately crimped. Of an 80- μ g MIBK/mL-solution, 3 μ L were added through the septum. The vials were maintained at 37 °C and stirred during the equilibration (15 min) and extraction (45 min) periods. HS extraction was performed with an 85- μ m Carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) StableFlex fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Then, the fiber was immediately desorbed in the GC injector at 250 °C for 5 min. For the GC analysis, an Autosystem XL Perkin Elmer GC (Norwalk, CT, USA) equipped with a FID and an Equity 5 5% diphenyl/95% dimethylsiloxane capillary column (30 m \times 0.53 mm; 5 μ m film thickness; Supelco, Bellefonte, PA, USA) was used. The chromatographic conditions were: carrier gas H₂, flow rate 2.1 mL/min; the temperature of the oven was initially 40 °C for 5 min, and was increased to 100 °C at a rate of 4 °C/min, then to 220 °C at 17 °C/min, and finally held at 220 °C for 10 min. The FID temperature was 300 °C. The response was monitored with Totalchrom workstation software (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA).

Carry-over and peaks originated by compounds present in laboratory ambient, fiber and capillary column were daily assessed by running blank samples (water).

A chromatogram of sample LH obtained at zero time, including all identified compounds (pentanal, hexanal, heptanal and pentane), is shown in Fig. 1.

Compounds were identified by using standards and by GC-mass spectrometry (MS) analysis. Quantification, based on GC-FID areas, was done by the standard addition method with IS, *i.e.* by preparing a set of aliquots of the sample added with a fixed IS amount (0.24 μ g) and increasing amounts (μ g/kg) of analytes: 0–9.66 for pentanal, 0–84.78 for hexanal (only in sample LH), 0–7.16 for heptanal and 0–79.55 for pentane, as it is shown in linearity assays (Tab. 1). To avoid matrix effects, calibration curves were prepared in both kinds of samples. All experiments were carried out in triplicate.

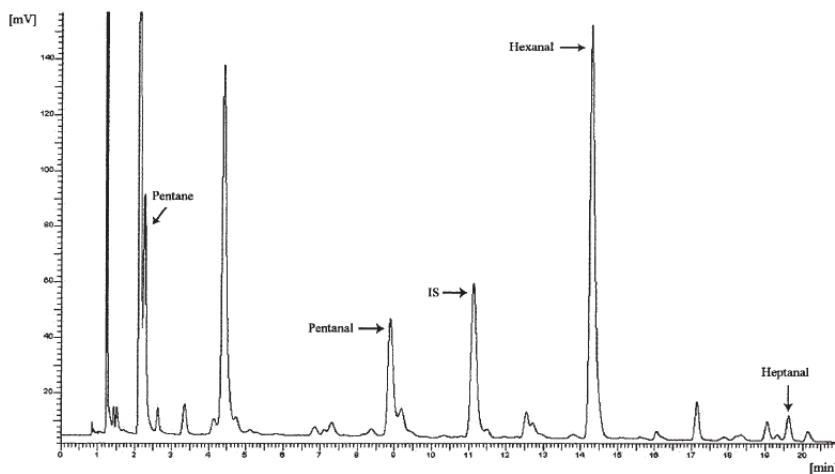


Fig. 1. Chromatogram of volatile compounds of LH infant food spiked with internal standard (IS), obtained by HS-SPME-GC-FID. Peaks corresponding to pentane and analyzed aldehydes (pentanal, hexanal and heptanal) are identified.

Tab. 1. SPME-GC determination of pentanal, hexanal, heptanal and pentane: Analytical parameters.

	Pentanal	Hexanal	Heptanal	Pentane
Detection limit [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0.04	0.91	0.02	1.05
Quantification limit [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0.14	3.03	0.07	3.50
Linearity [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0.04–9.66	0.9–84.78	0.02–7.16	1.05–79.55
LH	$y = 0.049x + 0.083$ $r = 0.997$	$y = 0.025x + 0.568$ $r = 0.999$	$y = 0.065x + 0.09$ $r = 0.994$	$y = 0.031x + 1.002$ $r = 0.990$
LF	$y = 0.154x + 0.398$ $r = 0.999$	–	$y = 0.237x + 0.433$ $r = 0.994$	$y = 0.026x + 0.671$ $r = 0.994$
Precision [RSD%] ($n = 3$)	LH 1.05 LF 2.09	2.87 –	2.69 1.82	3.46 2.34

LH, liquid infant food with honey; LF, liquid infant food with fruits; y , analyte area/IS area; x , analyte concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$ sample); r , linear least-squares correlation coefficient; RSD, relative standard deviation.

For pentane and hexanal, the quality of the method has been verified in a previous work [14]. The values of the analytical parameters (linearity, detection limits, and method precision) of all studied volatile compounds are reported in Tab. 1 (given that the slope of the curve varied with the type of sample, detection and precision were calculated using the worst-case scenario). The values reported indicated that the applied method is suitable for monitoring the evolution of the selected volatile compounds during storage.

2.4 GC-MS analysis

To confirm the presence of volatile compounds in the samples, a GC-MS analysis was carried out. Samples were treated as described in the HS-SPME procedure. Then, the SPME holder was inserted for 5 min (splitless mode for 1 min) into the injector (at 250 °C) of an Agilent 6890N gas chromatograph equipped with an Agilent 5973N mass-selective detector (Palo Alto, CA, USA). The stationary phase was a ZB-5ms capillary column

(5% polysilylene/95% polydimethylsiloxane; 30 m × 0.32 mm; 1 μm film thickness; Phenomenex, Torrance, CA, USA). The temperature program was the same as in GC-FID; the ion source temperature was 230 °C, and helium was the carrier gas operated at a constant flow of 3.1 mL/min. The mass spectrometer operated in the electron impact (EI) ionization mode at 70 eV, and mass spectral data were acquired in the mass range of 33–300 amu at 0.7 scans/s. This method is applied in scan and selected ion monitoring (SIM) as data acquisition modes, the ions chosen being 44 and 86 for pentanal, 56 and 72 for hexanal, 70 and 114 for heptanal and 57 and 72 for pentane. Identification of the compounds was carried out by comparing their spectra with those of the NIST 05 library.

In a previous work [14], the SPME-GC method was optimized for liquid infant foods and infant formulas. In the sample containing fruits (LF), hexanal, the presence of which was confirmed by SIM, co-eluted with another compound identified as ethylbutanoate. Therefore, under the analytical conditions applied in the study, hexanal cannot be quantified in sample LF. However, peaks corresponding to pentane, pentanal and heptanal could be clearly identified in LF and LH, and can be quantified in them by GC-FID.

2.5 Statistical analysis

A multifactor ANOVA was applied to the analyzed variables used as indicators of lipid oxidation [15].

For pentane, pentanal and heptanal, a three-factor design was applied; the factors were storage time (0, 1, 2, 4, 5, 7, 8 and 9 months), storage temperature (25, 30 and 37 °C), and the type of liquid infant food (LH and LF). For hexanal, a two-factor design (storage time and storage temperature) was applied. The interactions were evaluated. Tukey's test was applied to determine significant differences ($p < 0.05$).

A regression analysis was done to monitor the evolution of pentane, pentanal, hexanal and heptanal contents in the infant foods throughout storage, to evaluate the effects of storage temperature and type of sample (except in the case of hexanal).

"Qualitative type of sample" variables (dummy variables) were used to analyze the effect of the LF sample with respect to LH taken as reference [16].

The Statgraphics Plus version 3.1 (Rockville, MD, USA) statistical package was used throughout.

3 Results

The contents of volatile compounds indicative of lipid oxidation in the infant foods stored at 25, 30 and 37 °C are presented in Tab. 2. The results are expressed in μg/kg, as the mean value ± standard deviation of three aliquots of each sample. Throughout storage, there was an important decrease in pentanal, hexanal and heptanal contents, while in contrast the pentane contents increased.

The two-factor (storage time and storage temperature) ANOVA showed significant differences ($p < 0.05$) in hexanal content. Application of Tukey's test (Fig. 2) indicated that hexanal contents corresponding to months 0, 1 and 2 of storage differed among them and also from the rest of the storage months. During the first three storage months, the hexanal content decreased with increasing storage time, although from the fourth storage month onwards, no significant differences among different storage times were found.

Storage temperature exerted a significant effect on the decrease in hexanal content – the contents of the latter being lower at higher temperatures (37 °C < 30° < 25 °C).

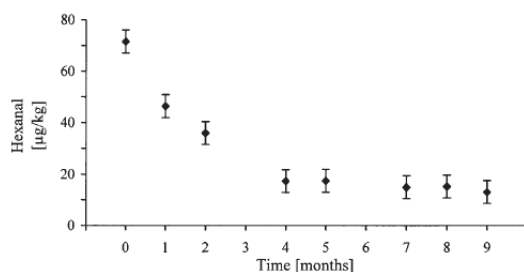


Fig. 2. Mean hexanal contents in LH liquid infant food at different storage times.

Tab. 2. Pentanal, hexanal, heptanal and pentane contents ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in LH and LF liquid infant foods at different storage times (expressed as average \pm standard deviation).

Storage month	LH			LF		
	Hexanal [$\mu\text{g}/\text{kg}$]					
0		71.5 \pm 2.0				–
	25 °C	30 °C	37 °C			
1	58.0 \pm 1.7	47.9 \pm 2.1	33.3 \pm 2.1			
2	44.2 \pm 2.7	35.3 \pm 2.5	28.3 \pm 2.6			
4	22.3 \pm 1.0	18.0 \pm 1.3	11.6 \pm 0.6			
5	25.3 \pm 0.4	16.0 \pm 1.4	11.0 \pm 0.5			
7	22.0 \pm 3.0	15.6 \pm 0.4	7.2 \pm 0.7			
8	22.9 \pm 2.1	13.6 \pm 0.8	9.1 \pm 0.5			
9	19.9 \pm 0.4	11.0 \pm 0.5	8.2 \pm 0.4			
	Pentanal [$\mu\text{g}/\text{kg}$]					
0		15.93 \pm 0.60			5.49 \pm 0.17	
	25 °C	30 °C	37 °C	25 °C	30 °C	37 °C
1	7.79 \pm 0.08	7.32 \pm 0.30	4.91 \pm 0.23	3.09 \pm 0.14	2.68 \pm 0.00	2.01 \pm 0.07
2	5.77 \pm 0.25	4.50 \pm 0.32	3.39 \pm 0.12	2.34 \pm 0.14	1.92 \pm 0.04	1.37 \pm 0.05
4	3.86 \pm 0.17	2.74 \pm 0.03	1.74 \pm 0.06	1.65 \pm 0.06	0.86 \pm 0.03	0.62 \pm 0.02
5	3.82 \pm 0.02	2.19 \pm 0.10	1.57 \pm 0.06	1.45 \pm 0.02	0.78 \pm 0.01	0.58 \pm 0.01
7	3.28 \pm 0.28	2.24 \pm 0.02	1.07 \pm 0.03	1.38 \pm 0.14	0.58 \pm 0.04	0.47 \pm 0.03
8	3.12 \pm 0.24	1.72 \pm 0.06	1.14 \pm 0.03	1.24 \pm 0.06	0.49 \pm 0.05	0.45 \pm 0.03
9	2.75 \pm 0.01	1.33 \pm 0.06	0.99 \pm 0.13	1.33 \pm 0.08	0.60 \pm 0.02	0.39 \pm 0.03
	Heptanal [$\mu\text{g}/\text{kg}$]					
0		1.81 \pm 0.11			0.56 \pm 0.02	
	25 °C	30 °C	37 °C	25 °C	30 °C	37 °C
1	1.44 \pm 0.08	1.17 \pm 0.08	0.90 \pm 0.07	0.48 \pm 0.03	0.44 \pm 0.02	0.36 \pm 0.02
2	1.17 \pm 0.09	1.00 \pm 0.08	0.85 \pm 0.08	0.40 \pm 0.04	0.37 \pm 0.01	0.29 \pm 0.01
4	0.61 \pm 0.04	0.51 \pm 0.01	0.37 \pm 0.02	0.33 \pm 0.03	0.14 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01
5	0.61 \pm 0.00	0.41 \pm 0.03	0.27 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01
7	0.57 \pm 0.02	0.44 \pm 0.03	0.23 \pm 0.01	0.22 \pm 0.00	0.15 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01
8	0.60 \pm 0.02	0.42 \pm 0.02	0.29 \pm 0.02	0.24 \pm 0.01	0.12 \pm 0.03	0.12 \pm 0.01
9	0.59 \pm 0.02	0.41 \pm 0.06	0.36 \pm 0.07	0.29 \pm 0.02	0.17 \pm 0.00	0.10 \pm 0.01
	Pentane [$\mu\text{g}/\text{kg}$]					
0		19.8 \pm 3.3			20.0 \pm 0.7	
	25 °C	30 °C	37 °C	25 °C	30 °C	37 °C
1	28.4 \pm 0.9	21.5 \pm 1.7	23.4 \pm 2.2	35.6 \pm 2.0	37.5 \pm 1.4	41.4 \pm 1.0
2	24.8 \pm 1.8	28.9 \pm 1.8	33.3 \pm 3.8	34.9 \pm 2.9	37.1 \pm 1.5	40.5 \pm 1.4
4	19.6 \pm 2.4	26.3 \pm 0.9	28.4 \pm 1.1	34.7 \pm 1.8	39.7 \pm 2.7	39.5 \pm 4.0
5	29.8 \pm 1.5	37.2 \pm 2.3	38.9 \pm 3.5	42.6 \pm 4.1	53.9 \pm 2.2	42.5 \pm 0.7
7	30.9 \pm 3.6	33.3 \pm 0.7	34.2 \pm 3.3	45.5 \pm 3.5	57.4 \pm 2.0	52.2 \pm 0.8
8	31.9 \pm 0.9	39.3 \pm 2.6	42.1 \pm 1.6	47.4 \pm 2.4	50.2 \pm 5.0	55.7 \pm 4.9
9	32.4 \pm 1.2	42.2 \pm 1.6	43.4 \pm 3.4	44.8 \pm 4.0	47.7 \pm 3.4	48.1 \pm 1.6

LH, liquid infant food with honey; LF, liquid infant food with fruits.

Regarding pentanal and heptanal, significant differences ($p < 0.05$) were found with respect to storage time and temperature and type of sample. Application of Tukey's test indicated that pentanal and heptanal (Fig. 3) contents corresponding to storage months 0, 1 and 2 differed from the rest, and both decreased with increasing storage time.

With regard to pentanal and heptanal interactions (ANOVA $p < 0.05$), the kind of sample and the time and temperature of storage influenced the pentanal content. In the case of heptanal, the behavior throughout storage depended on the temperature considered, and different results were obtained for both types of sample depending on the storage temperature but not on the storage time.

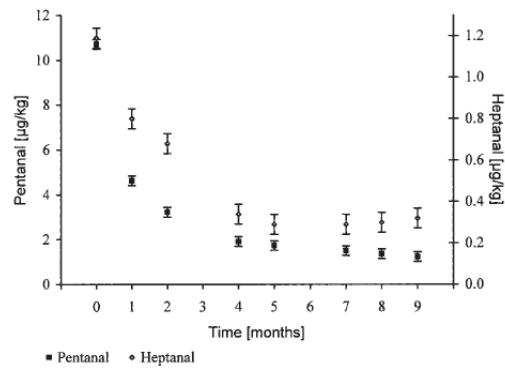


Fig. 3. Mean pentanal and heptanal contents in LH and LF liquid infant foods at different storage times.

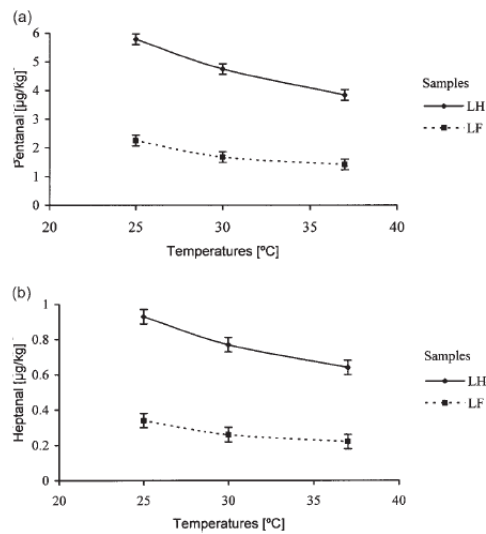


Fig. 4. Interactions between type of sample (LH = liquid infant food with honey, LF = liquid infant food with fruits) and storage temperatures. (a) Pentanal and (b) heptanal.

As shown in Fig. 4, pentanal and heptanal contents were lower in LF than in LH and, as in the case of hexanal, the contents were lower at high than at low storage temperatures.

In the case of pentane, the application of a three-factor ANOVA indicated significant differences ($p < 0.05$). Tukey's test showed that only samples stored at 25 °C

differed from the rest, having pentane contents lower than those stored at 30 and 37 °C. Regardless of the storage temperature, the LF samples had higher pentane contents than LH.

Pentane contents increased with storage time (Fig. 5) in three steps: The lowest pentane contents corresponded to just-manufactured samples (month 0), while pentane

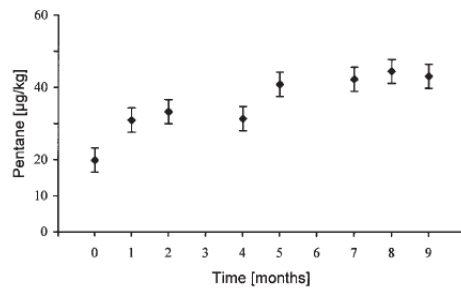


Fig. 5. Mean pentane contents of liquid infant foods at different sampling times.

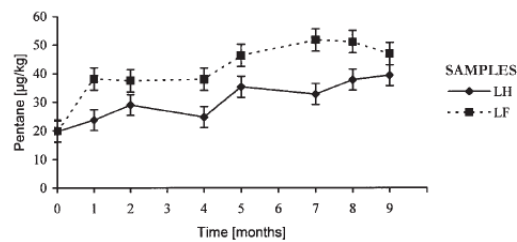


Fig. 6. Mean pentane contents in LH (liquid infant food with honey) and LF (liquid infant food with fruits).

contents were higher in samples stored for 1, 2 and 4 months (without differences among these time points), and were even higher during the following storage months (5, 7, 8 and 9) (likewise without differences among these months).

Interactions between the type of sample and storage time (ANOVA $p < 0.05$) were found (Fig. 6): The pentane contents in sample LF stood out in this sense, because they experienced a greater increase than LH in the first storage month.

The evolution of the analyzed volatile compound contents according to the storage variables (month and temperature) was adjusted to the models shown in Tab. 3. In the pentanal and heptanal equations, the effect of z (indicator-dummy variable) was negative, *i.e.* pentanal and heptanal contents were lower in LF than in LH. The opposite occurred in relation to pentane behavior. Considering a given storage time and temperature, the correlations obtained can provide information on the level of analyzed volatile compounds and the effects of storage.

A correlation between pentanal, heptanal and storage time was also noted in Tab. 3, which could be used to estimate the storage time of the infant food from the corresponding pentanal and heptanal contents.

4 Discussion

The highest aldehyde (pentanal, hexanal and heptanal) contents corresponded to just-manufactured samples (zero time). Consequently, the formation of these aldehydes can be mainly ascribed to thermal lipid degradation [2] as a consequence of the heating processes included in the manufacture of these infant foods.

The presence of honey in LH may partly contribute to the higher pentanal and heptanal contents of these foods at zero time, when compared to also just-manufactured LF. This is because, on the one hand, these aldehydes can be found in honey [17], and on the other hand, monosaccharide contents were higher in sample LH than in LF – and these monosaccharides would compete with aldehydes in the formation of Schiff bases.

Tab. 3. Correlations between volatile contents, storage variables and type of sample.

Analytes	Model	ρ	R^2
Pentanal	$y = 9.969 - 3.015z - 0.089 T \sqrt{t}$	0	0.721
Hexanal	$y = 65.186 - 0.624 T \sqrt{t}$	0	0.908
Heptanal	$y = 1.348 - 0.507z - 0.01 T \sqrt{t}$	0	0.798
Pentane	$y = 15.812 + 10.893z + 0.25 T \sqrt{t}$	0	0.829
Pentanal and heptanal	$\text{pentanal} = 1.143 + 6.84 \text{heptanal} - 0.765 \sqrt{t}$	0	0.920

y , analyte content ($\mu\text{g}/\text{kg}$); t , storage time (months); T , storage temperature ($^{\circ}\text{C}$); z , indicator (dummy) variable ($z = 0$ for sample LH, $z = 1$ for sample LF); R^2 , squared correlation coefficient.

The values obtained show that from zero time and until the fourth storage month, the aldehyde reduction rate depends on the length of the carbon chain: 82.2% for pentanal, 75.8% for hexanal and 71.4% for heptanal. The different reactivity according to the number of carbon atoms has been reported elsewhere [18]. From the fourth month onwards, pentanal, hexanal and heptanal contents do not vary significantly (Figs. 2, 3).

Throughout storage, no rancid odor of fats was detected. However, a conspicuous increase in the color of the infant foods with storage temperature and time was consistent with the development of the Maillard reaction as the main cause of aldehyde degradation in the analyzed samples [18, 19].

Changes in physical properties as a consequence of the interactions between oxidized lipids and proteins may also affect the organoleptic value of foods. These reactions are enhanced at water activities (a_w) in excess of 0.4 [20] – this being the case in our samples.

Oxidation did not seem to be the main cause of the aldehyde degradation during storage, because samples were packed in an inert atmosphere from manufacture until analysis.

In just-manufactured samples (zero time), no differences in pentane contents (mean: 19.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$) among samples were found. Pentane contents increased throughout storage (Fig. 5). Therefore, degradation of the lipid fraction initiated in the manufacturing process continues throughout storage. However, hydrocarbons (pentane) are more stable than aldehydes [13], and pentane steadily accumulates during the considered storage period.

The increase in pentane content throughout storage underscores the oxidation of linoleic acid in the samples, which would also produce volatile aldehydes [2]; however, the sample evolution shows that the aldehyde disappearance rate exceeds the rate of aldehyde formation due to lipid oxidation.

Pentane formation is favored by the increase in storage temperature, and its presence is greater in LF samples

(Fig. 6). This fact could be attributed to a more effective prevention of lipid oxidation by honey, in LH, compared to dehydrated fruits, in LF [21].

A review of the literature shows that several studies have evaluated the evolution of volatile compounds contents as a consequence of oxidation of the lipid fraction in different foodstuffs.

Increases in volatile aldehyde contents in milk exposed to different types and intensities of light have been reported [6, 22, 23], but comparison with the results of the present study was not possible because of the differences in the origin of the lipid fraction; the analyzed samples had greater linoleic acid contents than milk and also contained cereals, thus yielding a more complex matrix.

A general increase in volatile compound contents in UHT milk, as a consequence of thermal treatment – with differences according to the severity of such treatment and the compound considered (pentanal, hexanal and heptanal) – and also a decrease throughout storage (90 days at room temperature), have been reported [24]. However, increases in aldehydes in UHT milk during storage have also been reported [25].

With regard to studies on the evolution of volatile compounds during milk-based infant foods storage, only studies on powdered milk-based infant formulas (IF) have been found in the reviewed literature. In a study on the effect of antioxidant addition to stored IF [7], hexanal, pentanal and heptanal were detected, but only hexanal contents were reported. Hexanal contents ranged from 1181 to 3430 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (after 3 weeks of storage), and from 466 to 1022 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (after 4 weeks of storage) in IF without and with added antioxidants. In another study [5], the amounts of propanal, pentanal and hexanal detected in IF just manufactured and stored for 4 weeks were as follows: 1440, 1510 and 4660 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in just-manufactured IF, and 5630, 8970 and 39,840 $\mu\text{g}/\text{kg}$ after 4 weeks of storage, respectively. In both studies, the principal product of fat oxidation seen to increase during storage was hexanal.

In the present study, hexanal was also the most abundant volatile compound, followed by pentanal and heptanal – although the contents of these aldehydes decrease as the storage time increases. Despite the similarity in fatty acid composition between the milk-based IF and the samples analyzed in the present study, they differ in their physical state; in effect, IF were powdered while the analyzed milk-cereal-based infant foods were liquid; the lower a_w in IF favors lipid oxidation. In the liquid infant foods, a_w does not allow important development of lipid oxidation, which can be monitored through pentane formation. In addition, some products of nonenzymatic browning with anti-oxidant activity can affect lipid oxidation [26].

The results obtained show that pentane is a good indicator of lipid oxidation in the analyzed liquid infant foods, and can be used to monitor the stability of their lipid fraction. On the other hand, the degree of oxidation of these products during their shelf life is low, and in any case the lipid fraction is more stable than that in powdered IF.

Acknowledgments

Thanks are due to Hero España S.A. for providing the samples, and for financial support for this study. Thanks are also due to the Generalitat Valenciana for the financial support (03/003) given to the Bionutest group.

References

- [1] J. I. Gray, F. J. Monahan: Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trends Food Sci Technol.* 1992, **3**, 315–319.
- [2] E. N. Frankel: Volatile lipid oxidation products. *Prog Lipid Res.* 1982, **22**, 1–33.
- [3] H. Esterbauer: Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr.* 1993, **57**, 779S–785S.
- [4] H. Stapelfeldt, G. Mortensen, L. H. Skibsted: Early events in oxidation of whole milk powder detected by electron spin resonance spectrometry. Carry-over effects from butter oil used for instantization. *Milchwissenschaft.* 1997, **52**, 266–269.
- [5] M. Romeu-Nadal, A. I. Castellote, M. C. López-Sabater: Headspace gas chromatographic method for determining volatile compounds in infant formulas. *J Chromatogr A.* 2004, **1046**, 235–239.
- [6] R. T. Marsili: Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *J Chromatogr Sci.* 1999, **37**, 17–23.
- [7] F. Fenaille, P. Visani, R. Fumeaux, C. Milo, P. A. Guy: Comparison of mass spectrometry-based electronic nose and solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry technique to assess infant formula oxidation. *J Agric Food Chem.* 2003, **51**, 2790–2796.
- [8] R. G. Buttery, J. G. Turnbaugh, L. C. Ling: Contribution of volatiles to rice aroma. *J Agric Food Chem.* 1988, **36**, 1006–1009.
- [9] J. Pokorný, N. T. Luân, S. S. Kondratenko, G. Janicek: Changes of sensory value by interaction of alkanals with amino acids and proteins. *Nahrung.* 1976, **20**, 267–272.
- [10] N. Fischer, S. Widder: How proteins influence food flavor. *Food Technol.* 1997, **51**, 68–70.
- [11] R. Zamora, F. J. Hidalgo: Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to nonenzymatic food browning. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005, **45**, 49–59.
- [12] S. T. Michalsky, E. G. Hammond: Use of labeled compounds to study mechanism of flavor formation in oxidizing fats. *J Am Oil Chem.* 1972, **49**, 563–566.
- [13] J. Löfger: Headspace gas analysis of volatile hydrocarbons as a tool for the determination of the state of oxidation of foods stored in sealed containers. *J Sci Food Agric.* 1990, **52**, 119–128.
- [14] G. Garcia-Llatas, M. J. Lagarda, F. Romero, P. Abellán, R. Farré: A headspace solid-phase microextraction method of use in monitoring hexanal and pentane during storage. Application to liquid infant foods and powdered infant formulas. *Food Chem.* 2006, **101**, 1078–1086.
- [15] D. C. Montgomery: *Diseño y Análisis de Experimentos*. Limusa-Wiley, Mexico DF (Mexico) 2002.
- [16] D. C. Montgomery, E. A. Peck: *Introduction to Linear Regression Analysis*. John Wiley & Sons, New York, NY (USA) 1992.
- [17] B. S. Radovic, M. Careri, A. Mangia, M. Musci, M. Gerboles, E. Anklam: Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chem.* 2001, **72**, 511–520.
- [18] J. Pokorný, H. Svobodová, G. Janicek: Reaction of lower alkanals with proteins. Correlation of flavour changes and nonenzymic browning during storage of model systems. *Sb Vys Sk Chem Tech.* 1977, **E49**, 5–21.
- [19] J. Pokorny: Browning from lipid-protein interactions. *Prog Food Nutr.* 1981, **5**, 421–428.
- [20] J. Pokorný, E. Novotná-Morávková, H. Alexcová, J. Davídek: Oxidation of polyunsaturated lipids in presence of nonlipidic components. In: *Proceedings of the 16th ISF Congress, Budapest, Hungary 4–7 October 1983*. Ed. J. Hollo, Elsevier, New York, NY (USA) 1983.
- [21] X. H. Wang, N. Gheldof, N. J. Engeseth: Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *J Food Sci.* 2004, **69**, C96–C101.
- [22] H. Y. Chung, J. Partridge, B. Harte: Discrimination of light oxidized off-flavors in milk and cheddar cheese using solid-phase microextraction-gas chromatography and the olfactory sensing technique. *Proceedings of the 13th IAPPI Conference on Packaging*. E. Lansing, MI (USA) 2002.
- [23] M. van Aardt, S. E. Duncan, J. E. Marcy, T. E. Long, S. F. O'Keefe, S. R. Nielsen-Sims: Aroma analysis of light-exposed milk stored with and without natural and synthetic antioxidants. *J Dairy Sci.* 2005, **88**, 881–890.
- [24] G. Contarini, M. Povolò, R. Leardi, P. M. Toppino: Influence of heat treatment on the volatile compounds of milk. *J Agric Food Chem.* 1997, **45**, 3171–3177.
- [25] J. J. Jeon, E. L. Thomas, G. A. Reineccius: Production of volatile flavor compounds in ultrahigh-temperature processed milk during aseptic storage. *J Agric Food Chem.* 1978, **26**, 1183–1188.
- [26] I. Ahmad, M. Alaiz, R. Zamora, F. J. Hidalgo: Effect of oxidized lipid/amino acid reaction products on the antioxidative activity of common antioxidants. *J Agric Food Chem.* 1998, **46**, 3768–3771.

[Received: June 27, 2006; accepted: August 29, 2006]

Available online at www.sciencedirect.com

Food Chemistry 101 (2006) 1078–1086

Food
Chemistrywww.elsevier.com/locate/foodchem

A headspace solid-phase microextraction method of use in monitoring hexanal and pentane during storage: Application to liquid infant foods and powdered infant formulas

Guadalupe García-Llatas^a, María Jesús Lagarda^a, Fernando Romero^b,
Pedro Abellán^b, Rosaura Farré^{a,*}

^a Faculty of Pharmacy, Nutrition and Food Chemistry, University of Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Spain

^b Hero España S.A., Quality and Development Department, Avda. Murcia, Alcantarilla, Murcia, Spain

Received 25 October 2005; received in revised form 20 February 2006; accepted 4 March 2006

Abstract

The determination of two secondary lipid oxidation compounds (hexanal and pentane) in liquid infant foods using a headspace solid-phase microextraction gas chromatographic (HS-SPME-GC) method has been developed and validated.

The HS-SPME analytical conditions (fibre position, equilibration and sampling times) were selected. The analytical parameters of the method (linearity: hexanal from 2.48 to 84.78 ng/g, pentane from 6.21 to 79.55 ng/g; precision: hexanal – 2.87%, pentane – 2.34–3.46%; recovery: hexanal – 106.60%, pentane – 95.39%; detection limit: hexanal – 3.63 ng and pentane – 4.2 ng) demonstrate the usefulness of the method.

Once optimized, the method was applied to liquid infant foods based on milk and cereals, and to powdered adapted and follow-up milk-based infant formulas (IF), stored for four and seven months. In all cases the hexanal content was higher in IF than in milk-cereal based infant foods. No pentane was found in IF.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Hexanal; Pentane; Liquid infant foods; HS-SPME-GC determination; Lipid oxidation

1. Introduction

Oxidative degradation due to auto oxidation of polyunsaturated fatty acids, present in variable amounts in most foods, is one of the well recognized factors that may limit the shelf-life of lipid containing foods, due to the loss of food quality through flavour deterioration, a decrease in nutritional value and the generation of potentially toxic substances that can have a significant impact on food safety (Fenaille, Visani, Fumeaux, Milo, & Guy, 2003; Goodridge, Beaudry, Pestka, & Smith, 2003; Park & Goins, 1992; Sanches-Silva, Rodríguez-Bernaldo de Quirós, López-Hernández, & Paseiro-Losada, 2004). Indi-

cators of lipid oxidation state are therefore of great interest for controlling the quality of fat-containing products.

The primary oxidation products for unsaturated fatty acids are the hydroperoxides – highly reactive compounds that decompose rapidly, yielding a complex mixture of non-volatile and volatile compounds such as hydrocarbons (ethane, pentane), aldehydes (pentanal, hexanal, hexenal, 2-octenal, 2-nonenal) and ketones, which affect the overall quality of the product. Aldehydes are particularly important in relation to flavour alteration and from a toxicological perspective (Frankel, 1980, 1982, 1993).

The lipid fraction of infant foods contains a relatively large amount of unsaturated fatty acids, together with non-negligible amounts of minerals, including iron, can enhance lipid oxidation. Linoleic acid is abundant in infant products fat, and yields 9- and 13-hydroperoxide that decomposes to produce pentane and hexanal, among

* Corresponding author. Tel.: +34 963 544 950; fax: +34 963 544 954.
E-mail address: rosaura.farre@uv.es (R. Farré).

others, as secondary oxidation volatile compounds (Frankel, Neff, & Weisleder, 1982).

Extended storage, without daylight, of infant formulas resulted in high concentrations of propanal, pentanal, hexanal, heptanal and nonanal (Romeu-Nadal, Castellote, & López-Sabater, 2004; Ulberth & Roubicek, 1995). However, the major product of fat oxidation that increases in content during storage is hexanal. This has become a known indicator of fat oxidation (Brunton, Cronin, Monahan, & Durcan, 2000). Hexanal content is directly related to oxidative off-flavours, and the compound is easily detected because of its low odour threshold (5 ppb) (Buttery, Turnbaugh, & Ling, 1988). However, hexanal has the potential to react further, and it is not always possible to measure the compound directly.

Pentane content can also increase during storage as a consequence of oxidative lipid degradation, and this compound has also been proposed as an indicator of fat oxidation. Pentane content correlates very well to sensory evaluation, and it is useful for monitoring the oxidation of fats during storage. Compared to hexanal, pentane offers the advantage of being inert and stable under adequate storage conditions (Löfliger, 1990).

Different methods have been proposed for determining the volatile compounds originated during lipid oxidation. Although direct injection of the lipid fraction into a gas chromatograph (GC) has been used (Dupuy et al., 1985; Snyder, Frankel, Selke, & Warner, 1988), different sampling techniques have been described to isolate and concentrate volatile compounds prior to GC injection – including solid phase extraction (SPE), simultaneous steam distillation, liquid extraction and headspace (HS) analysis. Headspace analysis, alone or combined with SPE, remains a widely used procedure, because it requires only minimal sample treatment – thereby reducing artifactual volatile compound formation. Different approaches have been described, such as static headspace gas chromatography (SHGC) and dynamic headspace gas chromatography (DHGC). In this context, a SHGC method has recently been developed for determining volatile compounds in infant formulas (Romeu-Nadal et al., 2004).

Solid-phase microextraction (SPME) makes use of a fibre that adsorbs analytes from samples. Usually, equilibrium between the matrix and the stationary phase coating the fibre is reached. SPME integrates sampling, extraction, concentration, and sample introduction to GC. It offers high through-put performance and does not require extended sample preparations – thus resulting in time savings. Moreover, it is reproducible, simple and effective, and eliminates much interference from the sample matrix, with improvement in selectivity of the analysis. In addition, the technique is inexpensive, and avoids the use of solvents for extraction (Arthur & Pawliszyn, 1990; Zhang, Yang, & Pawliszyn, 1994).

Techniques combining HS with SPME (HS-SPME) have been used to study the volatile profiles of different foods and drinks (Gianelli, Flores, & Toldrá, 2002; Doles-

hall, Recseg, Kemény, & Kővári, 2003; Jelen, Wlazly, Wasowicz, & Kaminsky, 1998), including the identification of saturated aldehydes as the main volatile agents present in the headspace of infant milk powders (Fenaille et al., 2003; Przygowski, 2003). The stationary phase coating the fibre and the extraction conditions must be selected for each specific analyte and type of sample (Marsili, 1999; Vichi, Pizzale, Conte, Buxaderas, & López-Tamames, 2003).

Liquid, ready-to-eat, cereal and milk based infant foods recently have been marketed, and it is of interest to monitor the stability of their lipid fraction over time.

The present study develops and validates an HS-SPME-GC method for determining pentane and hexanal in liquid milk-cereal based infant foods, that is useful in monitoring the stability of the lipid fraction during storage of the products. The possibility of applying it to different milk powdered infant formulas (IF) is also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Taking into account that hexanal and pentane can be formed during storage as a consequence of lipid oxidation, and with the purpose of assessing the usefulness of the method set up for determining hexanal and pentane in infant foods, the following samples were collected:

- Two liquid infant foods (LH and LF) based on milk (88%) and cereals (8.8%) with 2.6% (w/w) fat (3.1 g/100 ml) and differing in a minor ingredient: LH contained honey (0.9%) and LF fruits (1.1%). These products were supplied by the manufacturer (Hero España S.A.), and were analyzed after 4 and 7 storage months.
- Four powdered infant formulas (IF): two adapted (A and Alc) (the latter containing fish oil to provide long chain polyunsaturated fatty acids) and two follow-up formulas (Fa and Fb) were used. From each IF two samples corresponding to two different manufacturing batches and storage times (4 and 7 storage months) were sampled. The fat contents (w/w) of the IF were: A (29%); Alc (27.5%); Fa and Fb (25%).

All the products were maintained in their original sealed containers in an atmosphere free of air until analysis.

The fatty acid profiles of the samples, determined by GC-FID as fatty acid methyl ester (FAME) and applying the conditions previously reported (Lagarda, Máñez, Mangano, & Farré, 2003), are presented in Table 1. The composition in fatty acids is given as percentages of the total fatty acid content.

2.2. Reagents

Hexanal (Sigma; Steinheim, Germany); methanol p.a. (Merck; Darmstadt, Germany); pentane (Aldrich;

Table 1
Fatty acid profile of the samples expressed as percentage of total fatty acids (mean values \pm standard deviation)

Fatty acids	Samples				
	LH and LF	A	Alc	Fa	Fb
Caproic	0.08 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.21 \pm 0.09	0.03 \pm 0.05	0.09 \pm 0.02
Caprylic	0.92 \pm 0.05	1.25 \pm 0.15	0.95 \pm 0.31	1.04 \pm 0.10	1.07 \pm 0.16
Capric	0.82 \pm 0.02	1.08 \pm 0.05	1.37 \pm 0.08	0.99 \pm 0.17	1.32 \pm 0.20
Lauric	8.11 \pm 0.51	9.98 \pm 0.57	10.15 \pm 1.72	10.43 \pm 0.38	11.09 \pm 0.89
Myristic	4.52 \pm 0.10	4.74 \pm 0.10	5.88 \pm 0.23	4.87 \pm 0.02	5.06 \pm 0.10
Palmitic	19.00 \pm 0.05	20.94 \pm 0.15	22.58 \pm 0.30	21.96 \pm 0.22	20.41 \pm 0.12
Palmitoleic	0.11 \pm 0.00	0.12 \pm 0.01	0.40 \pm 0.04	0.15 \pm 0.04	0.15 \pm 0.01
Stearic	4.05 \pm 0.11	4.35 \pm 0.42	5.76 \pm 0.39	4.49 \pm 0.15	4.35 \pm 0.38
Oleic	40.33 \pm 0.39	40.04 \pm 0.70	36.49 \pm 1.16	39.54 \pm 0.63	39.04 \pm 0.75
Linoleic	18.58 \pm 0.18	15.07 \pm 0.25	13.42 \pm 0.38	13.69 \pm 0.14	14.97 \pm 0.33
Arachidic	0.28 \pm 0.00	0.32 \pm 0.01	0.29 \pm 0.02	0.32 \pm 0.02	0.33 \pm 0.01
γ -Linolenic	0.09 \pm 0.01	0.13 \pm 0.00	0.12 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01
α -Linolenic	1.19 \pm 0.01	0.91 \pm 0.04	0.85 \pm 0.03	0.91 \pm 0.01	0.97 \pm 0.03
Behenic	0.35 \pm 0.01	0.31 \pm 0.00	0.29 \pm 0.02	0.30 \pm 0.02	0.33 \pm 0.01
Arachidonic	n.d.	n.d.	0.09 \pm 0.01	n.d.	n.d.
EPA	0.14 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01
DHA	n.d.	n.d.	0.20 \pm 0.01	n.d.	n.d.

LH, liquid infant food with honey; LF, liquid infant food with fruits; A, adapted infant formula; Alc, adapted infant formula with long chain polyunsaturated fatty acids added; Fa and Fb, follow-up infant formulas; EPA, *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid; DHA, *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid; n.d., not detectable.

Steinheim, Germany); 4-methyl-2-pentanone (MIBK) used as internal standard (IS) (Fluka; Buchs, Switzerland); Millipore MilliQ deionised water (Millipore Ibérica S.A., Barcelona, Spain).

2.3. HS-SPME procedure

Approximately 4 g of sample (liquid infant food) and a micro-stirring bar (length 12 mm; \varnothing 4 mm; Bibby; Staffordshire, UK) were introduced in a 10-ml headspace amber glass vial (height 45 mm; \varnothing 20 mm) that was immediately crimped with an aluminium seal containing a silicone-lined/PTFE septum (both from Supelco; Bellefonte, PA). Three μ l of a methanol solution containing 80 μ g MIBK/ml was added through the septum with a 10- μ l syringe (SGE; Ringwood, Australia). MIBK was the IS used with the same SPME fibre by Marsili (1999) in the analysis of whole and skimmed milk – a matrix constituting the main ingredient in our samples.

To keep the temperature (37 °C) constant during analysis, the vials were maintained in a water bath on a stirring-heating plate (IKA; Staufen, Germany) and stirred at high speed during the equilibration and extraction periods, to achieve faster equilibrium. A temperature of 37 °C was selected, because higher temperatures could alter the matrix composition and promote hydroperoxide decomposition, while temperatures below 37 °C would not favour analyte release to the headspace and could not prevent variations in the conditions of the assay related to changes in the temperature of the laboratory (Frankel, Hu, & Tapel, 1989; Robards, Kerr, Patsalides, & Korth, 1988).

At the end of the equilibration period, a conditioned (2 h at 300 °C) 85 μ m CarboxenTM/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) StableFlexTM fibre (Supelco; Bellefonte,

PA) was exposed to the headspace of the sample for analyte extraction – adjusting the SPME holder assembly to 1.0 scale units to ensure that the fibre was identically positioned from run to run. The CAR/PDMS fibre is especially sensitive to small molecules, and was selected on the basis of the specifications of the SPME manufacturer and literature reports on hexanal determination (Chung, Partridge, & Harte, 2002; Doleschall, Kemény, Recseg, & Kovári, 2001; Marsili, 1999; Marsili, 2000; Vichi et al., 2003). Following adsorption, the fibre was immediately thermally desorbed in the GC injector at 250 °C for 5 min (splitless mode for 1 min), to prevent carry-over from run to run.

2.4. Gas chromatographic-flame ionization detector (GC-FID) conditions

An Autosystem XLTM Perkin–Elmer GC (Norwalk, CT) equipped with a FID and an Equity 5TM 5% diphenyl/95% dimethylsiloxane capillary column (30 m \times 0.53 mm; 5 μ m film thickness; Supelco; Bellefonte, PA) was used. As the diameter of the injection liner used can affect peak width, especially for early-eluting compounds (Yang & Peppard, 1994), a narrow 1-mm i.d. direct liner (Supelco; Bellefonte, PA) was used. The chromatographic conditions were previously selected: hydrogen was the carrier gas, at a flow rate of 2.1 ml/min; the temperature of the oven was initially 40 °C for 5 min, and was increased to 100 °C at a rate of 4 °C/min, then to 220 °C at 17 °C/min, and finally held at 220 °C for 10 min – yielding a total run time of 37 min. The FID temperature was 300 °C. The response was monitored with TotalchromTM workstation software (Perkin–Elmer; Norwalk, CT).

Carry over and peaks originating from the fibre were regularly assessed by running blank samples (water).

2.5. Gas chromatographic–mass spectrometry (GC–MS) conditions

To confirm the presence of pentane and hexanal in the samples a GC–MS analysis was carried out. Samples were treated as described in the HS–SPME procedure. The SPME holder was adjusted at 3 scale units and inserted for 5 min (splitless mode for 1 min) into the injector (at 250 °C) of an Agilent 6890 N GC equipped with an Agilent 5973N mass-selective detector (Palo Alto, CA). The stationary phase was a ZB-5 ms capillary column (5% polysilylene/95% polydimethylsiloxane; 30 m × 0.32 mm; 1 µm film thickness; Phenomenex®; Torrance, CA). The temperature program was the same that in GC–FID; the ion source temperature was 230 °C; and helium was the carrier gas operated at a constant flow of 3.1 ml/min. The mass spectrometer operated in the electron impact (EI) ionization mode at 70 eV, and mass spectral data were acquired in the mass range of 29–300 amu. Scan and selected ion monitoring (SIM) were used as data acquisition mode, the ions chosen being 56 and 72 for hexanal and 57 and 72 for pentane. Identification of the compounds was carried out by comparing their spectra with those of the Wiley library.

2.6. Application

The method was applied to the infant foods described in the sample section. Samples were in their fourth and seventh storage months. Powdered samples were reconstituted at 0.5% (w/v) with Millipore MilliQ deionised water for analysis.

3. Results and discussion

3.1. Method optimization

Specificity, sensitivity and time required for the analysis were the factors taken into account in selecting the analytical conditions (fibre position and equilibration and sampling times) for hexanal and pentane determination in liquid infant foods. In the optimization of the method a LH sample was used.

3.1.1. Fibre position in the GC injection port

The fibre was exposed for 45 min to the headspace of a spiked sample (41.72 ng hexanal/ml) previously equilibrated for 15 min at 37 °C, and then inserted in the injection port for 5 min at different positions (4, 4.2 and 4.4 scale units) of the SPME holder, with running of the GC oven program.

Following initial desorption, the fibre was desorbed a second time, since analyte carry-over affects quantitation and requires additional desorptions before the next sampling is carried out. The value of the second desorption was used to estimate the percentage of hexanal desorption (%D) corresponding to the first injection, which was calculated as follows: $%D = (A_1 \times 100) / (A_1 + A_2)$, where

A_1 = hexanal area in the first desorption, and A_2 = hexanal area in the second desorption. The values obtained were 98.5, 98.8 and 99.0 for fibre positions of 4.0, 4.2 and 4.4, respectively. The 4.4 position yielding the highest desorption percentage was selected, though the differences among the three positions were small.

The 4.4 position was also assayed for pentane with a spiked sample (46.98 ng pentane/ml), and obtaining 99.71% desorption.

3.1.2. Equilibration time

Sample (LH) was equilibrated at 37 °C for 2, 5, 10, 15, 30 and 60 min. To improve estimates of the experimental value, assays were performed in duplicate.

After equilibration, the headspace was extracted for 30 min (37 °C) with the fibre, which was inserted in the GC injector and analyzed as reported before. The ratio between the chromatographic areas corresponding to the analytes and IS (relative areas), obtained for the assayed equilibration times, are represented in Fig. 1. The increments in relative area indicate that equilibrium between headspace and sample was reached at 30 min for both hexanal and pentane (see Fig. 1). However, in the case of hexanal, differences in the area ratio between 15 and 30 min were small (0.02); with 15 min of equilibration time the ratio of the areas was 92.9% of the value obtained with 30 min of equilibration – reproducibility being the same, with similar relative standard deviations (RSD) of 3.8% and 3.6% at 15 and 30 min, respectively. The small difference in sensitivity, together with the reduction in the time needed for analysis, justified the choice of the time (15 min) for equilibration.

It should be noted that quantitative analysis by SPME is feasible in non-equilibrium situations when the agitation conditions and adsorption time are held constant. A much shorter sampling time can be used for quantitative analysis provided sensitivity is not the main concern (Ai, 1997).

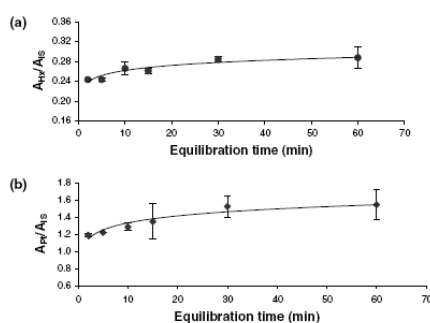


Fig. 1. Equilibration time: obtained after 30 min sampling at 37 °C. (a) Hexanal: relative areas (hexanal (A_{Hex})/internal standard (A_{IS})) and (b) pentane: relative areas (pentane (A_{Pen})/ A_{IS}). Average \pm standard deviation.

3.1.3. Sampling time

The SPME fibre was exposed for different times (5, 15, 30, 45 and 60 min) to the headspace above an already equilibrated sample (15 min at 37 °C). The assays were carried out in duplicate. After the exposure time, the compounds adsorbed by the fibre were desorbed in the GC injector. Fig. 2 shows the absolute and relative (analyte/IS) areas of both analytes.

An increase was observed in the areas corresponding to hexanal with increasing extraction time (see Fig. 2a). However, when the areas were related to the IS, similar responses were obtained for all times assayed (Fig. 2b).

In the case of pentane, the increase in absolute areas was more pronounced with the shorter (5 and 15 min) than with the longer assayed times (see Fig. 2c). However, differences between pentane and IS in affinity for the fibre explain the behaviour of the pentane/IS area ratio (Fig. 2d). Given that a better reproducibility of the values was obtained with a 45 min sampling time (RSD = 0.9%) than with lower values at 30 min (RSD = 9.2%), a 45 min extraction time was selected for both hexanal and pentane – taking into account that for pentane a better reproducibility in the response was obtained than with lower sampling times.

The times selected (15 min for equilibration and 45 min for sampling) allow the entire analysis to be completed in 1.5 h (15 min equilibration plus 45 min extraction plus 30 min of GC analysis).

The chromatograms, corresponding to pentane and hexanal from two liquid cereal-milk based infant foods (LH and LF) and a powdered adapted milk IF (A) obtained under the mentioned assay conditions are reported in Fig. 3. The peaks of pentane and hexanal were identified by comparing their retention times to those of the standards and also by GC–MS analysis.

The sample containing fruits (LF) contained a greater number of volatile compounds than those containing honey (LH). In the first (LF) hexanal, which presence was confirmed by SIM, co-eluted with another compound identified as ethylbutanoate. It was not possible to improve the resolution of these peaks, because in columns of the polarity used, the Kovats indexes of hexanal and ethylbutanoate are very similar (802 and 804, respectively) (Adams, 2001). Therefore, under the analytical conditions applied in the present study, hexanal cannot be used as indicator of lipid oxidation in sample LF. In contrast, peak corresponding to pentane could be quantified and, thus, be used to monitor lipid oxidation in it. On the same basis, hexanal and pentane contents can be quantified in sample LH.

3.2. Validation of the SPME-GC method

Once the conditions were optimized, the analytical parameters of the method were determined to validate the usefulness of the SPME-GC method for hexanal and pentane determination in stored liquid cereal-based infant foods.

3.2.1. Linearity

MIBK was used as IS in the quantification. Calibration curves were obtained with a set of aliquots of liquid infant foods (LH) and (LF) added with increasing amounts of hexanal and pentane and a fixed amount of IS (240 ng). Regression equations and correlation coefficients are reported in Table 2.

3.2.2. Detection and quantification limits – sensitivity

The detection and quantification limits of hexanal and pentane, estimated in accordance with American Chemical

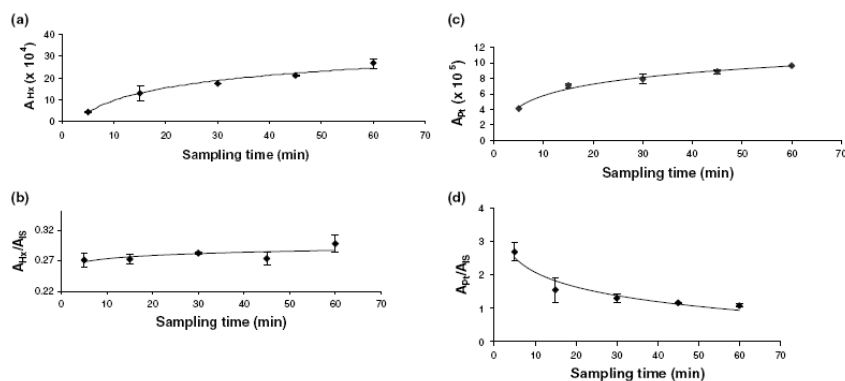


Fig. 2. Sampling time: obtained after 15 min equilibration at 37 °C. Hexanal: (a) absolute areas (A_{Hx}), (b) relative areas ($A_{Hx}/$ internal standard (A_{IS})); pentane: (c) absolute areas (A_{Pn}) and (d) relative areas (A_{Pn}/A_{IS}). Average \pm standard deviation.

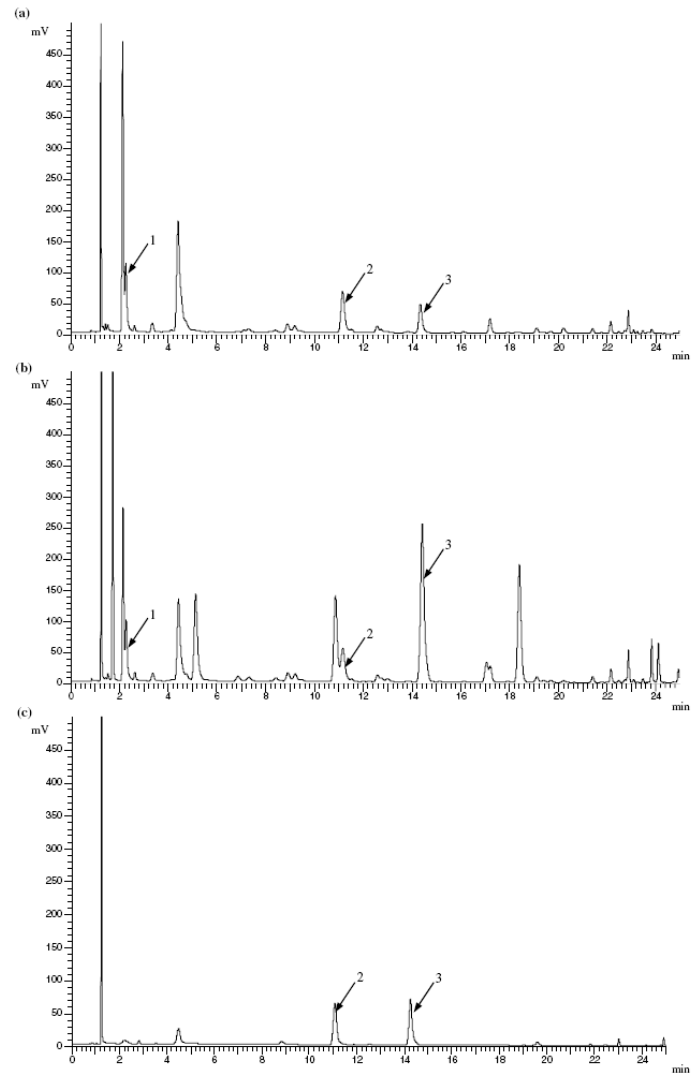


Fig. 3. Hexanal and pentane by HS-SPME-GC-FID: chromatograms of liquid infant foods (a) LH, (b) LF and (c) powdered adapted infant formula A, spiked with internal standard (IS). Peaks numbered correspond to 1, pentane; 2, IS; and 3, hexanal. In chromatogram (b), hexanal (peak 3) coelute with ethylbutanoate.

Society guidelines (1980) (defined as signal 3 and 10 times the height of the noise level respectively) are reported in Table 3.

The detection limit (3.6 ng) obtained for hexanal was lower than the value (19.6 ng) reported for infant formulas by Romeu-Nadal et al. (2004) using a headspace gas chromatographic method, and similar to the limit obtained by Sanches-Silva et al. (2004) for potato crisps using a HS-SPME-GC-MS method. No values corresponding to the detection limit for pentane in infant formulas or paps have been reported.

3.2.3. Precision

Repeatability expressed as the RSD (relative standard deviation) of relative peak areas of three replicates (4 ml of liquid infant food) was lower for hexanal (2.87%) than for pentane (3.46%) in LH sample – with a better RSD obtained for pentane (2.34%) in LF sample.

Similar values have been reported for hexanal by Romeu-Nadal et al. (2004) (2.29%), while Sanches-Silva et al. (2004) documented higher values (7.56%).

3.2.4. Accuracy

Accuracy was estimated by recovery assays. In the case of hexanal, 5 aliquots of LH sample were spiked with an amount of hexanal (20 ng hexanal/g) equivalent to the hexanal content of the analyzed sample after eight months of storage. The recovery percentage of pentane was obtained by spiking four aliquots of the sample (stored for 5 months) with an amount of pentane (25 ng/g) corresponding to their content. Recovery percentages of 106.6% and 95.39% were obtained for hexanal and pentane, respectively.

3.3. Application

Hexanal and/or pentane contents in the analyzed liquid infant foods and powdered IF, stored for four and seven months, are shown in Table 4.

Milk based powdered IF were reconstituted at 0.5% (w/v) for analysis, and 4 ml of the resulting liquid/solution was introduced in the 10-ml headspace amber glass vials, together with 240 ng of IS. In these samples no pentane was detected, even when IF were reconstituted at 4% w/v. On the other hand, no matrix interferences were detected by the standards additions method; thus, in IF aqueous calibration curves with IS were used for hexanal quantification. The regression equation for hexanal (120–417.2 ng) was: $y = 0.0102x - 0.3264$, $r = 0.9989$; where: y = hexanal area/IS area, x = hexanal content (ng), and r = correlation coefficient.

In IF samples, the hexanal contents (see Table 4) are given as ng/g powdered formula and also as ng/ml of the ready to eat reconstituted formula (13%, w/v) (see Table 4), to allow comparison between the hexanal contents in IF and in cereal-milk based infant foods.

The values obtained show that in all cases, the hexanal content in IF was higher than in milk-cereal based infant foods. In the latter (milk-cereal based infant foods) with a higher water activity (a_w) and lower fat content than IF, the presence of pentane and hexanal in similar and relatively low amounts could be explained by the homolytic scission of hydroperoxides yielding hexanal and pentane (Frankel, 1991). In contrast, in IF the low a_w and a fat content of 25% (w/w) favour oxidation process, but only hexanal was detected. It should be noted that reconstituted/ready to eat IF and liquid milk and cereal based products

Table 2
Hexanal (Hx) and pentane (Pt): linearity

	Sample LH – hexanal + pentane	Sample LF – pentane
Contents range ng/g sample	Hx: 2.48–84.78 Pt: 6.21–79.55	19.06–79.98
Regression equation	Hx: $y = 0.025x + 0.568$; $r = 0.999$ Pt: $y = 0.031x + 1.002$; $r = 0.990$	$y = 0.026x + 0.671$; $r = 0.994$

LH, liquid infant food with honey; LF, liquid infant food with fruits; y = analyte area/IS area; x = analyte concentration (ng/g sample); r = least correlation coefficient.

Table 3
Hexanal and pentane: analytical parameters

	Hexanal		Pentane	
	Sample (ng/g)	Assay (ng)	Sample (ng/g)	Assay (ng)
Detection limit ($n = 3$)	0.91	3.63	1.05	4.20
Quantification limit ($n = 3$)	3.03	12.11	3.50	14
Precision ($n = 3$) RSD%	2.87 (sample LH)		3.46 (sample LH) 2.34 (sample LF)	
Recovery %	Present: 24.13 ng/g Spiked: 21.15 ng/g % = 106.60 ± 7.01 ($n = 5$)		Present: 26.30 ng/g Spiked: 25.25 ng/g % = 95.39 ± 4.28 ($n = 4$)	

RSD, relative standard deviation; LH, liquid infant food with honey; LF, liquid infant food with fruits.

Table 4
Hexanal and pentane contents (mean values \pm standard deviation) in liquid infant foods and infant formulas after four and seven months manufacturing

Sample	Months	Hexanal contents		Pentane contents
		ng/g	ng/ml ^a	ng/g
LH	4	22.3 \pm 0.1		19.6 \pm 2.4
	7	22 \pm 3		30.9 \pm 3.6
LF	4	–		34.7 \pm 1.8
	7	–		45.5 \pm 3.5
A	4	7172.7 \pm 454.2	932.5 \pm 59.1	n.d.
	7	6074.8 \pm 212.6	789.7 \pm 27.6	n.d.
Alc	4	5877.7 \pm 804.6	764.1 \pm 104.6	n.d.
	7	3482.6 \pm 270.5	452.7 \pm 35.2	n.d.
Fa	4	2515.2 \pm 135.2	327 \pm 17.6	n.d.
	7	1017.1 \pm 139.7	132.2 \pm 18.2	n.d.
Fb	4	4650.8 \pm 627.4	604.6 \pm 81.6	n.d.
	7	3627.4 \pm 340.5	471.6 \pm 44.3	n.d.

LH, liquid infant food with honey; LF, liquid infant food with fruits; A, adapted infant formula; Alc, adapted infant formula with long chain polyunsaturated fatty acids added; Fa and Fb, follow-up infant formulas; n.d., not detectable.

^a IF reconstituted at 13% (w/v).

have rather similar contents of the precursor linoleic acid (Table 1), the same vitamin E contents (1 mg/100 ml in both types of products) and vitamin C contents of 6.5 mg/100 ml in IF and 9.7 mg/100 ml in paps. Although, in the storage conditions IF had higher antioxidant contents than paps and a lower water activity (a_w) favouring the antioxidant activity. In this sense, Frankel (1991) indicates that α -tocopherol (hydrogen donor compound) reduces and increases the relative percentages of pentane and hexanal, respectively.

In support of this observation are the results obtained in a study carried out by Ulberth and Roubicek (1995) in milk powder samples, with a fat content of 26% and stored for 130 days at 30 °C, where hexanal contents of 106 ng/g but no pentane were found.

In the ready-to-eat liquid cereal-milk based infant foods no differences in the hexanal contents between the samples stored for four and seven months were found, while in both samples (LH and LF) the pentane contents increased with the storage time. These observations are in agreement with the fact, previously reported, that hexanal unlike pentane can react with other sample components.

It has to be noted that the analyzed liquid infant foods were provided by the manufacturer immediately after the manufacture, so the samples stored for four and seven months came from the same batch and the storage conditions were controlled and the same for both samples (LH and LF). While the powdered IF were bought, came from different batches and their storage conditions before the purchase were unknown. The fact that in IF the hexanal contents were lower in samples stored for seven than for four months could at first seem amazing, but one can suspect that the decrease could be due to the reaction of hexanal with other sample components such as the Maillard reaction products, although this assertion can not be categorical, because the differences could also be ascribed to the manufacturing process (two different batches) and also to different storage conditions.

In any case, the described and validated method of hexanal and pentane determination by HS-SPME-GC is useful for monitoring the stability of the lipid fraction in infant foods.

Acknowledgements

Thanks are due to Hero España S.A. for providing the samples and financial supports for this study, and also to the *Generalitat Valenciana* for the financial support (03/003) given to the “Bionutest group”.

References

- Adams, R. P. (2001). Appendix II—Compounds listed in order of their retention time and Kovats index on DB-5. In *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry* (pp. 25–40). Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- Ai, J. (1997). Solid phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations. *Analytical Chemistry*, *69*, 1230–1236.
- American Chemical Society (ACS) Committee on Environmental Improvement (1980). Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Analytical Chemistry*, *52*, 2242–2249.
- Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, *62*, 2145–2148.
- Brunton, N. P., Cronin, D. A., Monahan, F. J., & Durcan, R. (2000). A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chemistry*, *68*, 339–345.
- Buttery, R. G., Turnbaugh, J. G., & Ling, L. C. (1988). Contribution of volatiles to rice aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *36*, 1006–1009.
- Chung, H.-Y., Partridge, J., Harte, B. (2002). Discrimination of light oxidized off-flavors in milk and cheddar cheese using solid-phase microextraction–gas chromatography and the olfactory sensing technique. In *Proceedings of the 13th IAPRI conference on packaging*, E. Lansing, Michigan.
- Doleschall, F., Kemény, Z., Recseg, K., & Kovári, K. (2001). Monitoring of lipid degradation products by solid-phase microextraction. *Journal of Microcolumn Separations*, *13*, 215–220.
- Doleschall, F., Recseg, K., Kemény, Z., & Kovári, K. (2003). Comparison of differently coated SPME fibres applied for monitoring volatile

- substances in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105, 333–338.
- Dupuy, H. P., Flick, G. J., Jr., Bailey, M. E., St. Angelo, A. J., Legendre, M. G., & Sumrell, G. (1985). Direct sampling capillary gas chromatography of volatiles in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62, 1690–1693.
- Fenaile, F., Visani, P., Fumeaux, R., Mió, C., & Guy, P. A. (2003). Comparison of mass spectrometry-based electronic nose and solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry technique to assess infant formula oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2790–2796.
- Frankel, E. N. (1980). Lipid oxidation. *Progress in Lipid Research*, 19, 1–22.
- Frankel, E. N. (1982). Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research*, 22, 1–33.
- Frankel, E. N. (1991). Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54, 495–511.
- Frankel, E. N. (1993). Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oils vs. oxidized vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 767–772.
- Frankel, E. N., Neff, W. E., & Weiskeder, D. (1982). Formation of hydroperoxy bis-epi-oxides in sensitized photo-oxidized methyl linolenate. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 599–600.
- Frankel, E. N., Hu, M. L., & Tappel, A. L. (1989). Rapid headspace gas chromatography of hexanal as a measure of lipid peroxidation in biological samples. *Lipids*, 24, 976–981.
- Gianelli, M. P., Flores, M., & Toldrá, F. (2002). Optimisation of solid phase microextraction (SPME) for the analysis of volatile compounds in dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1703–1709.
- Goodridge, C. F., Beaudry, R. M., Pestka, J. J., & Smith, D. M. (2003). Solid phase microextraction-gas chromatography for quantifying headspace hexanal above freeze-dried chicken myofibrils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4185–4190.
- Jelen, H. H., Wlazly, K., Wasowicz, E., & Kaminsky, E. (1998). Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: comparison with static headspace method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1469–1473.
- Lagarda, M. J., Mániz, J. G., Manglano, P., & Farré, R. (2003). Lipid peroxides determination in milk based infant formulae by gas chromatography. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 195, 339–345.
- Löliger, J. (1990). Headspace gas analysis of volatile hydrocarbons as a tool for the determination of the state of oxidation of foods stored in sealed containers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 52, 119–128.
- Marsili, R. T. (1999). Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *Journal of Chromatographic Science*, 37, 17–23.
- Marsili, R. T. (2000). Shelf-life prediction of processed milk by solid-phase microextraction, mass spectrometry, and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3470–3475.
- Park, P. S. W., & Goins, R. E. (1992). Determination of volatile lipid oxidation products by dynamic headspace-capillary gas chromatographic analysis with application to milk-based nutritional products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1581–1585.
- Przygowski, K. (2003). Analysis of volatile lipid oxidation products in infant formula by dynamic-headspace SPME/GC. *Prace Instytutu i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego*, 58, 86–94.
- Robards, K., Kerr, A. F., Patsalides, E., & Korth, J. (1988). Headspace gas analysis as a measure of rancidity in corn chips. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, 1621–1626.
- Romeu-Nadal, M., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2004). Headspace gas chromatographic method for determining volatile compounds in infant formulas. *Journal of Chromatography A*, 1046, 235–239.
- Sanches-Silva, A., Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., López-Hernández, J., & Paseiro-Losada, P. (2004). Determination of hexanal as indicator of the lipidic oxidation state in potato crisps using gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1046, 75–81.
- Snyder, J. M., Frankel, E. N., Selke, E., & Warner, K. (1988). Comparison of gas chromatographic methods for volatile lipid oxidation compounds in soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, 1617–1620.
- Ulberth, F., & Roubicek, D. (1995). Monitoring of oxidative deterioration of milk powder by headspace gas chromatography. *International Dairy Journal*, 5, 523–531.
- Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L. S., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2003). Solid-phase microextraction in the analysis of virgin olive oil volatile fraction: characterization of virgin olive oils from two distinct geographical areas of northern Italy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6572–6577.
- Yang, X., & Peppard, T. (1994). Solid-phase microextraction for flavor analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1925–1930.
- Zhang, Z., Yang, M. J., & Pawliszyn, J. (1994). Solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 66, 844A–853A.

Sterol Oxidation in Ready-to-Eat Infant Foods During Storage

GUADALUPE GARCÍA-LLATAS,[†] LUISITO CERCACI,[‡]
MARIA TERESA RODRIGUEZ-ESTRADA,^{*,†} M. JESÚS LAGARDA,[†] ROSAURA FARRE,[†]
AND GIOVANNI LERCKER[‡]Àrea de Nutrició i Bromatologia, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n,
46100 Burjassot-Valencia, Spain and Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna,
Viale G. Fanin, 40, 40127 Bologna, Italy

The effect of storage on sterol oxidation of ready-to-eat infant foods was evaluated. Two different liquid infant foods (honey or fruits flavors), prepared with milk and cereals, were stored for 0, 2, 4, 7 and 9 months at 25 °C. Sterol oxidation products (SOP) were isolated by cold saponification, purified by silica solid-phase extraction, and analyzed by gas chromatography (GC) and GC-mass spectrometry. β -Sitosterol was the most representative sterol, followed by cholesterol and campesterol. No significant differences in the total and single SOP content (0.8–1 mg/kg of product) were observed with respect to storage time and type of sample; the main SOP found was 7-ketositosterol (<0.2 mg/kg of product). The extent of stigmasterol oxidation (2.9%) was higher than that of cholesterol (1.9%) and β -sitosterol (1.4%). The type and quality of raw materials, as well as the processing conditions, seem to greatly influence SOP formation and accumulation in infant foods.

KEYWORDS: Sterol oxidation products; phytosterol oxidation products; infant foods; milk cereals; storage; trans fatty acids

INTRODUCTION

Sterols (cholesterol and phytosterols) are unsaturated molecules prone to oxidation, which can generate sterol oxidation products (SOP). Cholesterol and phytosterols are subjected to oxidation when exposed to air, which can be further enhanced by heating, ionizing radiation, chemical catalysts, fatty acid unsaturation level, and exposure to light. In general, oxidation of sterols is a free-radical chain reaction that begins with the formation of hydroperoxides, which may decompose into various compounds. The main oxidation products are hydroxy, keto, epoxy and triol derivatives. Enzymes, reactive oxygen species, and the photosensitizers may also induce lipid oxidation. Because oxidation can follow several reaction and isomerization mechanisms, a large number of different sterol oxides can be formed, many of which have already been identified (1).

Over the past few years, attention has been focused on the study and determination of cholesterol oxidation products (COP) rather than in phytosterol oxidation products (POP) (2), because of the asserted negative biological effects of COP (3–5). On the other hand, data and methods for the evaluation of POP concentration levels in food products of mixed origin are scarce, due to the inherent complexity of the analytical determination.

POP have been mostly analyzed in frying oils, fried products, margarines, bakery products, cereal-based foods, infant formulas, coffee, and biological samples (6–11). However, interest in POP has increased as a result of food supplementation with phytosterols and phytosterols esters because of their blood cholesterol-lowering effect (12). Although some studies have recently shown POP absorption from diet, results on their potential biological effects are still scarce and sometimes contradictory (13–16).

Most infant foods contain sterols from both vegetable and animal sources. The preparation of these food products involve heating and drying cycles that require elevated temperatures, often in the presence of oxygen. In addition, during storage, the contact with air and/or light and high temperatures could further enhance fatty acid and sterol oxidation. SOP have been found in infant milk formulas and milk cereals (6, 17–19), and meat- and fish-based infant foods (20, 21); the main SOP were 7-ketositosterol and 7-ketocholesterol. These milk and cereal-based baby foods are largely consumed during infancy and could, thus, be potentially harmful for children health.

The aim of this study was to evaluate the oxidative stability of sterols in two types of ready-to-eat milk and cereal-based infant food during storage, as related to their fatty acid composition. To the authors' knowledge, this is the first time that the different classes of sterol oxidation derivatives have been quantified in liquid infant foods, thus providing a more complete picture of their oxidation status. A validated gas chromatography (GC) method (10) was applied for this scope.

* To whom correspondence should be addressed. Telephone: +39-051-2096011, fax: +39-051-2096017, e-mail: maria.rodriguez@unibo.it.

[†] Universitat de València.

[‡] Università di Bologna.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Chloroform (p.a.), *n*-hexane (p.a.), methanol (Lichrosolv), diethyl ether, anhydrous sodium sulfate, potassium chloride, potassium hydroxide, and silica-gel thin-layer chromatography (TLC) plates (20 cm × 20 cm × 0.25 mm film thickness), were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Acetone (AnalaR) was purchased from BDH (VWR International Ltd., Leicestershire, UK). Double distilled water, 2',7'-dichlorofluorescein (sodium salt), silver nitrate, and silylating agents (pyridine, hexamethyldisilazane, and trimethylchlorosilane), were supplied by Carlo Erba (Milano, Italy). (24*R*)-Ethylcholest-5-en-3 β -ol (β -sitosterol, purity: 60% β -sitosterol and 30% (24*R*)-methylcholest-5-en-3 β -ol (campesterol)) was purchased from Research Plus (Bayonne, New Jersey). (24*S*)-methylcholest-5,22-dien-3 β -ol (brassicasterol, purity: 99%), cholest-5-en-3 β ,7 α -diol (7 α -hydroxycholesterol, purity: 99%) and (24*S*)-ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol-7-one (7-ketostigmasterol, purity: 99%) were supplied by Steraloids (Newport, Rhode Island). (24*S*)-Ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol (stigmasterol, purity: 93%), cholest-5-en-3 β -ol-7-one (7-ketocholesterol, purity: 99%), cholest-5-en-3 β -ol (cholesterol, purity: 99%), cholest-5-en-3 β ,7 β -diol (7 β -hydroxycholesterol, purity: 99%), 5 α ,6 α -epoxy-cholestan-3 β -ol (α -epoxycholesterol, purity: 87%), 5 β ,6 β -epoxy-cholestan-3 β -ol (β -epoxycholesterol, purity: 80%), cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol (cholestanetriol, purity: 99%), cholestan-5-en-3 β ,19-diol (19-hydroxycholesterol, purity: 99%), 5 α -cholestan-3 β -ol (purity: 97%), and tridecanoic acid methyl ester were purchased from Sigma (St. Louis, Missouri). The purity of the standards was determined by GC. A standard mixture of fatty acid methyl esters (GLC 463) was purchased from Nu-Chek (Elysian, Minnesota).

Silica solid phase extraction (SPE) cartridges (Supelclean LC-SL, 500 mg/3 mL) from Supelco (Bellefonte, Pennsylvania) were used for SOP purification.

Samples. Two types of liquid infant foods were used for this study. They mainly contained skimmed milk (88%), hydrolyzed 8-cereals flour (wheat, corn, rice, oat, barley, rye, sorghum, and millet) (8.8%), and vegetable oils; they differed in their minor ingredients (honey, 0.9%; LH) and fruits (banana, orange, and apple, 1.1%; LF). The declared fat content of both products was 2.6% (*w/w*). The products were supplied by the manufacturer (Hero España S.A.).

Both products were obtained by a preheating at 90 °C and a following ultra-high-temperature (UHT) sterilization. Infant foods were packed in a commercial 250 mL tetra brick in an air-free atmosphere and stored at 25 °C for 9 months. They were analyzed just after being produced (zero time) and after 2, 4, 7, and 9 months of storage.

For each infant food type and storage point, three bricks from the same batch were sampled.

Lipid Extraction. Lipids were extracted according to a modified version (22) of the method described by Folch et al. (23).

Preparation and GC Analysis of Total Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Fatty acids (FA) were determined as suggested by Cercaci et al. (11). The limit of quantitation (LOQ) was 0.01 g/100 g of FA.

Silver-Ion TLC-GC Analysis of *Trans* Fatty Acids (TFA). To accurately quantify the TFA isomers, silver-ion TLC-GC was performed according to Cercaci et al. (11). The LOQ was 0.01 g/100 g of FA.

Isolation of Sterols and Sterol Oxides (SOP) (10). Sterols and SOP were isolated from about 600 mg of lipid, which were extracted from 25 g of sample. For the determination of sterols, 1/10 of the unsaponifiable matter was subjected to silylation (24), dried under nitrogen stream, and dissolved in 250 μ L of *n*-hexane; 1 μ L of the silylated sterols was injected into gas chromatograph–flame ionization detector (GC-FID) and gas chromatograph–mass spectrometry (GC-MS) for quantification and identification purposes, respectively.

Regarding the determination of the sterol oxides, the remaining 9/10 of the unsaponifiable matter was divided into two portions and purified by silica SPE according to Guardiola et al. (25). SOP were eluted with acetone. The purified fraction was then silylated, dried under nitrogen stream, and dissolved in 40 μ L of *n*-hexane. A 1 μ L portion of the silylated sterols was injected into GC-FID and GC-MS under the same analytical conditions used for the determination of sterols.

To further confirm that there were no overlappings with peaks due to matrix interferences, the purified SOP fraction was separated by TLC

(10). The TLC bands of the oxide derivatives were scrapped off, extracted with diethyl ether, silylated, and injected into GC-FID and GC-MS.

GC-FID and GC-MS Analysis of Sterols and SOP. Quantification of sterols and SOP was performed by GC-FID. A Carlo Erba HRGC 5300 Mega Series (Rodano, Milan, Italy) was equipped with a split–splitless injector and a FID. A fused silica capillary column (50 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μ m film thickness) coated with 5% phenyl–95% dimethyl-polysiloxane (CP-Sil 8CB, Chrompack-Varian, Middelburg, The Netherlands) was used. The oven temperature was programmed from 280 °C (kept for 20 min) to 290 °C at a rate of 0.2 °C/min and held for 2 min; the oven temperature was then raised to 320 °C at a rate of 30 °C/min and held for 10 min. The injector and detector temperatures were both set at 325 °C. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 2.6 mL/min; the split ratio was 1:20.

Identification of sterols and SOP was performed by GC-MS. An Agilent 6890N GC coupled to a 5973N mass-selective detector (Agilent Technologies, California) was used. The system was fitted with a capillary column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μ m film thickness) coated with 5% phenyl–95% dimethyl-polysiloxane (HP-5MSI, Agilent Technologies, California), and helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The oven temperature was programmed to go from 250 to 310 °C at 0.8 °C/min. The injector and transfer line temperatures were set at 310 and 280 °C, respectively. Manual injection of 1 μ L was performed in the split mode with a 1:10 split ratio. The filament emission current was 70 eV. A mass range from 40 to 650 *m/z* was scanned at a rate of 1500 amu/s.

Quantification and Identification of Sterols and SOP. Sterols and SOP were quantified by the internal standard method, using 5 α -cholestan-3 β -ol and 19-hydroxycholesterol as internal standards (IS), respectively. The GC-FID response factors of sterols and SOP with respect to their corresponding IS were considered equal to 1. The LOQs of the GC-FID analysis of sterols and SOP were 0.1 mg/100 g of sample and 0.5 μ g/100 g of sample, respectively, which were calculated at a signal-to-noise ratio equal to 6:1.

Identification of sterols was performed by comparing the retention time and mass spectra with those of the commercial sterol standards. SOP were identified by comparing their retention time and mass spectra with those of commercial COP and 7-ketostigmasterol standards, as well as with those of SOP synthesized as suggested by Conchillo et al. (10). The mass spectra of SOP were also compared with those reported in literature (7).

Data Analysis. One lipid extraction was carried out per sample. Each parameter was determined twice per each lipid extraction. GC data were stored and processed with a Turbochrom Navigator acquisition system (Ver. 6.1.1.0.0:K20, Perkin-Elmer Instruments, Norwalk, Connecticut). Mean and standard deviation data of the SOP contents determined in each sample are shown in Table 3. Statgraphics v. 3.1 (Rockville, Maryland) was used to perform two-way (sample type and storage time) analysis of variance (ANOVA) and Tukey's honest significant difference test (HSD) at a 95% confidence level ($p < 0.05$) to identify differences among samples.

RESULTS AND DISCUSSION

To better understand the oxidative behavior of ready-to-eat infant foods, as well as to obtain more information about the quality and unsaturation degree of their lipid fraction, total FA composition of these food products was determined (Table 1). Because no significant differences were found between the FA composition of LH and LF, only the FA content of LH is reported. The most abundant FA was oleic acid, followed by linoleic, palmitic, lauric, myristic, and stearic acids. Unsaturated FA accounted for approximately 60% of total FA, resulting in a linoleic/ α -linolenic ratio of 18.2, higher than the one suggested by the European Commission (EC) Directive for infant formulas (5–15, 26).

The total FA composition of the samples here analyzed displays a wide range of FA, which reflects the original composition of the raw materials and/or ingredients. Short-chain

Sterol Oxidation in Ready-to-Eat Infant Foods During Storage

Table 1. Fatty Acid Composition (g/100 g of Lipids) of LH Sample^a, FA classes (g/100 g of Lipids), and Their Ratios^b

fatty acid	g/100 g of lipids
C4:0	0.25 (0.04)
C6:0	0.17 (0.02)
C7:0	0.07 (0.00)
C8:0	1.63 (0.08)
C9:0	0.02 (0.00)
C10:0	1.31 (0.10)
C12:0	10.52 (0.62)
C12:1	0.02 (0.00)
C14:0	4.40 (0.00)
C14:1	0.03 (0.00)
C15:0	0.06 (0.00)
C16:0	18.55 (1.06)
C16:1 ^f	0.03 (0.00)
ΣC16:1 ^f	0.13 (0.02)
C17:0	0.05 (0.00)
C17:1	0.03 (0.00)
C18:0	3.20 (0.01)
ΣC18:1 ^g	0.17 (0.03)
C18:1 ^g ^o	35.59 (3.66)
C18:1 ^g ⁱ	0.84 (0.04)
ΣC18:2 ^h	ND
C18:2 ^h	18.92 (1.36)
C20:0	0.27 (0.00)
ΣC18:3 ⁱ	ND
C18:3 ⁱ	1.04 (0.07)
C20:1	0.25 (0.03)
C22:0	0.35 (0.02)
C22:1	0.04 (0.01)
C24:0	0.13 (0.02)
SFA	41.85
MUFA	37.50
PUFA	20.44
TFA	0.20
PUFA/SFA	0.49
(MUFA + PUFA)/SFA	1.38
(n-6)/(n-3)	18.15

^a Values are given as mean and standard deviation, in parentheses, of three replicates. ^b Abbreviations: LH, liquid infant food with honey; ND, not detected (below the limit of quantitation (LOQ = 0.01 g/100 g of lipids)); SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; TFA, trans fatty acids. ^c ΣC16:1 is the sum of *c7* C16:1 and *c9* C16:1. ^d ΣC18:1^f is the sum of all positional *trans* isomers of oleic acid (# C18:1–#6 C18:1). ^e C18:1^o is the oleic acid. ^f C18:1ⁱ is the *cis*-vaccenic acid. ^g ΣC18:2^h is the sum of the positional *trans* isomers of linoleic acid (*c9*,*t12* C18:2; *c9*,*t13* C18:2; *t9*,*c12* C18:2; *t9*,*c12* C18:2). ^h C18:2 is the linoleic acid. ⁱ ΣC18:3ⁱ is the sum of the positional *trans* isomers of linolenic acid (*c9*,*c12*,*t15* C18:3; *c9*,*t12*,*c15* C18:3; *t9*,*c12*,*t15* C18:3; *t9*,*c12*,*c15* C18:3). ^j C18:3 is the linolenic acid.

FA (C4–C8) probably derive from skimmed milk. The high oleic acid content (35.6 g/100 g lipids), as well as the relatively limited amount of linoleic acid (18.9 g/100 g lipids), may correspond to the addition of high-oleic sunflower oil as ingredient; this can be further confirmed by the occurrence of 7-stigmastenol, which is characteristic of this type of vegetable oil. Such level of linoleic acid, nevertheless, could also be attributed to soybean and rapeseed oils. On the other hand, the presence of large amounts of saturated FA (mainly palmitic, lauric, and myristic acids) could be ascribable to palm oil or palm olein (high in palmitic acid) and to coconut or palm kernel oil (high in lauric and myristic acids).

Trans isomers of C16:1 and C18:1 (mainly vaccenic acid) were found at concentrations of 0.03 and 0.17 g/100 g of lipids, respectively, which can be considered within the usual TFA concentration range for refined, nonhydrogenated fats.

Although total TFA content is relatively low (0.2 g TFA/100 g lipids), their occurrence should be taken into account since TFA can be absorbed, metabolized, and incorporated into blood

Table 2. Main Sterols (mg/100 g of Product) Found in LH and LF Samples^a

sterol	mg/100 g of LH sample	mg/100 g of LF sample
cholesterol	1.34 (0.13)	1.31 (0.10)
brassicasterol	0.18 (0.02)	0.17 (0.02)
campesterol	1.18 (0.09)	1.16 (0.07)
stigmasterol	0.37 (0.05)	0.35 (0.04)
β -sitosterol	3.47 (0.37)	3.37 (0.31)
total phytosterols	5.20 (0.53)	5.06 (0.44)
total sterols	6.54 (0.66)	6.37 (0.54)

^a Values are given as mean and standard deviation, between parentheses, of three replicates. LOQ = 0.1 mg/100 g of sample.

and tissue lipids by unweaning babies, according to the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN) (27). TFA have been suggested to exhibit potential adverse effects on fetal and infant growth and development, possibly through inhibition of desaturation of the parent *n*-6 and *n*-3 fatty acids, linoleic acid and α -linolenic acid, respectively, to their respective long-chain polyunsaturated fatty acids metabolites (28). A recent EC Directive states that TFA content in infant formulas shall not exceed 3% of the total fat content (26); however, no regulations have been published about TFA content in other baby foods yet (29).

Table 2 shows the sterol composition of the analyzed infant foods. β -Sitosterol was the most representative sterol (3.37 and 3.47 mg/100 g of LF and LH, respectively) followed by cholesterol (1.31 and 1.34 mg/100 g of LF and LH, respectively) and campesterol (1.16 and 1.18 mg/100 g of LF and LH, respectively). Stigmasterol and brassicasterol were the less abundant sterols (0.36 and 0.18 mg/100 g, respectively); the latter might derive from rapeseed oil added as vegetable oil in the product formulation. Cholesterol occurrence may be attributed to skimmed milk and palm or palm-kernel oil (up to 7% cholesterol, referred to total sterol content, in these oils) (30), as deduced from the FA composition.

Table 3 reports the amount of sterol oxides found in ready-to-eat infant foods during storage. The total amount of SOP ranged from 81.1 to 97.8 μ g/100 g in LH and from 77.5 to 96.1 μ g/100 g in LF. Brassicasterol oxides were not analyzed in these samples.

The main SOP found was 7-ketositosterol, followed by the coeluting pair α -epoxysitosterol + stigmastanetriol and cholestanetriol. Other SOP were detected at trace levels by GC-MS: 25-hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycampestanol (tentative), 5-hydroxy- β -sitosterol, 7 β -hydroxysitostanol (tentative), and 6-keto- β -sitosterol. Among these SOP, only the latter was quantifiable and ranged from 2.2 to 2.8 μ g/100 g of sample.

β -Epoxycholesterol coeluted with minor amounts of stigmastanetriol that were not completely separated by the SPE cartridge, so a correction factor was calculated. This amount of stigmastanetriol was estimated in the SOP fraction of each sample as a relative percentage of the amount of cholesterol. Preliminary tests were run to verify that the stigmastanetriol/cholesterol ratio in the SPE fractions of SOP, remained constant. Because about 5.7% of the cholesterol peak area in the SOP fraction corresponded to the coeluting stigmastanetriol, this area was subtracted from the area of β -epoxycholesterol.

The type and total amount of SOP were similar in both types of infant food, regardless of the flavor ingredients (fruit and honey). No significant differences ($p < 0.05$) in the single SOP content were found with respect to storage time and type of sample, except for α -epoxycampestanol and sitostanetriol. However, no clear trends were observed with respect to these factors.

Table 3. Amount of SOP ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ of Sample) and Sterol Oxidation Rates (SOP/Sterol in Percentages) Found in Ready-to-Eat Infant Food (LH and LF Samples) During Storage^a

months	$\mu\text{g}/100\text{ g}$ sample LH					$\mu\text{g}/100\text{ g}$ sample LF				
	0	2	4	7	9	0	2	4	7	9
	Cholesterol									
7 α -hydroxy	4.1 (0.4)	3.1 (0.1)	3.5 (0.6)	3.6 (0.7)	3.0 (0.4)	4.5 (1.6)	3.7 (0.8)	2.8 (0.5)	2.8 (0.8)	3.1 (0.1)
7 β -hydroxy	0.7 (0.2)	0.5 (0.2)	0.5 (0.1)	0.5 (0.2)	ND	0.5 (0.1)	0.7 (0.0)	0.5 (0.0)	1.0 (0.1)	0.6 (0.2)
β -epoxy	7.3 (0.7)	5.8 (0.7)	7.1 (0.3)	7.0 (0.7)	5.9 (1.9)	6.4 (0.3)	6.9 (0.2)	7.1 (0.8)	6.4 (0.1)	4.9 (1.7)
α -epoxy	3.7 (0.2)	2.8 (0.2)	3.5 (0.2)	3.8 (0.2)	3.1 (0.6)	2.8 (0.1)	3.7 (0.8)	3.7 (0.8)	4.5 (0.2)	3.1 (0.1)
titol	11.1 (1.1)	9.0 (0.1)	10.1 (0.1)	9.2 (0.9)	8.7 (1.7)	8.3 (0.3)	9.6 (0.9)	8.8 (0.2)	9.1 (1.1)	8.3 (0.1)
7-keto	1.0 (0.5)	0.7 (0.4)	0.7 (0.2)	0.9 (0.1)	0.7 (0.2)	0.9 (0.0)	1.5 (0.3)	0.5 (0.2)	0.7 (0.1)	0.6 (0.1)
	Campesterol									
7 α -hydroxy	0.9 (0.0)	0.9 (0.1)	1.0 (0.1)	1.3 (0.3)	1.2 (0.2)	1.0 (0.5)	0.7 (0.4)	1.1 (0.1)	1.1 (0.0)	0.9 (0.5)
7 β -hydroxy	2.4 (0.1)	2.1 (0.2)	2.2 (0.6)	2.2 (0.5)	2.3 (0.9)	2.0 (1.2)	2.7 (0.1)	2.3 (0.1)	2.4 (0.1)	2.0 (0.3)
β -epoxy	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
α -epoxy	1.3 (0.3)	1.0 (0.1)	0.8 (0.3)	0.9 (0.1)	0.8 (0.4)	1.2 (0.0)	0.9 (0.1)	0.7 (0.0)	0.7 (0.3)	ND
titol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7-keto	2.0 (0.6)	2.4 (0.1)	2.2 (0.2)	2.0 (0.3)	1.9 (0.5)	1.7 (0.0)	2.4 (0.3)	2.2 (0.0)	2.3 (0.1)	2.2 (0.1)
	Stigmasterol									
7 α -hydroxy	2.4 (0.1)	1.7 (0.0)	2.0 (0.6)	2.2 (0.2)	1.9 (0.1)	2.1 (0.2)	2.3 (0.5)	2.0 (0.2)	1.9 (0.1)	1.4 (0.3)
7 β -hydroxy	2.0 (0.2)	1.8 (0.3)	2.6 (1.7)	3.0 (0.6)	1.1 (0.6)	3.7 (0.0)	2.9 (0.2)	4.0 (2.6)	2.7 (0.4)	1.8 (0.1)
β -epoxy	1.9 (0.1)	1.6 (0.4)	1.5 (0.3)	1.7 (0.1)	1.5 (0.6)	1.3 (0.0)	1.7 (0.1)	1.3 (0.2)	1.6 (0.1)	1.4 (0.1)
α -epoxy	3.7 (0.4)	3.5 (0.3)	3.6 (0.7)	3.1 (0.4)	3.3 (1.2)	2.7 (0.1)	3.5 (0.3)	3.3 (0.5)	3.1 (0.0)	2.5 (0.5)
7-keto	1.2 (0.4)	1.2 (0.0)	1.4 (0.2)	1.3 (0.2)	1.2 (0.1)	1.5 (0.1)	1.4 (0.0)	1.3 (0.2)	1.4 (0.2)	1.3 (0.2)
	β -Sitosterol									
7 α -hydroxy	1.4 (0.1)	0.9 (0.1)	1.0 (0.2)	1.0 (0.1)	1.0 (0.4)	1.2 (0.1)	1.3 (0.1)	1.2 (0.0)	1.1 (0.2)	0.9 (0.2)
7 β -hydroxy	5.1 (0.8)	4.5 (0.3)	4.6 (0.3)	4.4 (0.6)	4.5 (1.3)	4.5 (0.2)	4.8 (0.3)	4.8 (0.3)	5.0 (0.0)	4.1 (0.2)
β -epoxy	5.6 (0.9)	4.7 (0.1)	4.9 (0.4)	5.4 (0.1)	4.9 (1.5)	4.5 (0.1)	5.8 (0.7)	5.2 (0.0)	5.3 (1.0)	4.6 (0.2)
α -epoxy ^b	12.7 (2.2)	10.7 (0.0)	11.9 (0.5)	11.0 (1.0)	10.3 (3.5)	10.0 (0.1)	12.1 (1.4)	11.3 (0.2)	11.6 (0.2)	10.1 (0.5)
titol	11.2 (0.3)	8.9 (0.8)	10.2 (0.0)	10.9 (1.0)	9.8 (2.5)	12.5 (1.5)	11.5 (0.6)	10.9 (0.0)	12.1 (0.5)	10.0 (0.3)
7-keto	16.1 (1.8)	13.3 (0.1)	14.4 (0.1)	14.4 (0.5)	13.8 (2.9)	13.9 (0.7)	16.0 (1.5)	14.5 (0.8)	14.9 (0.4)	13.7 (1.0)
total oxides	97.8	81.1	89.7	89.8	81.3	87.2	96.1	89.5	91.7	77.5
	Oxidation Rates (%)									
cholesterol	2.1 (0.0)	1.8 (0.1)	1.9 (0.1)	1.9 (0.0)	1.7 (0.3)	1.8 (0.0)	2.0 (0.2)	1.9 (0.2)	1.9 (0.1)	1.5 (0.1)
campesterol	0.6 (0.0)	0.5 (0.0)	0.5 (0.0)	0.6 (0.1)	0.5 (0.2)	0.3 (0.1)	0.6 (0.0)	0.5 (0.0)	0.6 (0.1)	0.5 (0.1)
stigmasterol	2.8 (0.2)	2.8 (0.2)	3.1 (0.6)	2.9 (0.4)	2.3 (0.6)	2.8 (0.8)	3.1 (0.0)	3.4 (1.2)	3.1 (0.4)	2.6 (0.0)
β -Sitosterol	1.5 (0.2)	1.3 (0.0)	1.4 (0.0)	1.4 (0.1)	1.3 (0.4)	1.4 (0.1)	1.5 (0.2)	1.4 (0.0)	1.5 (0.1)	1.3 (0.1)

^a Values are given as mean and standard deviation, between parentheses, of three replicates. ND, not detected (below the limit of quantitation (LOQ = 0.5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of sample)). ^b α -Epoxycholesterol + stigmasterol.

Although 7-keto derivatives of sterols have been previously used as reliable markers of the extent of sterol oxidation in foods (11, 19, 31), their formation may vary depending on the type of food matrices as well as their corresponding oxidation phase/status (32). In fact, the large quantitative differences found between 7-ketositosterol (mean value: 14.5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of sample) and 7-ketocholesterol (mean value: 0.8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) might be due to diverse initial levels of sterol oxidation of the raw materials (milk and vegetable oils), as well as to the processing technologies and conditions used for their production. Vegetable oils are usually subjected to refining, which leads to the formation of different types and amounts of SOP, depending on the initial sterol content, on the chemical structure of the sterol oxides (already present and generated), and on the refining process applied to the oils (9). On the other hand, milk, the other main ingredient, is also subjected to different processes during manufacturing, such as pasteurization and spray-drying steps, which have been reported to cause sterol oxidation in milk cereals, infant formulas, and powdered milks (6, 17, 18). All these events may have led to different oxidation stages in vegetable oils and milk fat.

The very low amounts of SOP found in these infant foods should not represent a health risk, because negative biological effects of SOP seem to manifest at relatively high concentrations in comparison with the daily intake that these foods would represent (4, 15, 33).

7-Ketositosterol and 7-ketocholesterol detected in ready-to-eat infant foods here analyzed are apparently much lower than those found in a previous study on powdered infant milk cereals (6). Zunin et al. reported that 7-ketositosterol and 7-ketocholesterol contents varied from 5.9 to 49.0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of sample and from 3.3 to 42.1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of sample, respectively. However, the powdered samples require water addition (about 19 g of product/100 mL of water) before consumption, which would result in a dilution of 7-ketositosterol and 7-ketocholesterol concentrations (1.1–9.3 and 0.6–8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of reconstituted product, respectively). Considering the reconstituted samples, their 7-ketositosterol content was about 3 times lower than those found in the infant foods here analyzed, even though β -sitosterol contents of both reconstituted and ready-to-eat samples were similar. On the other hand, reconstituted samples exhibited 7-ketocholesterol levels about 4 times higher than those detected in this study, due to their higher cholesterol content. β -Sitosterol and cholesterol displayed similar oxidation levels in powdered samples, whereas 7-ketositosterol was significantly higher in ready-to-eat infant foods. The greater extent of β -sitosterol oxidation in the samples here analyzed evinces that the ingredients from vegetable origin had a higher degree of oxidation, probably due to the quality of the raw materials and/or processing conditions.

Table 3 also reports the single sterol oxidation rates (OR) found for ready-to-eat infant foods. No significant differences

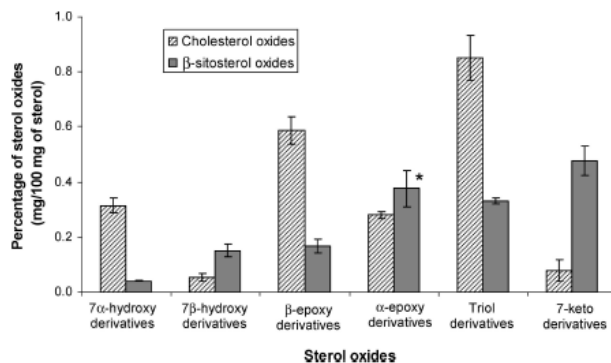


Figure 1. Relative percentages of β -sitosterol and cholesterol oxides (expressed with respect to the corresponding unreacted sterol) found in the liquid infant food with honey (LH) sample at 0 months of storage. Data points represent means ($n = 3$) \pm standard deviations (some error bars may lay within the data points). The relative amount of α -epoxysterol (*) would likely be overestimated, because of its overlapping with an unknown amount of stigmastanetriol under the analytical conditions used.

were found among the sterol OR of LH and LF, and no particular OR trend was observed with respect to storage. In both types of samples, stigmastanol had the highest OR (2.4–3.4%), followed by cholesterol (1.5–2.1%) and β -sitosterol (1.3–1.5%). Because of its scarce presence, stigmastanol OR might be more influenced by analytical errors, thus leading to a relatively higher OR with respect to those of the other sterols. These remarkable differences might be caused by the different processing technologies applied to milk and vegetable oils, as well as to the diverse sterol susceptibility to oxidation. Because ready-to-eat infant foods are oil-in-water emulsions, oxidation likely occurs at the emulsion droplet interface. In fact, phytosterols are surface active, so they could be particularly prone to oxidation (34); this susceptibility also depends on the sterol relative concentrations at the oil–water interface.

If only 7-keto derivatives are considered, cholesterol OR is drastically reduced to 0.05–0.08% and 0.04–0.11% in LH and LF, respectively, whereas β -sitosterol OR decreases to 0.41–0.48% in both types of samples. Zunin et al. (6) reported 0.02–0.62% and 0.08–0.46% of cholesterol and β -sitosterol OR in powdered infant milk cereals, respectively, which further confirms the higher extent of oxidation of raw materials from vegetable origin used in the samples here analyzed.

Figure 1 compares the percentages of β -sitosterol and cholesterol oxides (expressed with respect to the corresponding unreacted sterol), detected in LH sample at 0 months of storage. Because sterol oxides remain roughly constant during storage in both LH and LF, data reported in **Figure 1** are representative of sterol oxide percentages (%SO) in these infant foods; sterol oxide percentages at the beginning of the storage may provide a better picture of the original sterol oxidation level in the raw materials utilized for these products. **Figure 1** shows that the percentages of the single β -sitosterol oxides are significantly different from those of the corresponding cholesterol oxides. In fact, the ratios between the relative amount of the 7 α -7 β -hydroxy derivatives of cholesterol and β -sitosterol were 5.99 and 0.27, respectively. The majority of 5,6-epoxy derivatives of cholesterol were present in their β configuration, whereas those of β -sitosterol were mostly present as α -epoxy; this influenced the β - α -epoxy derivatives ratios, which were equal to 0.44 and 2.07 for β -sitosterol and cholesterol, respectively. It must be pointed out that the %SO of α -epoxysterol would

likely be overestimated, because of its overlapping with an unknown amount of stigmastanetriol under the analytical conditions here used. The percentages of β -sitosterol and cholesterol triol derivatives were equal to 0.33% and 0.85%, respectively. As aforementioned, the large difference between the relative amounts of 7-keto derivatives of β -sitosterol and cholesterol further confirms their diverse stage of oxidation. Besides the 7-keto derivatives, the other β -sitosterol oxides seem to have reached the most stable forms from the thermodynamics standpoint (1), that is, 7 β -hydroxy and α -epoxy rather than 7 α -hydroxy and β -epoxy derivatives; however, cholesterol exhibits the opposite trend. Furthermore, the sums of the relative amounts of 7 α -hydroxy, 7 β -hydroxy, and 7-keto derivatives were 20.6 and 43.3% for cholesterol and β -sitosterol, respectively, whereas the sums of α -epoxy, β -epoxy, and triol derivatives of cholesterol and β -sitosterol were 79.4 and 56.7%, respectively. Considering that 7-hydroxy and 7-keto compounds are generated by a different oxidation pathway than epoxy and triol derivatives (1), these results confirm the diverse oxidation stage and origin of cholesterol and β -sitosterol in samples here analyzed. Formation of relevant amounts of epoxy derivatives might be partly due to the interaction of sterols with hydrogen peroxide, which is released by microbial enzymes naturally present in milk (35). Under these environmental conditions, epoxide hydrolysis into triols would likely be unavoidable.

The low sterol oxidation level observed in these ready-to-eat infant foods might be attributed to the effectiveness of the packaging system (inert atmosphere), to the slight enrichment with vitamins having antioxidant properties (vitamins A, C and E), and to the presence of Maillard reaction products (MRP) found in these samples (36).

The antioxidant capacity of MRP (37, 38) might have prevented sterols from oxidizing during storage, thus maintaining the same oxidative status reached after processing. In addition, the physical state (liquid) of the milk-cereal-based infant foods could have also favored MRP solubilization, thus contributing to the product stability (39).

In conclusion, this study evidences a low sterol oxidation level in ready-to-eat infant foods, which remains roughly constant during storage. However, the actual presence of such compounds confirms the need of monitoring SOP in this type of food products, because of their potential negative health effects. To

ensure the best nutritional and safety characteristics in infant foods, special attention should be devoted to the choice of the raw materials (in particular oil) and the processing conditions and technologies, which seem to greatly influence SOP formation and accumulation in such products.

ABBREVIATIONS USED

COP, cholesterol oxidation products; FA, fatty acids; GC-FID, gas chromatograph-flame ionization detector; GC-MS, gas chromatograph-mass spectrometry; IS, internal standard; LF, liquid infant food with fruits; LH, liquid infant food with honey; MRP, maillard reaction products; MUFA, monounsaturated fatty acids; OR, oxidation rate; POP, phytosterol oxidation products; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids; SOP, sterol oxidation products; SPE, solid-phase extraction; TFA, *trans* fatty acids.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Mara Mandrioli, University of Bologna, for the technical support and assistance during sample analysis. The authors thank Hero España S.A. for providing the samples.

This work was financially supported by Hero España S.A. through a grant and by the Generalitat Valenciana through the Biontest group (03/003).

LITERATURE CITED

- Smith, L. L. *Cholesterol Autoxidation*; Plenum Press: New York, 1981.
- Guardiola, F.; Bou, R.; Boatella, J.; Codony, R. Analysis of sterol oxidation products in foods. *J. AOAC Int.* **2004**, *87*, 441–466.
- García-Cruset, S.; Carpenter, K. L. H.; Codony, R.; Guardiola, F. Cholesterol Oxidation Products and Atherosclerosis. In *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects*; Guardiola, F., Dutta, P. C., Codony, R., Savage, G. P., Eds.; AOCS Press: Champaign, Illinois, 2002; pp 241–277.
- Schroepfer, G. J., Jr. Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 361–554.
- Osada, K. Cholesterol oxidation products: other biological effects. In *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects*; Guardiola, F., Dutta, P. C., Codony, R., Savage, G. P., Eds.; AOCS Press: Champaign, Illinois, 2002; pp 278–318.
- Zunin, P.; Calcagno, C.; Evangelisti, F. Sterol oxidation in infant milk formulas and milk cereals. *J. Dairy Res.* **1998**, *65*, 591–598.
- Dutta, P. C. Determination of phytosterol oxidation products in foods and biological samples. In *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects*; Guardiola, F., Dutta, P. C., Codony, R., Savage, G. P., Eds.; AOCS Press: Champaign, Illinois, 2002; pp 335–374.
- Dutta, P. C.; Savage, G. P. Formation and Content of Phytosterol Oxidation Products in Foods. In *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects*; Guardiola, F., Dutta, P. C., Codony, R., Savage, G. P., Eds.; AOCS Press: Champaign, Illinois, 2002; pp 319–334.
- Bortolomeazzi, R.; Cordano, F.; Pizzale, L.; Conte, L. S. Presence of phytosterol oxides in crude vegetable oils and their fate during refining. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2394–2401.
- Conchillo, A.; Cercaci, L.; Ansorena, D.; Rodríguez-Estrada, M. T.; Lercker, G.; Astiasarán, I. Levels of phytosterol oxides in enriched and nonenriched spreads: application of a thin-layer chromatography-gas chromatography methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7844–7850.
- Cercaci, L.; Conchillo, A.; Rodríguez-Estrada, M. T.; Ansorena, D.; Astiasarán, I.; Lercker, G. Preliminary study on health-related lipid components of bakery products. *J. Food Protect.* **2006**, *69*, 1393–1401.
- Normén, L.; Fröhlich, J.; Trautwein, E. Role of plant sterols in cholesterol lowering. In *Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals*, 1st ed.; Dutta, P. C., Ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, 2004; pp 243–315.
- Grandgirard, A.; Martine, L.; Demaison, L.; Cordelet, C.; Joffre, C.; Berdeaux, O.; Semon, E. Oxyphytosterols are present in plasma of healthy human subjects. *Br. J. Nutr.* **2004**, *91*, 101–106.
- Lea, L. J.; Hepburn, P. A.; Wolfreys, A. M.; Baldrick, P. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 8. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity with phytosterol oxides. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 771–783.
- Ryan, E.; Chopra, J.; McCarthy, F.; Maguire, A. R.; O'Brien, N. M. Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *Br. J. Nutr.* **2005**, *94*, 443–451.
- Abramsson-Zetterberg, L.; Svensson, M.; Johnsson, L. No evidence of genotoxic effect in vivo of the phytosterol oxidation products triols and epoxides. *Toxicol. Lett.* **2007**, *173*, 132–139.
- Angulo, A. J.; Romera, J. M.; Ramirez, M.; Gil, A. Effects of storage conditions on lipid oxidation in infant formulas based on several protein sources. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 1603–1607.
- Przygonski, K.; Jelen, H.; Wasowicz, E. Determination of cholesterol oxidation products in milk powder and infant formulas by gas chromatography and mass spectrometry. *Nahrung* **2000**, *44*, 122–125.
- Scopesi, F.; Zunin, P.; Mazzella, M.; Testa, M.; Boggia, R.; Evangelisti, F.; Serra, G. 7-ketocholesterol in human and adapted milk formulas. *Clin. Nutr.* **2002**, *21*, 379–384.
- Evangelisti, F.; Zunin, P.; Boggia, R.; Calcagno, C. Cholesterol oxidation in meat-based baby foods. *J. AOAC Int.* **2004**, *87*, 505–510.
- Zunin, P.; Salvadeo, P.; Boggia, R.; Evangelisti, F. Sterol oxidation in meat- and fish-based homogenized baby foods containing vegetable oils. *J. AOAC Int.* **2006**, *89*, 441–446.
- Boselli, E.; Velazco, V.; Caboni, M. F.; Lercker, G. Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. *J. Chromatogr. A* **2001**, *917*, 239–244.
- Folch, J.; Lees, M.; Sloane-Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509.
- Sweeley, C. C.; Bentley, R.; Makita, M.; Wells, W. W. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2497–2507.
- Guardiola, F.; Codony, R.; Rafecas, M.; Boatella, J. Comparison of three methods for the determination of oxysterols in spray-dried egg. *J. Chromatogr. A* **1995**, *705*, 289–304.
- 2006/141/EC: European Commission Directive of 22 December 2006 on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *401*, 1–33.
- Aggett, P. J.; Haschke, F.; Heine, W.; Hernel, O.; Koletzko, B.; Launiala, K.; Rey, J.; Rubino, A.; Schöch, G.; Sentere, J.; Tormo, R. ESPGHAN (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) Committee on Nutrition: Comment on the content and composition of lipids in infant formulae. *Acta Paediatr. Scand.* **1991**, *80*, 887–896.
- Decsi, T.; Burus, I.; Molnar, S.; Minda, H.; Veitl, V. Inverse association between trans isomeric and long-chain polyunsaturated fatty acids in cord blood lipids of full-term infants. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *74*, 364–368.
- 2006/125/EC: European Commission Directive of 5 December 2006 on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *339*, 16–35.

Sterol Oxidation in Ready-to-Eat Infant Foods During Storage

- (30) Kamm, W.; Dionisi, F.; Hischenhuber, C.; Engel, K. H. Authenticity assessment of fats and oils. *Food Rev. Int.* **2001**, *17*, 249–290.
- (31) Lercker, G.; Rodríguez-Estrada, M. T. Cholesterol oxidation: presence of 7-ketocholesterol in different food products. *J. Food Comp. Anal.* **2000**, *13*, 625–631.
- (32) Kemmo, S.; Soupas, L.; Lampi, A.-M.; Piironen, V. Formation and decomposition of stigmaterol hydroperoxydes and secondary oxidation products during thermo-oxidation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2005**, *107*, 805–814.
- (33) Sevanian A. Personal communication. In *The International Symposium "Biological Free Radical Oxidations and Antioxidants"*; Ursini, F., Cadenas, E., Eds.; CLUEB University Publisher Udine: Padova, Italy, 1991; Vol. 1–4.
- (34) Cercaci, L.; Rodríguez-Estrada, M. T.; Lercker, G.; Decker, E. A. Phytosterol oxidation in oil-in-water emulsion and bulk oil. *Food Chem.* **2007**, *102*, 66–76.
- (35) Lewis, M. J. Improvements in the Pasteurization and Sterilization of Milk. In *Dairy Processing: Improving Quality*; Smit, G. Ed., Woodhead Publishing Limited: Cambridge, England, 2003; E-book.
- (36) Bosch, L.; Alegría, A.; Farré, R.; Clemente, G. Fluorescence and color as markers for the Maillard reaction in milk-cereal based infant foods during storage. *Food Chem.* **2007**, *105*, 1135–1143.
- (37) Alaiz, M.; Hidalgo, F. J.; Zamora, R. Antioxidative activity of nonenzymatically browned proteins produced in oxidized lipid/protein reactions. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1365–1369.
- (38) Ames, J. M. Melanoidins as pro- or antioxidants. *Cerevisia* **2001**, *26*, 210–216.
- (39) García-Llatas, G.; Lagarda, M. J.; Clemente, G.; Farré, R. Monitoring of headspace volatiles in milk-cereal-based liquid infant foods during storage. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2006**, *108*, 1028–1036.

Received for review August 17, 2007. Revised manuscript received November 6, 2007. Accepted November 8, 2007.

JF072475G