

60



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**CINÉTICA DEL DETERIORO QUÍMICO
DE PREPARADOS PARA RÉGIMENES
ESPECIALES**

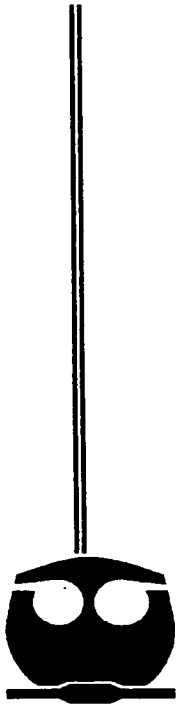
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

ROJAS GARCÍA GUADALUPE



MÉXICO, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).


El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Guadalupe

Rojas García

FECHA: 29-NOV-2002

FIRMA: 

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Jurado Asignado

Presidente
Vocal
Secretario
1er.Suplente
2do.Suplente

Prof. Francisca Aída Iturbe Chinas
Prof. María de los Ángeles Valdivia López
Prof. Arturo Navarro Ocaña
Prof. Luz Sandra Sánchez del Angel
Prof. María Teresa Plata Jiménez



Lugar donde se desarrolló el tema:
Laboratorio 322-323
Conjunto E, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor: M. en C. María de los Ángeles Valdivia López

Asesor Técnico: Q.F.B. Julieta Sandoval Guillén

Sustentante: Guadalupe Rojas García

Handwritten signatures and lines. The top signature is for María de los Ángeles Valdivia López. Below it are two more lines with signatures, likely for Julieta Sandoval Guillén and Guadalupe Rojas García.

ÍDICE GENERAL

	PAGINAS
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	
Objetivo General	3
Objetivos Específicos	3
1. ANTECEDENTES	
1.1 Fórmulas para alimentación especial	4
1.1a Dietas Terapéuticas	4
1.2 Vida de Anaquel de productos lácteos	6
1.3 Reacciones químicas responsables de la pérdida de calidad del material lipídico	7
1.3.1 Autooxidación	7
1.3.2 Componentes liposolubles	10
1.3.2 a Cooxidación de componentes liposolubles	11
1.4 Reacciones involucradas en el deterioro de las proteínas	13
1.4.1 Reacción de Maillard	14
1.5 Reacciones de oxidación del ácido ascórbico	19
1.6 Orden de reacción	22
METODOLOGIA	
2.1 Primera etapa: composición del producto	27
2.2 Segunda etapa: establecimiento de las condiciones de análisis	28

2.2.1 Evaluación del deterioro oxidativo de los lípidos	29
2.2.2 Determinación de vitamina C por HPLC	31
2.2.3 Determinación de vitamina A	32
2.2.4 Determinación de Proteína Soluble	34
2.3 Tercera etapa: monitoreo de la estabilidad del preparado	36
RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	
3.1 Resultados de la primera etapa	39
3.2 Resultados de la Segunda etapa	41
3.3 Resultados de la Tercera etapa	48
CONCLUSIONES	73
RECOMENDACIONES	74
BIBLIOGRAFIA	75
ANEXOS	80

INTRODUCCIÓN

Se han desarrollado fórmulas balanceadas nutricionalmente para cubrir los requerimientos nutricionales de los sectores con problemas severos de salud.

Son dirigidas a sectores que por trastornos patológicos no pueden alimentarse de forma habitual. Dichas formulaciones están compuestas por proteínas hidrolizadas o aminoácidos, dextrinas, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales.

La composición de estas formulaciones que generalmente son deshidratadas permite que puedan suceder interacciones o reactividad entre los componentes, las cuales pueden verse favorecidas por efecto de la temperatura o de las condiciones de almacenamiento.

Dentro de la reactividad química destaca la de oxidación de lípidos que conduce al desarrollo de olores desagradables, y la generación de compuestos de oxidación secundarios.

Se crea un ambiente altamente reactivo, dichas reacciones interfieren con todos los compuestos de naturaleza lipídica presentes como las vitaminas liposolubles, experimentando reacciones de cooxidación.

La generación de radicales libres interfiere también en la reactividad de otros componentes como las proteínas, las cuales pueden manifestar cambios en su conformación, además de la posibilidad de que se den reacciones entre estas y los compuestos carbonílicos, provenientes de las reacciones de oxidación o bien de los carbohidratos, reacción de Maillard o de obscurecimiento no enzimático.

En tales condiciones pueden verse afectados compuestos como la vitamina C, por presentar susceptibilidad a la oxidación, además de ser capaz de intervenir en las reacciones de obscurecimiento no enzimático.

Todo esto pone en riesgo la estabilidad y la disponibilidad de la formulación perdiendo con ello el propósito nutricional.

En el presente proyecto se propuso determinar la estabilidad de una formulación a base de caseinatos de calcio frente al deterioro químico de macro y micromoléculas, con el objetivo de determinar la vida útil del mismo en función de las cinéticas de deterioro químico de los componentes. La selección de los indicadores esencialmente se fundamenta en la susceptibilidad a la degradación en las condiciones de almacenamiento, en particular a la temperatura.

Es importante señalar que en un estudio paralelo se evaluó la estabilidad de las proteínas de la formulación bajo las mismas condiciones de estudio.

OBJETIVO GENERAL

- Establecer la vida útil de una fórmula dietética para regímenes especiales, a través de un estudio de la cinética de deterioro químico de sus componentes.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer el efecto de la temperatura de almacenamiento, sobre la rapidez de deterioro químico de los componentes de la fórmula.
- Establecer la cinética del deterioro oxidativo de los lípidos, mediante la evolución de los productos primarios y secundarios de oxidación.
- Determinar las cinéticas del deterioro químico de las vitaminas A y C.
- Evaluar la pérdida de solubilidad proteínica, para establecer la cinética de reacción.

ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

1.1 FORMULAS PARA ALIMENTACIÓN ESPECIAL

Cuando los alimentos y bebidas ordinarios no satisfacen las necesidades de nutrimentos del individuo, se hace necesario el consumo de suplementos nutricionales para elevar el aporte de esas sustancias.

Los pacientes con problemas digestivos o de absorción necesitan fuentes de nutrimentos predigeridos o elementales. Algunos pacientes que a causa de alguna enfermedad no están en condiciones de llevar una dieta normal, ésta ha de ser modificada para que pueda ser administrada por una sonda de pequeño calibre. Otros pacientes afectados por enfermedades gastrointestinales graves, no logran absorber bien los alimentos ingeridos y, por lo mismo requieren alimentación parcial o total por vía parenteral. (Taylor, 1991)

Se define como dietas elementales a las fórmulas nutricionalmente completas en soluciones para ser administradas por sonda o por vía oral, que contienen proteínas hidrolizadas o aminoácidos, dextrinas, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales. Estos nutrimentos requieren de una digestión mínima y se absorben sin dificultad.

1.1a DIETAS TERAPEUTICAS

La terapéutica dietética especial debe basarse en una evidencia científica. Las dietas terapéuticas especiales son restrictivas, su uso debe de ser supervisado clínicamente y se debe suspender tan pronto como ya no se necesite. El empleo de dietas especiales es recomendado para muchos padecimientos: dieta baja en sodio para insuficiencia cardiaca congestiva y la hipertensión arterial, dieta

elevada en contenido de potasio como coadyuvante en la terapéutica de corticosteroides, dieta eliminadora de gluten, dieta de eliminación de disacáridos en la deficiencia de disacaridasa, dieta de eliminación de lactosa en la deficiencia de la lactasa, dieta nutricionalmente bien balanceada pero baja en calorías para la obesidad y la dieta de control de carbohidratos para la *diabetes mellitus*. (Krupp y Chattón, 1982)

Los alimentos para regímenes especiales deben proveer los requerimientos del paciente para carbohidratos, proteínas, grasas y electrolitos, en el caso de ser suministrado por sonda el alimento debe tener una osmolaridad tan cercana a la del plasma como sea posible. Debido a la riqueza de las formulaciones estas constituyen un medio excelente para el crecimiento de las bacterias por lo que se debe tener estricto control en la calidad microbiológica de las formulaciones, además de conocer los mecanismos y procesos químicos que merman la calidad desde el punto de vista nutricional de acuerdo con los componentes presentes y la interacción de los mismos bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

1.2 VIDA DE ANAQUEL DE PRODUCTOS LACTEOS

El fin de la vida útil de los productos alimentarios se caracteriza por cambios en el sabor, olor, cuerpo, textura, y apariencia. Por lo tanto, el estudio de vida puede incluir, evaluación sensorial, microbiológica y composicional. El diseño del estudio se hace en función de la categoría y tipo de producto. La vida de anaquel potencial se ve influenciada por el tipo de proceso, empaque, almacenamiento, además de los sistemas de distribución del mismo.

Los factores fisicoquímicos del proceso pueden inducir cambios en el sabor por fenómenos de oxidación, lipólisis, irradiación, así como los factores externos: exposición a la luz, iones metálicos, o excesivo calor durante el proceso o el almacenamiento.

La formulación determina características muy importantes tales como; actividad de agua y pH, que influyen de manera directa en la estabilidad microbiológica del producto. Mientras que el empaque afecta directamente la calidad del producto ya que controla la exposición del producto a cambios de humedad, temperatura, y lo protege de los olores propios de las áreas de almacenamiento.

Al diseñar pruebas de vida útil para estudiar la pérdida de calidad de los alimentos deben seguirse las etapas a continuación descritas:

1. Determinar la seguridad microbiológica y los parámetros de calidad de la formulación.
2. Determinar, mediante análisis de los ingredientes y del proceso, cuáles son las reacciones químicas responsables de la pérdida de calidad.

3. Seleccionar las temperaturas de almacenamiento, dependiendo del producto (al menos dos).

4. Seleccionar la pruebas a realizar y la frecuencia a la que deberán realizarse en función de la temperatura. (Labuza, 1982)

Una práctica comúnmente empleada para establecer la vida útil de los productos alimentarios es la determinación de cambios en algunas características durante algún tiempo. (Singh, 1994)

1.3 REACCIONES QUÍMICAS RESPONSABLES DE LA PÉRDIDA DE CALIDAD DEL MATERIAL LIPÍDICO

Los productos lácteos y/o derivados son especialmente susceptibles al deterioro causado por la oxidación de la grasa, la cual se ve favorecida cuando el contenido de agua es bajo, por el tipo de empaque usado (metalizado generalmente), temperaturas de almacenamiento por encima de 20 °C, y la adición de antioxidantes, que en dosis no adecuadas pueden actuar como prooxidantes. (Schwartz y Parks, 1983)

1.3.1 AUTOOXIDACION

La autooxidación de los lípidos, es decir la reacción con oxígeno molecular, es la principal reacción involucrada en el deterioro producido por la oxidación de los lípidos.

Para explicar la reacción de autooxidación, se ha postulado un mecanismo simple por radicales libres en tres etapas. El cual se esquematiza de manera general en la figura 1.

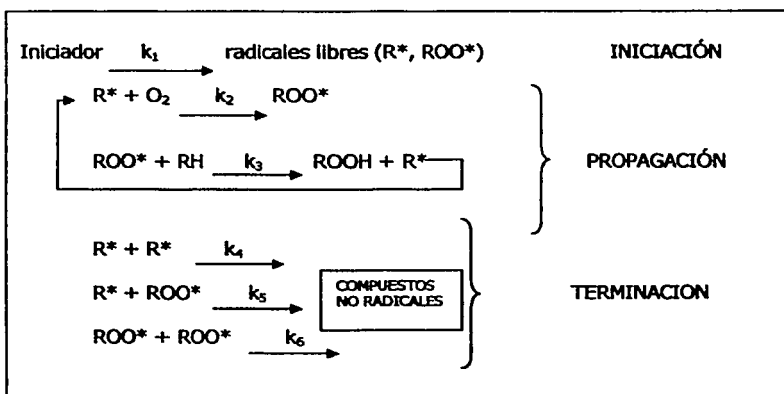


FIGURA 1. MECANISMO GENERAL DE LA REACCIÓN DE AUTOOXIDACIÓN.

INICIACION

El paso inicial de la autooxidación de ácidos grasos insaturados y sus ésteres es la formación de radicales libres.

La formación del radical libre R^* del grupo RH se puede atribuir a la acción del calor, irradiación visible y ultravioleta. O bien a la acción de los metales como catalizadores en la producción de radicales libres de RH por el mecanismo:



PROPAGACION

La propagación toma lugar una vez que se alcanza cierto nivel de radicales libres (R^*). La reacción en cadena se propaga al captar átomos de H en las

posiciones α de los dobles enlaces (R^*), Posteriormente se produce la adición de oxígeno para producir radicales peróxidos ROO^* , los cuales son capaces de captar H de los grupos α -metilénicos RH de otras moléculas para dar hidroperóxidos $ROOH$ y grupos R^* ; capaces de reaccionar con oxígeno repitiéndose la secuencia de las reacciones descritas. (Nawar, 1993)

TERMINACION

Los hidroperóxidos formados en esta etapa son los productos primarios de la autooxidación lipídica, son inodoros e insípidos, pero capaces de intervenir en numerosas y complejas reacciones de ruptura e interacción que pueden llevar a la producción de compuestos de pesos moleculares distintos, asociados a la producción de olores desagradables y sabores rancios. (Labuza, 1971)

La evolución de la propagación de la reacción en cadena transcurre muy lentamente, razón por la cual se dice que esta fase determina la velocidad de la reacción. (Belitz y Grosh, 1998)

DESCOMPOSICION DE HIDROPEROXIDOS

Los hidroperóxidos se descomponen conforme se producen. En las primeras etapas de la autooxidación, la rapidez de formación es mayor que la de descomposición, pero en las últimas etapas ocurre lo contrario.

La primera etapa de la descomposición del hidroperóxido es la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno del grupo hidroperóxido, lo que da lugar a un radical alcoxilo y a un radical hidroxilo.

La segunda etapa es la ruptura del enlace carbono-carbono a uno u otro lado del grupo alcoxilo, que puede dar lugar a la formación de aldehídos, ácidos,

ésteres e hidrocarburos. Los aldehídos son los compuestos típicos mayoritarios en la oxidación de las grasas.

Los aldehídos insaturados pueden experimentar a su vez la autooxidación clásica al sufrir el ataque del oxígeno en las posiciones α -metilénicas, lo que da lugar a hidrocarburos de cadena corta, aldehídos y dialdehídos. (Nawar, 1993)

Los radicales lipídicos formados son especies químicas altamente reactivas capaces de atacar moléculas adyacentes y de intervenir en reacciones que interfieren con las funciones bioquímicas. En los sistemas biológicos los productos de oxidación: radicales y productos estables están implicados en varias condiciones patológicas como la arterosclerosis y el cáncer.

1.3.2 COMPONENTES LIPOSOLUBLES

VITAMINA A

Vitamina A es el nombre general que se da a los compuestos isoprenoides presentes en los productos de origen animal con actividad biológica de trans-retinol.

Las formas activas de la vitamina A predominantes en los alimentos de origen animal incluyen retinol (Figura 2), retinal, ácido retinóico y a todos los ésteres de trans-retinol, la pro vitamina A se refiere a los pigmentos amarillos presentes en los vegetales que por conversión enzimática después de la ingestión se transforman en vitamina A en donde se incluye a todos los carotenos. (Eitnmiller y Lander, 1995)

Como la estructura de los carotenoides es predominantemente la de un hidrocarburo, son sustancias liposolubles e insolubles en agua que acompañan naturalmente a otras sustancias de tipo lipídico.

La deficiencia de vitamina A, afecta a la formación y mantenimiento de la piel, membranas mucosas, huesos y dientes, a la vista y a la reproducción. Uno de los primeros síntomas de insuficiencia es la ceguera nocturna (dificultad en adaptarse a la oscuridad). Otros síntomas son excesiva sequedad en la piel; falta de secreción de la membrana mucosa, lo que produce susceptibilidad a la invasión bacteriana, y sequedad en los ojos debido al mal funcionamiento del lagrimal, importante causa de ceguera en los niños de países poco desarrollados. (Piñeiro *et al*, 1995)

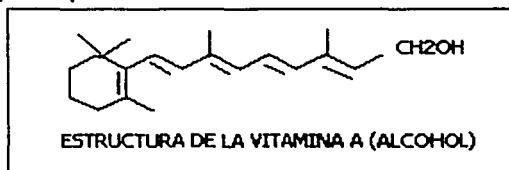


FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LA VITAMINA A

La actividad biológica de la vitamina A se define como, Unidades Internacionales (UI) y como Equivalentes de Retinol (ER). Un ER es equivalente a 1 μ g de retinol o 3.33 UI.

1.3.2a COOXIDACIÓN DE COMPONENTES LIPOSOLUBLES

La destrucción de la vitamina A en alimentos que han sufrido algún tratamiento tecnológico, así como durante su almacenamiento puede seguir diversas rutas dependiendo de las condiciones del medio.

Si existe oxígeno, se producen pérdidas considerables de carotenoides estimuladas por la luz, las enzimas y por cooxidación con hidroperóxidos

lipídicos. Como resultado de estas reacciones se producen principalmente isomerizaciones y fragmentaciones que dan lugar a una serie de compuestos que en parte son volátiles. (Belitz y Grosh, 1998)

Los alimentos deshidratados son más susceptibles a la pérdida de vitamina A debido a la facilidad con que sufren los procesos oxidativos. Al igual que en la oxidación lipídica, la velocidad de la desactivación de la vitamina A depende de enzimas, actividad del agua, atmósfera de almacenamiento y de la temperatura. En general la estabilidad de los carotenoides es paralela a la de los ácidos grasos insaturados de un determinado alimento. (Tannenbaum *et al*, 1993)

1.4 REACCIONES INVOLUCRADAS EN EL DETERIORO DE LAS PROTEÍNAS

En condiciones normales, las proteínas no son capaces de interactuar unas con otras, sin embargo éstas se pueden presentar cuando ocurren cambios en la conformación de las moléculas. Estos cambios se presentan por efecto de la temperatura, ya que se favorece la desnaturalización de la proteínas es decir, la destrucción de las estructuras terciaria y secundaria que tienen como consecuencia el desdoblamiento de las mismas. En este estado las proteínas son mucho más reactivas al tener expuestas las regiones hidrofóbicas por lo que las colisiones entre las moléculas proporcionan más oportunidades para que permanentemente ocurran estas reacciones. (Dalgleish y Hunt, 1995)

Entre las proteínas se pueden presentar interacciones de naturaleza hidrofílica, hidrofóbica, además de las interacciones de naturaleza iónica por la presencia de minerales multivalentes.

Las interacciones entre los lípidos y las proteínas son resultado del balance de fuerzas, en donde predominan las fuerzas hidrofóbicas en condiciones de solución o bien las interacciones electrostáticas entre los grupos polares. Las interacciones entre proteínas y lípidos se controlan por numerosos factores como la naturaleza, composición y organización de las moléculas, además de los factores ambientales como: pH, fuerza iónica, temperatura y la proporción de lípidos y proteínas en el alimento. (Haylock *et al*, 1995)

Durante los tratamientos tecnológicos o el almacenamiento de alimentos que contienen proteínas y carbohidratos reductores o compuestos carbonilos (como

aldehídos y cetonas derivados de la oxidación de lípidos), se produce el pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard. (Singh, 1994)

1.4.1 REACCION DE MAILLARD

La reacción comienza con la condensación de un grupo amino libre (ϵ -NH₂ de la lisina o un NH₂ terminal) y un carbohidrato reductor. En el primer paso se forman las bases de Schiff inestables, que se isomerizan rápidamente en aldosilaminas o cetosilaminas, según el carbohidrato de partida. Figura 3.

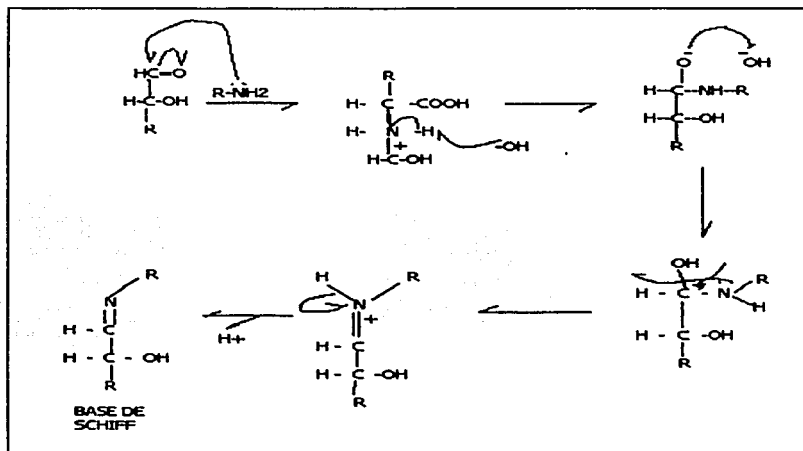


FIGURA 3. MECANISMO GENERAL DE LA FORMACION DE LAS BASES DE SCHIFF

La estabilidad de las bases de Schiff formadas con el grupo amino de la lisina depende de la estructura química de los aldehídos involucrados. Los aldehídos alifáticos y los carbohidratos reductores producen bases de Schiff reversibles en las condiciones ácidas del estómago. En contraste los aldehídos aromáticos y los poli aldehídos producen bases de Schiff muy estables que no pueden ser hidrolizadas en las condiciones ácidas del estómago.

Estas glicosilaminas se transforman entonces, vía reorganización de Amadori o de Heyn en cetosaminas o aldosaminas, que en una etapa posterior se transforman en numerosos derivados no saturados, carbonilos o policarbonilos que pueden reaccionar con aminas y aminoácidos para formar amoniaco y nuevos carbonilos (degradación de Strecker).

También se pueden dar descarboxilaciones de los aminoácidos libres.

Durante una tercera etapa los poli carbonilos no saturados sufren reacciones de escisión y polimerización, que pueden originar productos volátiles o bien pigmentos de pardos a negros conocidos como melanoidinas, los cuales presentan elevados pesos moleculares. La figura 4 esquematiza de manera general las rutas de formación de melanoidinas vía reordenamiento de Amadori.

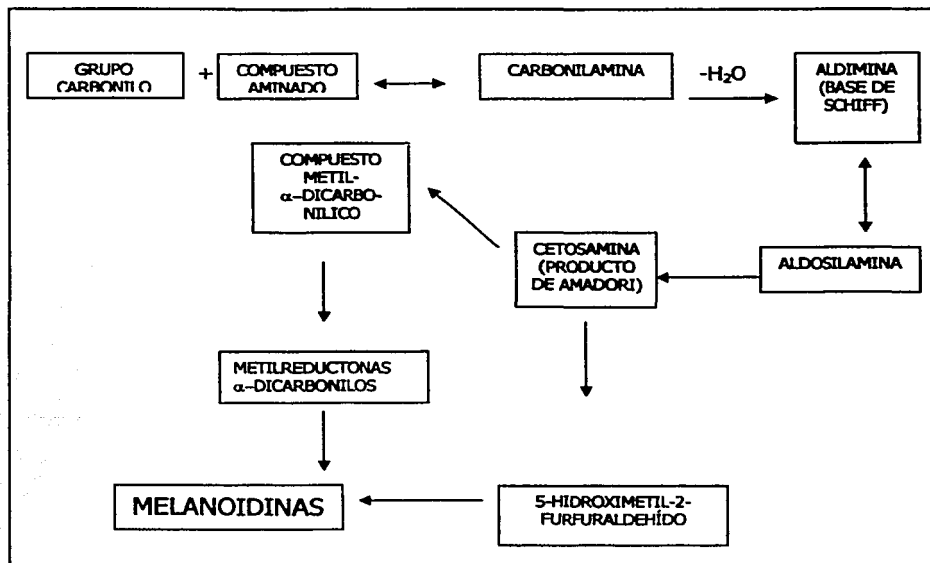


FIGURA 4. ESQUEMA GENERAL DE FORMACION DE MELANOIDINAS VIA COMPUESTOS DE AMADORI

EFFECTOS NUTRICIONALES DE LA REACCIÓN DE MAILLARD

El oscurecimiento no enzimático o reacción de Maillard es una de las principales causas de los cambios en la calidad de los alimentos, por lo que se observa disminución en la calidad nutricional, lo que causa pérdida de propiedades como la solubilidad proteínica. (Singh, 1994)

En las primeras etapas de la secuencia de Maillard, incluso hasta la base de Schiff, la lisina es aún biodisponible, ya que puede ser liberada en las condiciones ácidas del estómago. La formación de enlaces covalentes inter e intramoleculares, en las melanoidinas, destruye la digestibilidad de la fracción proteínica. (Cheftel *et al*, 1993)

Si bien la pérdida de lisina es importante por ser un aminoácido esencial, otros aminoácidos son también degradados por la reacción de Maillard, entre éstos se encuentran los aminoácidos básicos arginina e histidina, que son susceptibles a causa de la presencia en ellos de un átomo de nitrógeno relativamente básico en la cadena lateral. La actividad del agua y el pH del medio juegan un papel muy importante en estas reacciones. (Finot, 1973)

En las fases iniciales de la reacción de Maillard el aminoácido lisina y la lactosa son los principales compuestos involucrados, y como consecuencia la lisina puede no estar presente en las fórmulas como lisina disponible sino como un componente de una base de Schiff.

En las fases avanzadas, los compuestos indeseables como furfuraldehídos pueden encontrarse. Para evaluar la intensidad del el tratamiento térmico

aplicado y los efectos de almacenamiento, él, puede ser útil medir las pérdidas de lisina disponible y determinar los derivados del furfural. (Ferrer *et al*, 1999).

La destrucción de la lisina ocurre probablemente debido a las interacciones que se dan entre el grupo ϵ -amino con compuestos de naturaleza no proteínica. Se han encontrado derivados de lisina como productos de la reacción de Maillard en etapas avanzadas como el ϵ -pirrol-lisina y el ϵ -carboximetil-lisina de forma libre en alimentos deshidratados como leche y pastas. Figura 5. (Guo *et al*, 1999)

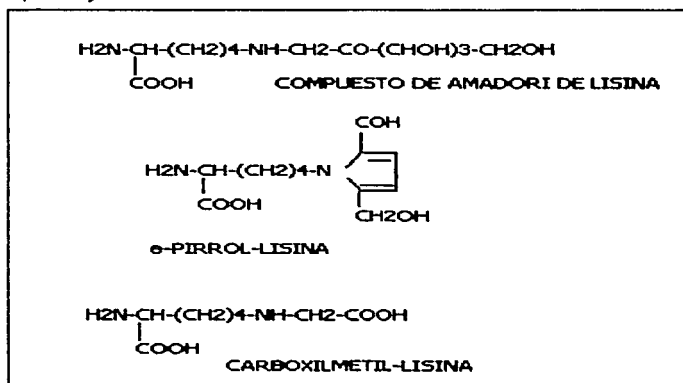


FIGURA 5.COMUESTOS DERIVADOS DE LISINA ENCONTRADOS EN LECHE EN POLVO

Debido al enriquecimiento de las fórmulas infantiles con varios compuestos como la vitamina A, hierro, y lactosa, estos tipos de productos pueden ser más susceptibles a la reacción de Maillard que la leche de vaca. (Caric *et al*, 1984)

Los componentes de las fórmulas lácteas pueden modificarse y actuar recíprocamente (las reacciones de Maillard) durante los tratamientos térmicos y también durante el almacenamiento del producto. Esto lleva a cambios que

dependen de las materias primas, la composición de la fórmula, el proceso industrial aplicado, y empaquetando y las condiciones de almacenamiento. (Van Mil y Jans, 1991).

Chung en 1976 estudió el efecto de la actividad acuosa en la formación de pigmentos pardos en varios sistemas alimenticios a 35°C durante un periodo de 30-60 días y encontró, que la formación de los pigmentos se da en ambos sistemas (hidrofilicos y lipofilicos), la principal diferencia fue la intensidad en la coloración de éstos, a los sistemas lipofilicos correspondió la mayor intensidad. La evolución del bloqueo de lisina en leche en polvo se ha estudiado en sistemas modelo, de donde se sabe que los parámetros más importantes en la evolución temprana de la reacción de Maillard son la actividad acuosa y la temperatura. En la práctica, para la deshidratación y condensación de leche se pone especial interés en el control de las condiciones de secado y condensación, en especial para los productos destinados a ciudades con climas cálidos en donde no se tienen las facilidades para almacenar los productos a bajas temperaturas. Los aldehídos libres generados durante la oxidación lipídica pueden reaccionar con la lisina y participar en la reacción de Maillard, se han identificado productos como el N-ε- (2-propenal)-lisina, cuando reacciona el malonaldehído con la lisina. (Finot, 1997)

1.5 REACCIONES DE OXIDACION DEL ACIDO ASCORBICO (Vitamina C)

El ácido ascórbico es un compuesto blanco cristalino, soluble en agua de peso molecular de 176 con punto de fusión de 192° C, capaz de formar quelatos con metales catiónicos (Fe^{3+} y Cu^{2+}) y complejos con las proteínas. Se comporta como un ácido de fuerza media ($\text{pk}_1=4.04$, $\text{pk}_2=11.4$), cuya absorción en UV depende del pH.

En forma de sales de calcio y sodio es usado como suplemento vitamínico y conservador en alimentos procesados. La versatilidad de ácido ascórbico como aditivo en los alimentos se debe al grupo enediol que le confiere propiedades fisicoquímicas importantes.

La vitamina C es importante en la formación y conservación del colágeno, además de que favorece la absorción de hierro procedente de los alimentos de origen vegetal.

El escorbuto es la clásica manifestación de insuficiencia grave de ácido ascórbico. Sus síntomas se deben a la pérdida de la acción cimentadora del colágeno, y entre ellos están las hemorragias, caída de dientes y cambios celulares en los huesos de los niños. Aunque el ácido ascórbico no utilizado por el organismo se elimina rápidamente por la orina, las dosis altas y prolongadas pueden derivar en la formación de cálculos en la vejiga y el riñón, interferencia en los efectos de los anticoagulantes, destrucción de la vitamina B_{12} y pérdida de calcio en los huesos.

Entre las fuentes de vitamina C se encuentran las frutas (cítricos, fresa, toronja, piña y guayaba), y los vegetales (brócoli, col Bruselas, tomate, espinaca, col, pimientos verdes y nabos). (Piñeiro *et al*, 1995)

En solución el ácido ascórbico experimentan descomposición oxidativa al ser expuesto al oxígeno, especialmente en presencia de metales traza, exposición a la luz y en intervalo de pH de 5 a 11.5. La descomposición oxidativa inicia con el paso de ácido ascórbico a dehidroascórbico (reversible) seguida por el paso a ácido dicetoglucónico (Irreversible desde este punto) y otros compuestos incluidos el ácido L-treónico y el ácido L-xilónico.

El ácido ascórbico, sales de ascorbato, los radicales libres de ascorbato y ácido dehidroascórbico, están involucrados con la actividad oxido-reductora de los sistemas en los que se encuentran. Las propiedades reductoras se deben a la presencia del grupo reductona.

La interacción de proteínas con carbohidratos y el ácido ascórbico ha sido extensamente estudiada en términos del oscurecimiento no enzimático o reacción de Maillard en los sistemas alimenticios, ésta se da por los grupos carbonilos activos del ácido ascórbico. La degradación del ácido ascórbico y su asociación con el oscurecimiento no enzimático es influenciada por numerosos parámetros que incluyen temperatura, tiempo, pH, concentración de oxígeno, aminoácidos, carbohidratos y metales traza. (Howell, 1995)

ESTABILIDAD DE LA VITAMINA C

La transformación de ácido ascórbico en dehidroascórbico y productos subsiguientes varía con las condiciones existentes, siendo los factores de mayor influencia la presión parcial de oxígeno, el pH, la temperatura, y los iones de metales pesados.

La oxidación catalizada por metales transcurre mucho más rápidamente que la oxidación espontánea, de manera que trazas de metales pesados, especialmente el cobre y el hierro producen grandes pérdidas de vitamina C. (Belitz, 1998)

En presencia de aminoácidos, los ácidos ascórbico y dehidroascórbico dan lugar a reacciones de Maillard. (Tannenbaum *et al*, 1993)

En la figura 6 se muestran las rutas de degradación del ácido ascórbico

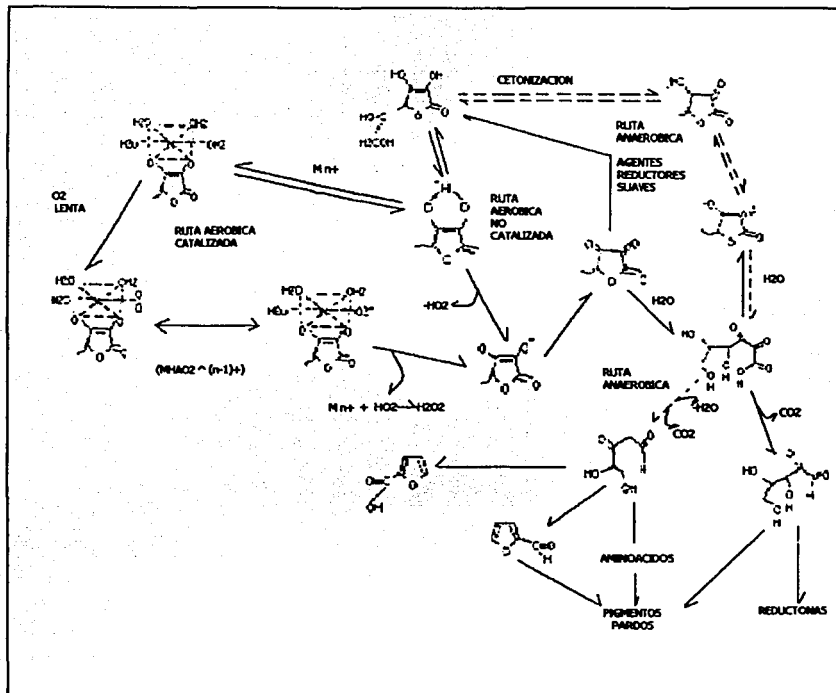


FIGURA 6. RUTAS DE DEGRADACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO (Fannenbaum, 1993)

1.6 ORDEN DE UNA REACCIÓN (Avery, 1982)

La velocidad de una reacción química puede ser expresada como una rapidez de descomposición o desaparición de un reactivo o la velocidad de formación de un producto. Por ejemplo, para la reacción:



Durante el transcurso de la reacción, la concentración de A decrece mientras que las concentraciones de B y C aumentan. Por lo que la velocidad de esta reacción en cualquier instante esta dada por la pendiente de la grafica típica de concentración de A en función del tiempo:

$$\text{Velocidad} = - d(\text{A}) / dt$$

La velocidad de la reacción es igual a la velocidad de decrecimiento de la concentración de A con el tiempo. Alternativamente la velocidad está dada también por la velocidad de crecimiento de la concentración de B o de C con el tiempo.

Se ha encontrado que la velocidad de una reacción depende de la concentración de reactivos, de modo que así la concentración de A en la reacción decrece, también lo hace la velocidad de la reacción. De esta forma,

$$\text{Velocidad} = k_r (\text{A})^n$$

Donde n es una constante conocida como orden de reacción. La relación entre la velocidad y la concentración se denomina ecuación de velocidad y toma la forma

$$-d(\text{A}) / dt = k_r (\text{A})^n$$

donde k_r es una constante para cada reacción a cada temperatura y se llama constante de velocidad. La ecuación de velocidad establece que, sí la velocidad de una reacción varía con la concentración de los reactivos, la velocidad de una reacción no depende de la concentración de los productos.

Si en una reacción se encuentra experimentalmente que la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de A, se dice que la reacción es de primer orden, y se expresa con la siguiente ecuación:

$$-d(A) / dt = k_1 (A)$$

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA VELOCIDAD DE REACCIÓN

La relación entre la constante de velocidad para una reacción, la energía de activación y la temperatura absoluta está dada por la ecuación de Arrhenius.

$$k = A e^{-E_A / RT}$$

donde k = constante de velocidad

A = factor de Arrhenius

e = 2.718 (base de los logaritmos naturales)

R = 1.986 cal / K mol (constante de los gases)

T = temperatura absoluta

E_A = Energía de activación

El factor de Arrhenius es una medida de la frecuencia de las colisiones y del factor de probabilidad; mide la probabilidad de que una reacción se verifique, independientemente de sus requisitos de energía. El término es el *factor de energía* y es igual a la fracción de colisiones con energías superiores a la energía de activación.

$$e^{-E_A / RT}$$

La naturaleza exponencial del factor de energía es lo que justifica el notable aumento de la velocidad de una reacción que generalmente acompaña a cada aumento de temperatura. El factor de energía justifica: la relación entre la

velocidad de reacción y el valor de la energía de activación para diferentes reacciones que se llevan a cabo a la misma temperatura. Para una reacción con energía de activación grande la reacción se lleva a cabo lentamente a la temperatura dada, lógicamente la reacción con energía de activación pequeña se llevará a cabo con mayor rapidez. Dado que la energía de activación es una barrera de energía entre los reactivos y los productos, es un obstáculo de energía que un compuesto debe superar para convertirse en producto. (Solomons, 1982)

La energía de activación debe determinarse experimentalmente.

METODOLOGIA

2. METODOLOGÍA

El presente proyecto se realizó para una empresa particular, la cual deseaba conocer la estabilidad química del producto con la finalidad de establecer la vida útil del mismo, para lo cual, de acuerdo con la composición del producto se establecieron los parámetros a evaluar y las condiciones del estudio.

El desarrollo de la metodología se dio en tres etapas que se describirán a detalle posteriormente.

El producto es una fórmula equilibrada a base de caseinatos de calcio, en polvo, enlatado, que será distribuido en el territorio nacional.

Para el estudio se elaboró un lote especial del producto, el cual fue transportado al laboratorio en donde se clasificó en tres lotes, para ser almacenadas a las temperaturas de estudio. De igual manera se realizó el monitoreo correspondiente a la calidad química inicial del producto y las determinaciones requeridas para el análisis proximal.

2.1 PRIMERA ETAPA: COMPOSICIÓN DEL PRODUCTO

La primera etapa experimental consistió en conocer la composición del producto.

En esta etapa se determinó:

HUMEDAD

Método por Secado (AOAC, METODO 927.05)

CENIZAS

Método de Cenizas Totales (AOAC, METODO 925.12)

PROTEINA CRUDA

Método de Kjeldahl (AOAC, METODO 991.20)

GRASA

Método Roesse –Gottlieb, Recomendado para grasa en leche.

(AOAC, METODO 905.02)

CARBOHIDRATOS

El cálculo se realizó por diferencia.

2.2 SEGUNDA ETAPA: ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS

Una vez conocida la composición del producto se planteó el esquema analítico que permitió evaluar la estabilidad química de la formulación bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Por ser un alimento de baja humedad se tienen las condiciones para que el producto presente estabilidad microbiológica, sin embargo sea susceptible al deterioro químico, ya que presenta una cantidad de lípidos de 12%. Dentro de esta fracción se reporta una composición significativa de ácidos grasos insaturados los cuales son más susceptibles al deterioro oxidativo.

La velocidad de la oxidación es dependiente de factores como: temperatura, concentración de oxígeno, luz, presencia de antioxidantes y agentes prooxidantes.

La reacción de oxidación del material lipídico no solo merma la calidad de éste sino que debido a la naturaleza de las reacciones que se desencadenan, interfiere con otros componentes presentes en la formulación como las vitaminas liposolubles, la vitamina A es un claro ejemplo de los fenómenos de cooxidación antes mencionados.

Las proteínas también pueden ser modificadas por su interacción con los radicales libres, generados en la reacción de autooxidación lipídica, o bien por interacción con compuestos carbonílicos, que se puede manifestar en cambios en propiedades funcionales como la solubilidad.

La generación de radicales libres crea un ambiente altamente reactivo en donde se pueden afectar otros componentes como las vitaminas hidrosolubles. Para este estudio se eligió como indicador a la vitamina C.

El monitoreo se realizó cubriendo los parámetros mas importantes y que de manera general nos permitan conocer la estabilidad química del producto.

2.2.1 EVALUACIÓN DEL DETERIORO OXIDATIVO DE LOS LÍPIDOS

Consistió en la cuantificación de productos primarios de oxidación mediante el índice de peróxidos y la determinación de productos secundarios de oxidación, cuantificados por el índice de Kreis.

INDICE DE PEROXIDO MÉTODO COLORIMÉTRICO

Procedimiento

Pesar 0.1-0.3g de grasa en un tubo de ensayo, agregar 9.6 mL de una mezcla de disolventes, diclorometano/ metanol (70:30) y agitar. Agregar 0.05 mL de tiocianato de amonio (al 30%), mezclar y determinar la absorbancia a 500nm (E_0), contra un blanco de la mezcla de disolventes.

Agregar 0.05 mL de una solución de cloruro ferroso (al 0.35% que contenga 2% de ácido clorhídrico 10N), mezclar. Transcurridos 5 minutos determinar la absorbancia (E_2). De manera simultánea se lleva a cabo la determinación de un testigo de reactivos (E_1).

Preparar una curva patrón de hierro, con una concentración de 0 a 50 μg de hierro empleando de una solución de cloruro férrico.

Los cálculos se realizan considerando: Abs m como el número de microgramos de Fe al interpolar en la curva patrón:

$$\text{Abs m} = E_2 - (E_0 + E_1)$$

Para utilizar la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de peróxidos} = m/55.84 * W = \text{mEq de peróxido / Kg de grasa.}$$

En donde W el peso de la muestra en gramos. (Gray,1978)

INDICE DE KREIS

Procedimiento

Pesar de 0.1-0.2 g de grasa, adicionar 10 mL de diclorometano, mezclar, adicionar 5 mL de ácido tricloroacético (al 30% en ácido acético), y 1 mL de una solución de fluoroglucinol en ácido acético (al 1%).

Colocar los tubos en baño de vapor a 40°C durante 15 minutos, transcurrido este tiempo, enfriar los tubos y añadir 4 mL de etanol, mezclar y leer la absorbancia a 550 nm.

El índice de Kreis se determina con la formula:

$$\text{IK} = \text{Abs de muestra} - \text{Abs de blanco} / C * l$$

En donde C es la cantidad de grasa (g) y l la longitud de la celda. (Gray,1978)

2.2.2 DETERMINACION DE VITAMINA C POR HPLC

De las metodologías conocidas para la determinación de vitamina C, se recurrió a las reportadas para productos similares a la formulación de las cuales se seleccionó la siguiente por ser un procedimiento rápido, que proporciona sensibilidad y evita interferencias debidas a otros componentes como por ejemplo los metales.

Procedimiento (extracción para muestras en polvo)

Pesar 8g de muestra, adicionar 10 mL de agua destilada. Agregar 1g de ácido tricloroacético sólido, agitar durante 10 minutos en parrilla de agitación magnética sin calentamiento, cubriendo el vaso de precipitado con papel aluminio. Transferir la mezcla a un tubo de centrifuga de 50 mL, centrifugar a 1250 rpm durante 10 minutos, separar el sobrenadante de la fase sólida y aforar a 10 mL con una solución de ácido tricloroacético al 4%, en caso necesario. Filtrar la solución con un filtro de 0.45 μ m, para posteriormente inyectar 20 μ L en el equipo. (Albalá-Hurtad *et al*, 1997)

Condiciones del Análisis Cromatográfico

Preparación de la fase:

Pesar 6.9g de fosfato de potasio monobásico y 1.8 g de Cetrimida (Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio). Disolver en 900 mL de agua grado HPLC. Mezclar con 50 mL de Metanol grado HPLC, aforar y filtrar la mezcla a través de una membrana de 0.45 μ m

Flujo: 0.8 mL/ min

Columna: Symmetry Shield RP18 5 μ m, 3.9 X 150 mm, WATERS

Detector UV λ =261 nm

Se preparó una curva estándar de ácido ascórbico de 0.05 a 0.25 mg / mL

EQUIPO:

Cromatógrafo de Líquidos Beckman System Gold 166 Detector UV

2.2.3 DETERMINACIÓN DE LA VITAMINA A

En esta etapa se evaluaron las metodologías adecuadas para la cuantificación de vitamina A de acuerdo con la naturaleza del producto, se realizó la selección a partir de dos posibles metodologías, una de las cuales requiere de saponificación, sin embargo se encontró un artículo donde se realiza la cuantificación sin necesidad de este paso lo cual lo hacia atractivo por ser un procedimiento rápido. Las dos metodologías consideradas se describen a continuación.

Metodología (Qian y Sheng, 1998)

Pesar 1 gramo de muestra exactamente en un tubo de centrifuga de 10 mL, añadir 4 mL de una mezcla de acetona / cloroformo (30:70), burbujear con nitrógeno al tubo para proteger la vitamina de la posible oxidación, agitar la mezcla en el vortex durante un minuto.

Después de reposar 5 minutos, se agita otro minuto en el vortex.

Posteriormente se centrifuga a 4000 rpm, durante un minuto.

Se transfiere un mililitro de sobrenadante a un vial de 1.5 mL y se evapora el disolvente con nitrógeno.

El residuo se resuspende en 0.3 mL de n-butanol, se filtra con membrana de 0.45 μm y se inyectan 20 μL en el sistema de HPLC.

CONDICIONES DE ANÁLISIS CROMATOGRAFICO:

Fase Móvil: Hexano / Isopropanol (99:1)

Columna: Nova Pack Silica 3.9 X 150 mm

Flujo: 1 mL /min

Detector UV $\lambda=290$ nm

Metodología (Albalá-Hurtado, 2000)

Saponificación

1. En un matraz de yodo de 250 mL, pesar 10 g de muestra, mezclar con máximo 30 mL de agua a 45-50°C. Añadir 7 g de hidróxido de potasio y mezclar para disolver, añadir 60 mL de alcohol absoluto y 0.5 g de ácido ascórbico. Envolver el matraz en papel aluminio y dejar toda la noche en un lugar oscuro y cerrado.

Extracción del material insaponificable

1. Trasvasar la suspensión del matraz a un embudo de separación de 500 mL, enjuagar con tres porciones de 10 mL de agua el matraz y añadir agua de lavado al embudo de separación, lavar el matraz con 50 mL de hexano y añadir al embudo.

2. Extraer la vitamina A agitando ligeramente, dejar separar las fases, vaciar la fase acuosa a otro embudo de 500 mL, recoger la fase orgánica en otro embudo de separación de 500 mL. Efectuar la extracción 5 veces en total.
3. Lavar la solución orgánica con fracciones de 100 mL de agua, hasta que el agua de lavado no de reacción colorida con fenofaleína. Filtrar la solución lavada en un filtro con 5 g de sulfato de sodio anhidro y enjuagar con 50 mL de hexano, sin dejar secar.
4. Evaporar el disolvente en el rotavapor a 40 °C y eliminar los últimos mL con nitrógeno. Disolver el residuo en 3 mL de hexano y filtrar, a través de un filtro de 0.45 μm de tamaño de poro. De esta solución se inyectan 20mL en el sistema de HPLC.

CONDICIONES DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO:

Fase móvil: METANOL

Flujo: 1.5 mL / min

Detector UV $\lambda = 325\text{nm}$

EQUIPO:

Cromatógrafo de Líquidos Beckman

Columna Beckman C₁₈ Ultrasphere-ODS 5 μm , 4.6mm x 25cm

2.2.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE

Con el propósito de evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre las proteínas se efectuó el seguimiento de la pérdida de solubilidad. La solubilidad se puede ver modificada por la interacción de las proteínas con otros

componentes de la formulación al variar la reactividad del medio. El procedimiento empleado fue el siguiente:

MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

Procedimiento

Pesar 10g de muestra, agregar 100 mL de una solución 0.07N de NaOH a 24 °C, homogenizar durante 90 segundos. Reposar en un vaso de precipitados, hasta observar separación de la espuma, retirar con una espátula la cantidad de espuma que sea posible, sin interferir con la solución. Agitar durante 5 segundos.

Transferir la solución a un tubo para centrifuga de 50 mL, centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos. Con el sobrenadante hacer las diluciones necesarias, de acuerdo a la curva patrón y al contenido de proteína de la muestra.

Tomar 1mL de la solución (última dilución), agregar 4 mL de ácido tricloroacético al 10%, dejar reposar 10 minutos.

Leer a 600 nm contra un blanco de reactivos.

La concentración de proteínas se calcula a partir de una curva patrón preparada con caseinato de sodio, tratada de la misma manera que la muestra. (Iturbe, s/a)

2.3 TERCERA ETAPA: MONITOREO DE LA ESTABILIDAD DEL PREPARADO.

Las muestras se distribuyeron en 3 lotes y posteriormente se almacenaron a tres temperaturas: 22 ± 0.4 , $37 (\pm 1^\circ\text{C})$ y $45 (\pm 0.5^\circ\text{C})$ °C, para tener éstas condiciones de temperatura las muestras fueron almacenadas en de incubadoras RIOS ROCHA, (Modelo EG-51).

Para realizar el estudio de vida útil del producto, se consideró que requería el seguimiento de los componentes de interés al menos por 3 temperaturas para el posterior manejo de la ecuación de Arrhenius, además de que para determinar las cinéticas de reacción se requiere de por lo menos seis monitoreos.

Para el estudio de estabilidad, la empresa elaboró un lote especial del alimento y el mismo día de producción se realizó la evaluación correspondiente al tiempo inicial.

El monitoreo se realizó **semanalmente**, por **sacrificio** de una lata del producto para cada temperatura, realizando cada determinación por **triplicado**, durante los cuatro meses del estudio. La tabla 1 presenta el orden cronológico de las determinaciones realizadas por semana.

DÍA	ACTIVIDAD
LUNES	DETERMINACION DE VITAMINA C Y PREPARACION DE SAPONIFICACION DE VITAMINA A
MARTES	EXTRACCION DE VITAMINA A
MIERCOLES	INYECCION DE VITAMINA A Y DETERMINACIONES DE INDICE DE PEROXIDOS Y KREIS
JUEVES	DETERMINACION DE SOLUBILIDAD PROTEINICA
VIERNES	REVISION DE RESULTADOS Y REPETICION DE ALGUNA DETERMINACION EN CASO NECESARIO

Tabla 1. PLAN DE ACTIVIDADES SEMANAL, DURANTE EL ESTUDIO DE VIDA DE ANAQUEL DE ALIMENTO PARA REGÍMENES ESPECIALES.

DETERMINACION DE ORDEN DE REACCION Y DE LA CONSTANTE DE VELOCIDAD

Si se dibuja una gráfica concentración en función del tiempo, la velocidad se mide directamente de la pendiente de la gráfica. Trazando una tangente a la curva en diferentes puntos se obtienen valores de $-dc / dt$. Este cálculo es útil para las reacciones que son independientes al tiempo, las cuales se denominan como de orden cero.

Para una reacción de primer orden la velocidad de reacción está dada por

$$-d(A) / dt = k_1 (A)$$

La ecuación anterior puede escribirse como

$$dx / dt = k_1 (A - x)$$

Al integrar la ecuación se tiene

$$-\ln (A - x) = k_1 t + \text{constante}$$

DETERMINACION DE CONSTANTES DE VELOCIDAD DE PRIMER ORDEN

1. Método gráfico

Una representación de $\ln(A - x)$ en función de t deberá conducir a una línea recta de pendiente $-k_v$. Si los datos de velocidad obtenidos dan una representación lineal la reacción es de primer orden, y la constante de velocidad se determina de la pendiente.

2. Método de Vida Fraccionaria

Para un proceso de primer orden, el tiempo necesario para que la concentración del reactivo disminuya en una cierta fracción de la concentración inicial es independiente de dicha concentración inicial.

Considerando $t = 0.5$, el tiempo necesario para que la concentración inicial disminuya hasta la mitad ($0.5A$). Esto se conoce como vida media de la reacción. De esta forma, para condiciones de vida media se tiene la ecuación

$$k_v = 1 / t_{0.5} \ln A / 0.5A$$

$$k_v = \ln 2 / t_{0.5}$$

$$t_{0.5} = 0.693 / k_v$$

que es una constante para cada reacción particular, y es independiente de la concentración inicial.

En general, el tiempo $t_{1/f}$ para que la concentración inicial decaiga hasta una fracción $1/f$ está dado por

$$t_{1/f} = \ln f / k_v$$

RESULTADOS

Y

ANALISIS DE RESULTADOS

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 PRIMERA ETAPA: COMPOSICION DEL PRODUCTO

Los resultados promedios de tres repeticiones del análisis proximal se reportan en la tabla 2.

COMPONENTE	VALOR MEDIO G / 100 G	COEFICIENTE DE VARIACIÓN	DATOS DE ETIQUETA G/100 G
HUMEDAD	4.02	3.06	No reportada
CENIZAS	3.12	1.31	No reportada
GRASA	12.01	3.90	9.0
PROTEINAS (factor 6.38)	18.53	1.98	17.5
CARBOHIDRATOS*	62.30		68.0

Tabla 2 ANALISIS PROXIMAL

COMPOSICION DEL PRODUCTO

De los resultados del análisis proximal se observa que en la determinación del material lipídico se presentó variación del orden de tres unidades, con respecto a lo reportado en etiqueta, posiblemente debido a un error en el control de ingredientes ya que por el coeficiente de variación obtenido la determinación es estadísticamente aceptable.

Para la determinación del contenido de material proteínico se presentó también una variación del orden de una unidad, la cual solo puede ser atribuida a errores en el control de ingredientes ya que esta es la determinación que presentó menor coeficiente de variación por lo que es válida estadísticamente.

Para el caso de los carbohidratos se presentó una subestimación, pero tal y como se menciona en la metodología el cálculo del contenido de carbohidratos se realizó por diferencia, con respecto a el resto de las determinaciones.

Para el contenido de humedad y cenizas, no se contó con los valores estimados por el productor. Sin embargo los resultados de las determinaciones realizadas dan confiabilidad por los valores de coeficiente de variación obtenidos en ambas metodologías.

Con los resultados antes mencionados se encontró que las diferencias entre los valores reportados y los valores estimados experimentalmente pueden deberse a errores en el control de ingredientes o bien a un procedimiento de mezclado deficiente.

De los resultados obtenidos por el análisis proximal, se destaca que por el contenido de lípidos (12.0%), carbohidratos (62.3%) y de proteínas (18.5%), el alimento en su forma deshidratada presenta susceptibilidad al deterioro químico de estos componentes durante el almacenamiento, y posibilidad de que tomen lugar entre ellos numerosas reacciones de interacción. Al ser un producto con alto contenido de lípidos y humedad del 4%, las reacciones que se ven favorecidas son las de oxidación.

La magnitud de los cambios dependerá esencialmente de los factores como la temperatura y la concentración de oxígeno.

3.2 RESULTADOS SEGUNDA ETAPA: CONDICIONES DEL ESTUDIO

3.2.1 METODOLOGIA PARA LA EVALUACION DEL DETERIORO DE LOS LIPIDOS

La curva se realizó de acuerdo al método colorimétrico (Gray, 1978).

Las pruebas se corrieron por triplicado y a su vez cada tubo fue leído por duplicado. Los resultados presentaron coeficiente de variación promedio menor al 10 %.

$$y = 0.0326x - 0.045$$

El coeficiente de correlación fue 0.9922 por lo que se consideró aceptable.

3.2.2 DETERMINACION DE VITAMINA A

En la selección de la metodología que nos permitiera evaluar la vitamina A, se encontró que siguiendo la metodología de la extracción selectiva propuesta por Qian, la cual no expone a la vitamina a tratamientos con temperaturas elevadas, se logró un porcentaje de recuperación menor al 50%.

Los resultados que se muestran en la tabla 3, y de acuerdo con éstos se consideró que era necesario variar las condiciones de extracción, a fin de mejorar el porcentaje de recuperación. Para lo cual se modificó la relación sobrenadante concentrado, así como también se incluyó una segunda la extracción.

Adicionalmente se modificó la longitud de onda de 290 a 325 nm lo cual tuvo como consecuencia un incremento en la sensibilidad del método. Esta fue la longitud de trabajo de lo siguientes ensayos.

MUESTRA	RELACION SOBRENADANTE/ CONCENTRADO	OBSERVACIONES HPLC FASE NORMAL
1g	1mL/0.3mL	No se obtiene señal. $\lambda=290\text{nm}$
1g	2mL/0.3mL	La muestra no da señal. En las muestras con estándar se tiene el 42.28% de recuperación. $\lambda=290\text{nm}$.
1g	4mL/0.3mL	Se cambió a $\lambda=325\text{nm}$. La muestra sola no da señal. En las muestras con estándar se tiene el 57.37% de recuperación.

Tabla 3. DETERMINACION DE VITAMINA A, EXTRACCIÓN EN FRÍO.

Se consideró cambiar el esquema de extracción de la vitamina A, debido a que la extracción directa sobre la fórmula láctea mostró porcentaje de recuperación bajo.

Se realizó un ensayo en el cual la extracción de la vitamina se efectuó en la grasa. Para lo cual se extrajo por el método de Roesse-Glottieb en el cual no se requiere de temperaturas elevadas, las cuales pudieran ocasionar pérdida dada la naturaleza de la vitamina.

En esta etapa también se realizó un ensayo en el cual se determinó el disolvente que permitió una mejor separación de los componentes presentes en la grasa, después de realizada la extracción de la vitamina.

Al comparar el tiempo de retención obtenido para las muestras y el estándar, se observó una diferencia de 4 minutos, por lo que no se considera que las señales obtenidas sean debidas a la vitamina A.

Además por el hecho de obtenerse cromatogramas con muchas señales y mal definidos sugiere que se está analizando en el límite de detección. Los resultados se presentan en la tabla 4.

MUESTRA	GRASA(G)	DISOLVENTE (1 ML)	TIEMPO DE RETENCION	OBSERVACIONES
A1	0.0560	n-butanol	38.30	Señal sin definición
A2	0.0550	Hexano	36.30	Muchas señales, mal definidas
A3	0.0507	Éter	41.38	Señal sin definición
estándar	515.16UI/mL	n-Butanol	30.60	Señal bien definida.

Tabla 4 DETERMINACION DE VITAMINA A, A PARTIR DE GRASA EXTRAIDA POR METODO DE ROESE-GLOTTIEB

Posteriormente, se varió la cantidad de muestra con la finalidad de tener una mayor concentración de vitamina. Los resultados se describen en la tabla 5

PRUEBA	CANTIDAD DE MUESTRA (G)	RELACION SOBRENADANTE/ CONCENTRADO	OBSERVACIONES HPLC FASE NORMAL
1	10	10mL/1mL	La muestra da una señal mal definida y muy pequeña. Las muestras con estándar tienen el 50.22% de recuperación.
2	30	30mL/2mL	Demasiada muestra, se dificulta la extracción, y da una señal pequeña y mal definida. Las muestras con estándar con el 43.97% de recuperación.
3 TRIPLE EXTRACCION	10	90mL/1mL	Muestras dan señal pequeña, sin definición. Las muestras con estándar con el 50% de recuperación.

Tabla 5 DETERMINACION DE VITAMINA A, EMPLEANDO PARA LA EXTRACCION DIFERENTES CANTIDADES DE MUESTRA

Con los resultados anteriores se demostró que la eficiencia de la extracción es cercana al 50%, por lo cual no se puede considerar a esta metodología como válida. Además de que se comprobó que aun empleando mayor cantidad de muestra no se incrementaba al nivel de recuperación.

Por lo anterior, se trabajó con la metodología propuesta por Albalá-Hurtado, 2000, la cual incluye la etapa de saponificación en frío.

Se realizaron ensayos de extracción con la muestra y la muestra adicionada con estándar, para determinar el porcentaje de recuperación de la vitamina, los resultados obtenidos se reportan en la tabla 6. Promedio de tres repeticiones.

MUESTRA	UI / 100 G DE MUESTRA	COEFICIENTE DE VARIACION
1	917.20	8.37
2	737.61	13.88
3	859.81	0.826

Tabla 6. DETERMINACION DE VITAMINA A, POR EL METODO QUE INCLUYE SAPONIFICACION.

A partir de las muestras a las que se les adicionó estándar se calculó el porcentaje de recuperación el cual fue del 81.5, con coeficiente de variación menor al 5%.

Los resultados se expresan en UI de vitamina A / 100 g de muestra, empleando para su cuantificación factor de respuesta. Sin embargo para poder expresar los resultados del monitoreo fue necesario realizar una curva patrón, sometiendo el estándar a las mismas condiciones que las muestras problemas. En la figura 7 se presenta un registro típico en donde se aprecia la definición de la señal correspondiente al retinol.

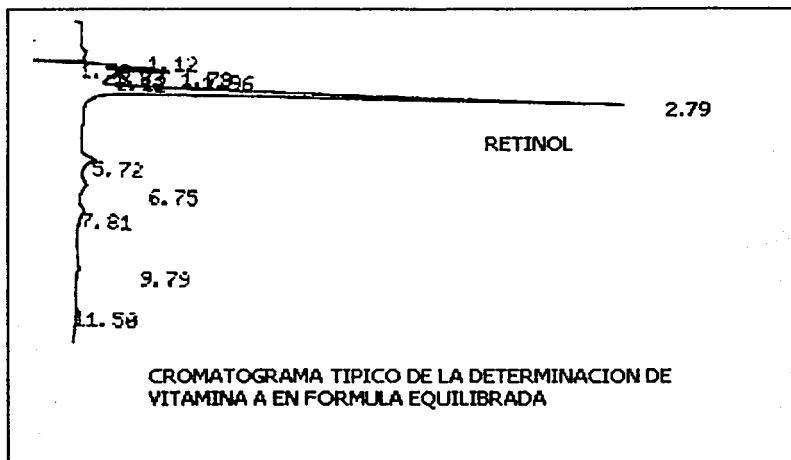


FIGURA 7 CROMATOGRAMA DE LA VITAMINA

CURVA ESTANDAR

En la tabla 7 (ver anexo) se reportan los valores promedio (triplicado) y los coeficientes de variación para cada concentración de la curva para la cuantificación de vitamina A.

$$y = 8950x + 170894$$

$$R^2 = 0.9969$$

Finalmente al comparar las dos metodologías estudiadas, se optó por elegir la metodología que incluye etapa de saponificación. Esta presentó el porcentaje de recuperación mayor y resultó reproducible, lo cual permite una mejor aproximación al contenido real de vitamina en las muestras.

3.2.3 CUANTIFICACIÓN DE LA VITAMINA C

Para efectuar la cuantificación de ácido ascórbico se realizó una curva estándar.

$$y = 754.78x + 0.0028$$

Para la curva estándar se realizaron inyecciones en el cromatógrafo por cuadruplicado, para cada concentración. El coeficiente de variación promedio fue menor al 4 %, por lo que los valores obtenidos son estadísticamente aceptados y se considera que la linealidad de la gráfica es aceptable ($R = 0.998$).

En la figura 8 se muestra un registro típico en el cual se observan las señales correspondientes al ácido ascórbico y al ácido dehidroascórbico, debido a la buena resolución que proporciona el método.

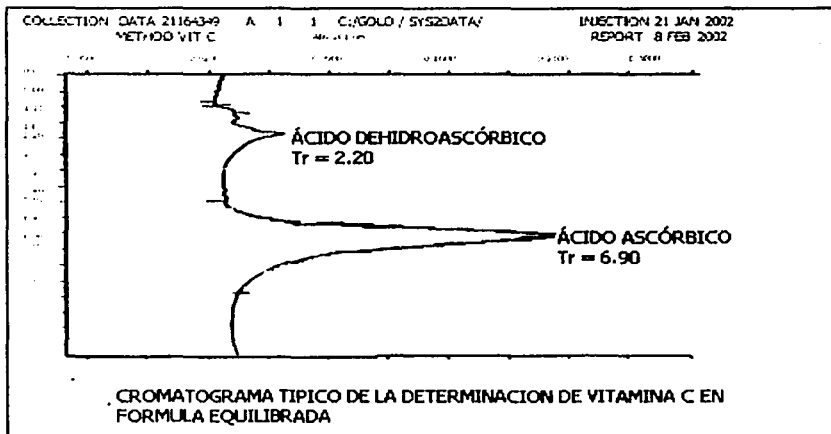


FIGURA 8 EJEMPLO DE CROMATOGRAMA, DETERMINACION DE VITAMINA C

3.2.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE

Para el análisis de proteína soluble se realizó una curva de calibración por duplicado usando Caseinato de sodio.

La curva estándar de Caseinato de sodio se realizó triplicado de cada tubo y a su vez estos fueron leídos por duplicado, de donde se obtuvo un coeficiente de variación promedio menor al 3 %.

$$y=0.7399x - 0.0881$$

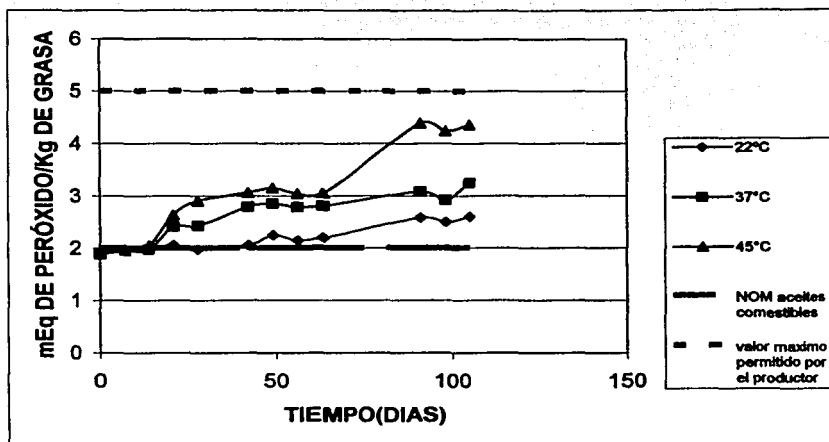
La linealidad de la curva es aceptable, 0.9995, para poder interpolar los resultados de las determinaciones de proteína soluble durante el monitoreo del producto.

3.3 RESULTADOS TERCERA ETAPA MONITOREO DE ESTABILIDAD DEL PREPARADO

3.3.1 DETERIORO DE LOS LIPIDOS

Los resultados del deterioro oxidativo de lípidos se presentan en las gráficas 1 y 3.

Los resultados correspondientes al monitoreo con respecto a la formación de peróxidos se presentan en el anexo 1a.



Gráfica 1 EVOLUCION DEL INDICE DE PEROXIDOS EN FORMULA EQUILIBRADA ALMACENADA A DIFERENTES TEMPERATURAS, las determinaciones presentaron coeficiente de variación menor al 5 %.

En el análisis correspondiente al tiempo cero (día de elaboración), se observa que el nivel de peróxidos es muy cercano a 2mEq / Kg de grasa, lo cual mantiene al producto dentro de la especificación recomendada en las NOM para aceites comestibles. Sin embargo esta concentración de peróxidos resulta elevada considerando que se trata de un producto de recién elaborado.

En la gráfica 1 se observa para las tres temperaturas de estudio un periodo de inducción de 14 días, en el cual la velocidad de formación de peróxidos es baja, es decir corresponde a la etapa en la cual se están formando los radicales libres suficientes para poder iniciar la etapa de propagación y por lo tanto la rapidez de formación de peróxidos que es producto cuantificado **no** es proporcional al tiempo de almacenamiento, ni se ve influenciada por la temperatura de almacenamiento, este comportamiento se explica por la presencia de

antioxidante, cuya finalidad es la de prolongar el periodo de inducción en el producto.

Para las muestras almacenadas a 22°C el cambio de pendiente se da después de los 35 días de almacenamiento, mientras que para las muestras almacenadas a 37 y 45 grados el cambio de pendiente se da a partir del día 28 de almacenamiento, esto confirma el hecho de que la formación de peróxidos, productos de oxidación primarios, se ve favorecida al aumentar la temperatura de almacenamiento de la formulación.

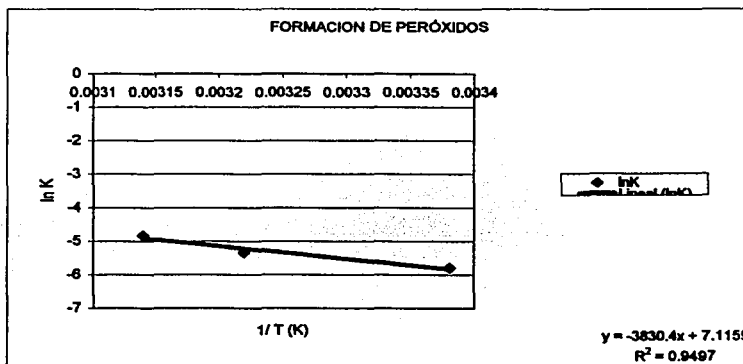
Para el estudio se consideró 5 mEq de peróxido como el valor máximo recomendado dada la funcionalidad esperada para el producto, debido a que en el periodo de propagación se generan radicales lipídicos altamente reactivos capaces de atacar moléculas adyacentes como las proteínas. Esto favorece el aumento de reactividad de estas moléculas por el hecho de poder presentarse interacciones entre ellas que generen enlaces entrecruzados, que se traduce en cambios en las propiedades funcionales de las proteínas tales como pérdida de solubilidad y reducción de la biodisponibilidad.

De los resultados antes mostrados se observa que la formación de peróxidos evoluciona de manera exponencial conforme avanza el tiempo de almacenamiento, es decir tienen comportamiento cinético de orden uno. En esta etapa la velocidad de formación de peróxidos es mayor que la velocidad de descomposición de los mismos en productos no radicales que contribuyen de manera significativa en la generación de aromas objetables que provocan disminución de la calidad del producto y que incluso puede tener efecto en la aceptación del consumidor. Así como ser un factor de riesgo por la toxicidad

que pudieran presentar los productos secundarios de oxidación entre los cuales destacan los aldehídos.

PARAMETROS CINETICOS DE LA FORMACION DE PEROXIDOS

De acuerdo a la cinética presentada, es decir de orden uno, se calcularon los parámetros cinéticos para las tres temperaturas y se muestran en la tabla 8 en donde se presentan la constante de velocidad y el tiempo estimado para que el producto salga de especificación al encontrarse en el intervalo de temperatura de 5 a 50 °C.



Gráfica 2 TRATAMIENTO DE ARRHENIUS, PARA LA REACCION DE FORMACION DE PEROXIDOS EN FÓRMULA EQUILIBRADA

Con los parámetros cinéticos determinados y con el manejo de Arrhenius, es decir graficando el logaritmo de la constante en función del inverso de la temperatura (en escala absoluta), mostrado en la gráfica 6, se puede estimar el comportamiento del producto a cualquier temperatura de almacenamiento, ya que se permite la extrapolación.

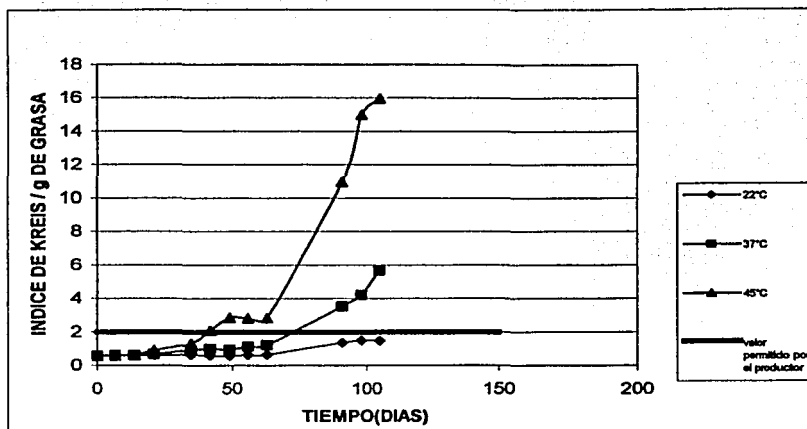
Temperatura (°C)	K (días ⁻¹)	Tiempo estimado para alcanzar 5 MeQ de peróxido/ kg de grasa (días)
5	1.31×10^{-3}	741
10	1.65×10^{-3}	588
15	2.07×10^{-3}	469
20	2.61×10^{-3}	372
25	3.29×10^{-3}	295
30	3.98×10^{-3}	243
35	5.02×10^{-3}	193
40	6.07×10^{-3}	160
45	7.36×10^{-3}	132
50	8.91×10^{-3}	109

Tabla 8 PARAMETROS CINETICOS DE LA REACCION DE FORMACION DE PEROXIDOS, EN FORMULA EQUILIBRADA.

FORMACION DE PRODUCTOS SECUNDARIOS

La cuantificación de los productos secundarios de oxidación se realizó por medio del Índice de Kreis, en donde se cuantifican los grupos carbonilos presentes en el medio ya que en su mayoría los productos de oxidación secundaria son aldehídos y cetonas.

Los resultados correspondientes al monitoreo se presentan en el anexo 1b.



Gráfica 3 EVOLUCION DE LA FORMACION DE PRODUCTOS SECUNDARIOS, EN FORMULA EQUILIBRADA ALMACENADA A DIFERENTES TEMPERATURAS. Las determinaciones presentaron en promedio coeficiente de variación menor al 10 %.

En cuanto a la formación de productos secundarios, generados por el mecanismo de autooxidación lipídica en la formulación, en la gráfica 3 se observa que es a partir de los 35 días cuando se registra el cambio de pendiente para la temperatura de 45°C, mientras que para las temperaturas de 37 y 22 °C éste se presenta en el día 63 de forma más clara.

Es decir es después de estos puntos cuando la velocidad de descomposición de peróxidos supera a la velocidad de formación de los mismos. Lo que permite observar con claridad el efecto de la temperatura de almacenamiento, y confirmar que este parámetro influye directamente en las reacciones que están involucradas en la degradación oxidativa del material lipídico.

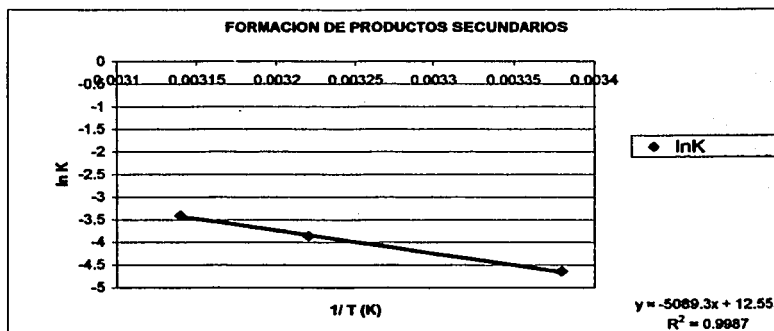
Lo que confirma que la descomposición de los peróxidos se da paralelamente a la formación de los mismos, y que por el hecho de ser una reacción

autocatalítica la generación de productos secundarios es un buen indicador de que el proceso de oxidación avanza aunque no se registre un incremento significativo en la concentración de peróxidos.

PARAMETROS CINETICOS DE LA FORMACION DE PRODUCTOS SECUNDARIOS

Hasta el día 35 la rapidez de formación de productos secundarios (generados según el mecanismo de autooxidación por la descomposición de los peróxidos) aun no rebasa a la rapidez de formación de peróxidos en el alimento, es después de esta fecha cuando se observa que la formación de productos secundarios de oxidación evoluciona de forma exponencial con respecto al tiempo de almacenamiento, es decir sigue una cinética de primer orden. Esto indica que la calidad química del producto se reduce de manera significativa dado que la presencia de radicales libres crea un medio altamente reactivo en donde es factible que se presenten reacciones de los productos secundarios con las proteínas por lo que se pueden dar reacciones de obscurecimiento no enzimático, las cuales modifican la apariencia del producto, dando características no deseables. Además de otras modificaciones químicas y biológicas que se presentan en las proteínas.

Con el manejo de Arrhenius, gráfica 4, se puede obtener un estimado del comportamiento de la fórmula en cuanto a la formación de productos secundarios a cualquier temperatura de almacenamiento.

**Grá**

figa 4 TRATAMINETO DE ARRHENIUS, PARA LA FORMACION DE PRODUCTOS SECUNDARIOS EN FORMULA EQUILIBRADA

El establecimiento del orden de la reacción nos permite conocer los parámetros cinéticos, los cuales se muestran en la tabla 9, en donde el tiempo de vida media se refiere al tiempo aproximado en que se tendrá un valor de dos para el índice de Kreis, como un parámetro de calidad recomendado por el productor para el producto en particular y se incluye la constante de reacción correspondiente para un intervalo de 5 a los 50 °C.

TEMPERATURA (°C)	K(DIAS ⁻¹)	TIEMPO ESTIMADO PARA ALCANZAR INDICE DE KREIS DE 2 (LIMITE DETERMINADO)(DIAS)
5	3.28x10 ⁻³	309
10	4.46 x10 ⁻³	280
15	6.05 x10 ⁻³	206
20	8.21 x10 ⁻³	152
25	0.01115	112
30	0.0143	87
35	0.0195	64
40	0.0250	50
45	0.0325	38
50	0.0418	30

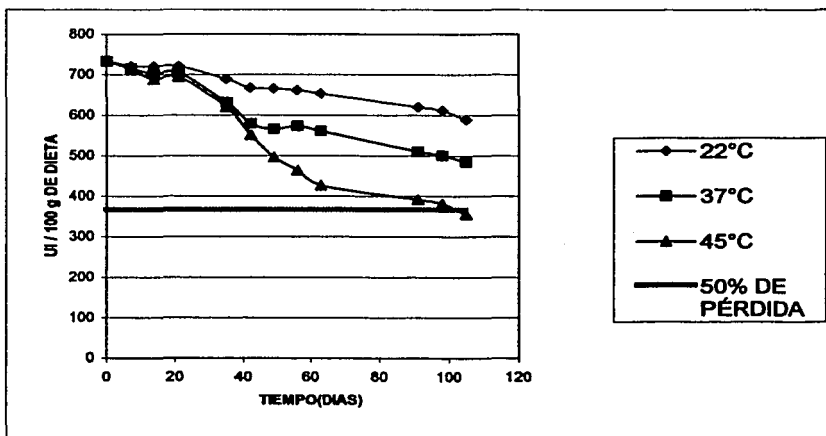
Tabla 9 PARAMETROS CINETICOS DE LAS REACCIONES INVOLUCRADAS EN LA FORMACION DE PRODUCTOS SECUNDARIOS DE OXIDACION, EN FORMULA EQUILIBRADA.

3.3.2 EVOLUCION DE LA VITAMINA A

La pérdida de la vitamina A, durante el monitoreo se presenta en la gráfica 5.

Al tiempo inicial se observa que la cantidad determinada es menor a la reportada en etiqueta, (1028 UI/ 100g), lo cual puede deberse a problemas en el control de ingredientes o bien a problemas de homogeneización, frecuentes en los productos en polvo, y se ven reflejados en las variaciones encontradas en el análisis proximal.

Los resultados correspondientes al monitoreo se presentan en el anexo 1c.



Gráfica 5 EVOLUCION DEL DETERIORO DE LA VITAMINA A EN FORMULA EQUILIBRADA ALMACENADO A DIFERENTES TEMPERATURAS. La determinación presento en promedio coeficiente de variación de 6 %.

De los resultados mostrados en la gráfica 5 se observa que hasta el día 28, se ajustaría a un modelo cinético de orden cero en donde la pérdida del

nutrimento fue constante a lo largo del tiempo y no depende de la concentración del mismo.

Este comportamiento se justifica por la presencia de antioxidante en el producto que protege a la vitamina del fenómeno de cooxidación frente al cual es susceptible por su naturaleza isoprenoide. Esto coincide con los resultados reportados anteriormente con respecto a la estabilidad química del material lipídico de la formulación.

Los resultados concuerdan con los encontrados en investigaciones recientes sobre la estabilidad de las vitaminas en leches líquidas infantiles, Albalá-Hurtado (2000), los cuales muestran que la vitamina A se mantiene estable , durante 12 meses, cuando es almacenada a 20 y 30 °C, mientras que las muestras almacenadas a 37 °C, durante el mismo periodo, muestran pérdida del 34 %.

A partir del día 35 es donde se puede apreciar claramente que al aumentar la temperatura de almacenamiento el deterioro es mayor conforme avanza el tiempo de almacenamiento, lo cual es congruente con los resultados mostrados en la estabilidad de los lípidos a los fenómenos de oxidación puesto que es después del día 28 donde se presentan cambios en la formación de peróxidos y es a partir del día 35 que se observa con claridad la influencia de la temperatura en la rapidez de formación de los productos secundarios de oxidación, es decir que la pérdida del nutrimento se ajusta a la cinética de primer orden, en donde la pérdida del nutrimento está en función de la cantidad de éste en la muestra y del tiempo.

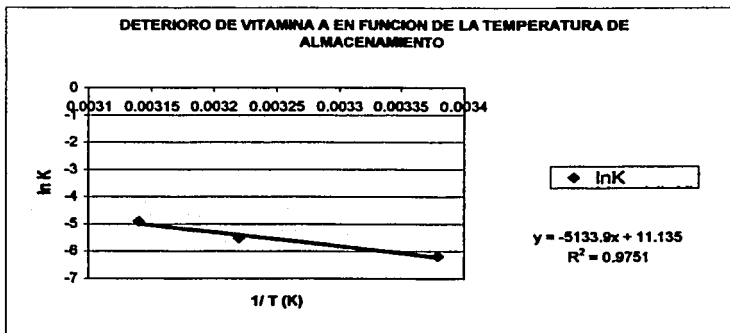
Lo cual concuerda con lo realizado por Albalá-Hurtado (2000) en una fórmula infantil en polvo donde la vitamina A muestra relación logarítmica con respecto al tiempo de almacenamiento cuando ésta se encuentra a 37°C, es decir el comportamiento corresponde a una cinética de primer orden.

En las muestras almacenadas a 45 °C se presentó al finalizar el estudio un porcentaje de retención del 48.55 %, lo cual concuerda con los resultados encontrados por Woollard (1985) sobre la estabilidad de la vitamina A en leches ultra pasteurizadas y fortificadas, las cuales al ser almacenadas a 45 °C durante 7 meses presentaron el 60 % de pérdida de la vitamina.

Las muestras almacenadas a 22 y 37 °C al finalizar el monitoreo presentaron 80 y 66 % de retención respectivamente. Estos resultados son comparables con los encontrados por Frias (2001) sobre la estabilidad de vitaminas A y E en fórmulas para alimentación enteral, donde muestran que la estabilidad de la vitamina a 4, 20 y 30 °C, durante los primeros tres meses de almacenamiento es aceptable, observándose disminución en el contenido de la vitamina a niveles bajos posiblemente por la presencia de oxígeno en las fórmulas. En las cuales después de los 6 o 9 meses la vitamina A decrece de forma considerable, junto con las otras vitaminas liposolubles, de entre las cuales la más labil fue la vitamina A.

PARAMETROS CINETICOS DE LA PÉRDIDA DE VITAMINA A

Con base en el tratamiento de Arrhenius, grafica 6, para las tres temperaturas estudiadas, se conoce que la pérdida de vitamina A se comporta de la siguiente manera.



Gráfica 6 TRATAMIENTO DE ARRHENIUS PARA EL DETERIORO DE VITAMINA A, EN FORMULA EQUILIBRADA

La determinación del orden de la reacción permite conocer los parámetros cinéticos de dicha reacción, los cuales se presentan en la tabla 10, en donde se incluye la constante de reacción, el tiempo estimado para que se presente el 90% de pérdida del nutrimento y el tiempo de vida media del mismo.

TEMPERATURA (°C)	K(DIAS ⁻¹)	TIEMPO DE VIDA MEDIA (DIAS)	TIEMPO ESTIMADO PARA QUE SE DE EL 90% DE PÉRDIDA(DIAS)
5	6.78×10^{-4}	1022	3396
10	9.23×10^{-4}	751	2495
15	1.25×10^{-3}	554	1840
20	1.70×10^{-3}	408	1353
25	2.32×10^{-3}	299	991
30	3.00×10^{-3}	231	767
35	4.09×10^{-3}	169	562
40	5.28×10^{-3}	131	436
45	6.83×10^{-3}	101	337
50	8.83×10^{-3}	78	260

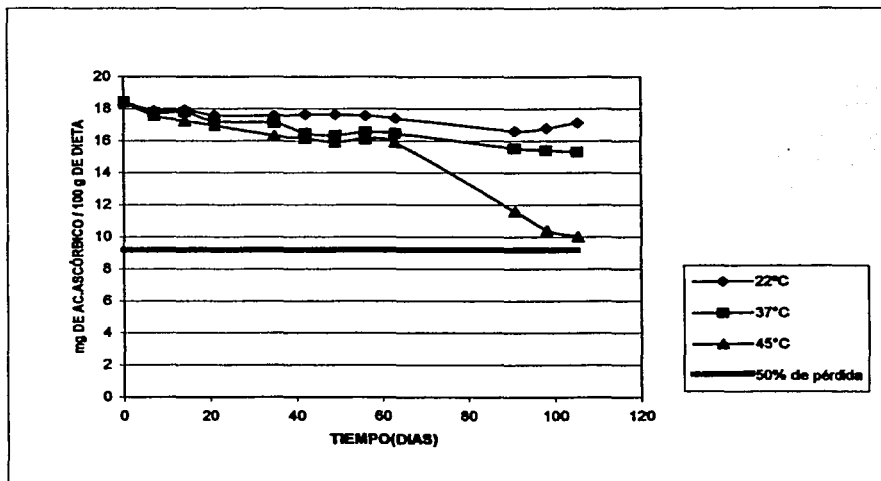
Tabla 10 PARAMETROS CINETICOS PARA LA PERDIDA DE VITAMINA A, DURANTE EL TIEMPO DE ESTUDIO, PARA UN ALIMENTO PARA REGIMENES ESPECIALES.

3.3.3 DETERIORO DE LA VITAMINA C.

Los resultados correspondientes al monitoreo del deterioro de la vitamina C se presentan en la gráfica 7.

Es importante mencionar que el contenido inicial de vitamina es ligeramente menor que lo reportados en etiqueta (20 mg), lo cual puede deberse a problemas en el control de ingredientes o bien a problemas en el proceso de homogeneización que concuerda con los resultados mostrados para el análisis proximal y la vitamina A.

Los resultados correspondientes al monitoreo experimental se presentan en el anexo 1d.



Gráfica 7 EVOLUCION DE LA PERDIDA DE VITAMINA C EN FORMULA EQUILIBRADA ALMACENADA A DIFERENTES TEMPERATURAS. Las determinaciones presentaron coeficiente de variación promedio de 3 %.

Para las muestras almacenadas a 22°C se observa que la pérdida de vitamina C es mínima, mostrando al finalizar el monitoreo el 93 % de retención del nutrimento, es decir la pérdida de la vitamina no es proporcional al tiempo de almacenamiento.

Para la temperatura de 37 °C el cambio de pendiente se presenta a partir del día 42, en donde se da paralelamente la generación de una mayor cantidad de compuestos secundarios de oxidación que pueden participar en las reacciones de obscurecimiento no enzimático además de los aldehídos presentes de los carbohidratos que forman parte de la formulación, es decir la pérdida de ácido ascórbico se debe a las condiciones de reactividad del medio, para estas muestras se presentó al finalizar el estudio el 83 % de retención de la vitamina.

Para la temperatura de 45 °C se observa que la pérdida del nutrimento es proporcional al avance del tiempo de almacenamiento, presentando el 54 % de retención al finalizar el monitoreo, con lo que se confirma la influencia que el medio altamente reactivo tiene sobre el ácido ascórbico, ya que éste puede participar en las reacciones de obscurecimiento no enzimático cuando se encuentran en el medio aminoácidos y compuestos carbonílicos. (Howell, 1995)

Lo cual concuerda con el marcado cambio de pendiente que se presenta con respecto a las otras temperaturas estudiadas, que se puede deber a la influencia de la temperatura para que se presenten reacciones de formación de peróxidos y de formación de productos secundarios de oxidación.

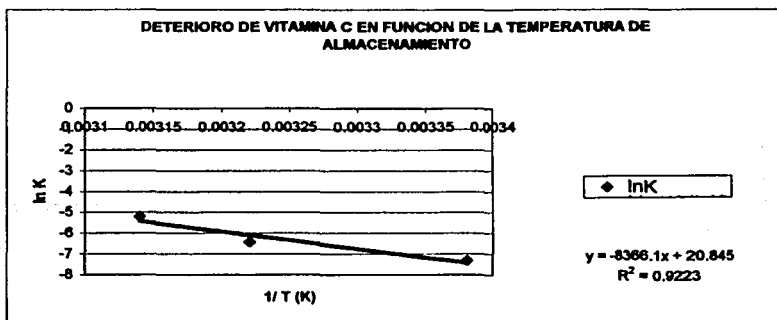
Con los resultados antes mencionados se determinó que para la formulación en estudio la pérdida de vitamina C presentó un comportamiento cinético de orden

uno, lo cual coincide con lo reportado por Singh (1976): El Deterioro de la vitamina C muestra generalmente una cinética de primer orden en los sistemas alimenticios.

Un estudio de Albalá-Hurtado (2000) sobre la estabilidad de las vitaminas en leches infantiles, almacenadas a 20, 30 y 37 °C, muestra que el contenido de vitaminas hidrosolubles presenta un cambio del 9 % en promedio para las tres temperaturas, durante un año.

PARAMETROS CINETICOS DE LA PÉRDIDA DE VITAMINA C

Con base al tratamiento de Arrhenius, se conoce que la pérdida de vitamina C, se comporta como se muestra en la gráfica 8. A partir de la cual se puede conocer el comportamiento de la pérdida de la vitamina a diferentes temperaturas.



Gráfica 8 TRATAMIENTO DE ARRHENIUS PARA EL DETERIORO DE VITAMINA C EN FORMULA EQUILIBRADA

Una vez establecido el orden de reacción para cada una de las temperaturas, se determinaron los parámetros cinéticos, los cuales se muestran en la tabla 11, en donde se presenta la constante de reacción para varias temperaturas además del tiempo estimado para que se presente el 90 % de pérdida del nutrimento y la vida media del producto considerando al nutrimento como indicador de calidad.

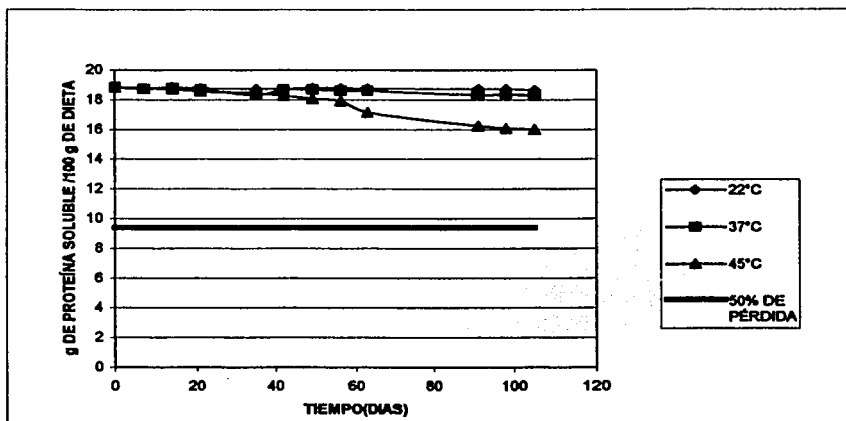
TEMPERATURA (°C)	k(DIAS ⁻¹)	TIEMPO DE VIDA MEDIA (DÍAS)	TIEMPO ESTIMADO PARA QUE SE DE EL 90% DE PÉRDIDA(DÍAS)
5	1.02×10^{-4}	6794	22549
10	1.68×10^{-4}	4125	13690
15	2.78×10^{-4}	2493	8273
20	4.60×10^{-4}	1506	5000
25	7.60×10^{-4}	912	3026
30	1.15×10^{-3}	603	2000
35	1.9×10^{-3}	365	1210
40	2.9×10^{-3}	239	793
45	4.4×10^{-3}	157	522
50	6.69×10^{-3}	104	343

Tabla 11. PARAMETROS CINÉTICOS DE LA PERDIDA DE VITAMINA C, DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIO, EN FORMULA EQUILIBRADA.

3.3.4 SOLUBILIDAD PROTEÍNIC.A.

Los resultados del monitoreo de la pérdida de la solubilidad proteínica de la dieta almacenada a diferentes temperaturas se muestran en la gráfica 9.

Los resultados correspondientes al monitoreo se presentan en el anexo 1e.



Gráfica 9 EVOLUCION DE LA PERDIDA DE SOLUBILIDAD PROTEINICA EN FORMULA EQUILIBRADA ALMACENADA A DIFERENTES TEMPERATURAS. La determinación presento coeficiente de variación promedio de 3 %.

De los resultados mostrados en la gráfica 9, se observa que hasta el día 21, la pérdida de solubilidad proteínica para las tres temperaturas se mantiene constante, lo cual es congruente con el periodo de inducción de la reacción de formación de peróxidos, después del cual se presenta el aumento en la generación de radicales libres. En esta etapa es factible que se presente la formación de compuestos capaces de interactuar con las proteínas generando así radicales proteínicos, por lo que se pueden presentar enlaces entrecruzados que cambiarán las propiedades funcionales de las proteínas entre ellas la solubilidad.

Para las muestras almacenadas a 22°C se observa que durante todo el periodo de estudio la pérdida de solubilidad proteínica es mínima, ligeramente mayor al 1 %, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para las reacciones de oxidación del material lipídico y la pérdida de el ácido ascórbico, los cuales pueden relacionarse con los cambios presentados en las proteínas.

En tanto que para las muestras almacenadas a 37 y 45 grados a partir del día 35 se observan cambios en la pendiente, los cuales pueden deberse a varios factores entre los que se encuentran: las interacciones entre proteínas por la generación de radicales proteínicos que favorecen la formación de enlaces entrecruzados. O bien por las interacciones entre las proteínas y los grupos carbonilos de los carbohidratos o bien de los productos secundarios de oxidación del material lipídico es decir, la reacción de Maillard. Además de las interacciones que se pueden dar por la presencia de radicales libres ya sea los

generados por los procesos de autooxidación lipídica o bien los generados por compuestos como el ácido ascórbico.

Para las muestras almacenadas a 37 y 45 °C los porcentajes de pérdida de solubilidad proteínica fueron de 3 y 15 % respectivamente, con lo que se hace más claro la influencia de la temperatura en la reactividad del medio.

En los estudios de Hewendy, 1994, y Morales, 1998, la evolución de los derivados de furfural durante el almacenamiento de una formula infantil muestran una amplia gama de valores atribuibles a las diferencias en la calidad de las materias primas, observándose disminución en los niveles de lisina con lo que se presenta reducción en la calidad nutricional.

En un estudio de Ferrer, en fórmulas infantiles almacenadas a 20 y 37 °C , durante 6 meses, se observó que la pérdida de lisina disponible es de 16 % sin presentar diferencia significativa y no detección de compuestos derivados del furfuraldehído, registrándose un incremento en la concentración de HMF de 0.34 a 0.77 mg /100 g de proteína. (Ferrer, 2000)

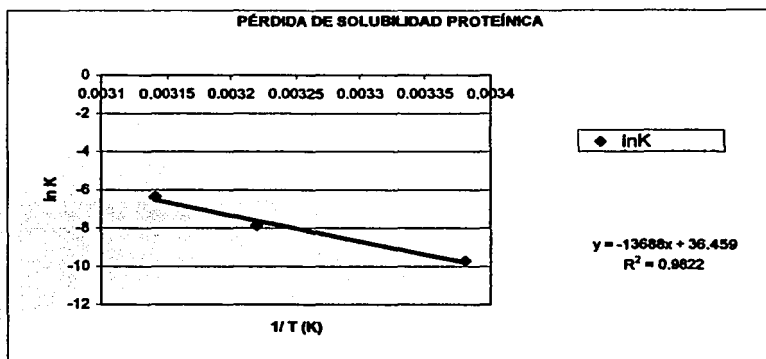
En los estudios de Evangelisti *et al* de 1998, se reporta que para leches UHT expuestas a temperaturas elevadas se presentó disminución en el contenido de lisina y variaciones en el contenido de carbohidratos, que se manifiesta en disminución en la calidad nutricional de las leches estudiadas.

Con los resultados encontrados se comprueba el efecto adverso de la reacción de Maillard en la calidad nutricional de productos lácteos y similares, lo cual concuerda con lo reportado en 1977 por Möller *et al*, en donde se reporta la presencia de compuestos como la lactulosil-lisina, que inducen a cambios en la

estructura proteínica, lo cual dificulta la hidrólisis de péptidos durante el proceso digestivo.

PARAMETROS CINÉTICOS DE LA PÉRDIDA DE SOLUBILIDAD PROTEÍNICA

Con base en el tratamiento de Arrhenius se tiene que, la pérdida de solubilidad proteínica se presentara como se indica en la gráfica 10.



Gráfica 10 TRATAMIENTO DE ARRHENIUS PARA LA PERDIDA DE SOLUBILIDAD PROTEINICA EN FORMULA EQUILIBRADA

TEMPERATURA (°C)	K(DÍAS ⁻¹)	TIEMPO DE VIDA MEDIA (DÍAS)	TIEMPO ESTIMADO PARA QUE SE DE EL 90% DE PÉRDIDA(DÍAS)
5	1.60×10^{-5}	43331	143750
10	2.89×10^{-5}	23979	79584
15	5.24×10^{-5}	13200	43893
20	9.46×10^{-5}	7326	24312
25	1.70×10^{-4}	4076	13529
30	2.76×10^{-4}	2510	8333
35	4.96×10^{-4}	1397	4637
40	8.03×10^{-4}	795	2864
45	1.29×10^{-3}	537	1782
50	2.07×10^{-3}	334	1111

Tabla 12. PARAMETROS CINÉTICOS DE LA PERDIDA DE SOLUBILIDAD PROTEINICA, EN FORMULA EQUILIBRADA

Con base en el orden cinético determinado para cada una de las temperaturas de estudio se establecieron los parámetros cinéticos que se presentan en la tabla 12, en donde se presenta la constante de reacción a diferentes temperaturas y los tiempos de vida media, así como el tiempo estimado a cada temperatura para que se presente el 90 % de pérdida de solubilidad proteínica.

El parámetro de vida media es muy importante en este caso porque la solubilidad proteínica del producto esta directamente relacionada con su capacidad de hidratación y dispersión.

Debido a que la solubilidad proteínica se relaciona directamente con la digestibilidad de las proteínas esta determinación adquiere mayor importancia. (Cheftel, 1993)

3.3.5 DETERMINACION DE ENERGIAS DE ACTIVACION.

Con los resultados anteriores se observa que todas las reacciones involucradas en el deterioro químico del producto, se ajustan a la cinética de primer orden. (Oxidación del material lipídico, Pérdida de vitaminas A y C y Pérdida de solubilidad proteínica)

Con lo cual con base en la ecuación de Arrhenius: Al graficar $\ln k$ en función $1/T$ (K) se puede determinar la energía de activación. Definida como la pendiente de dicha gráfica:

$$m = E_A / R$$

En donde se puede sustituir R, constante de los gases, (1.98 cal / K mol), para determinar la energía de activación, las cuales se presentan en la tabla 13,

REACCION	E_A (CAL / MOL)
FORMACIÓN DE PERÓXIDOS (OXIDACIÓN)	7584.19
FORMACIÓN DE PRODUCTOS SECUNDARIOS (OXIDACION)	10076.81
PÉRDIDA DE VITAMINA A	10165.12
PÉRDIDA DE VITAMINA C	16564.87
PÉRDIDA DE SOLUBILIDAD PROTEÍNICA	27102.24

TABLA 13 ENERGÍAS DE ACTIVACION DE LAS REACCIONES MONITOREADAS, PARA FORMULA EQUILIBRADA ALMACENADA A DIFERENTES TEMPERATURAS

Al comparar las energías de activación determinadas, se puede saber que la reacción que se dará con mayor facilidad es la formación de peróxidos por ser la reacción que presenta menor energía de activación. Lo cual concuerda con los resultados experimentales anteriormente discutidos en donde se observó que por la concentración inicial de mEq de peróxido por kilogramo de grasa y dada la naturaleza autocatalítica de la reacción, la formación de peróxidos se verá favorecida con respecto a las otras reacciones involucradas en el deterioro químico de la formulación.

Sin embargo el hecho de que se desencadene esta reacción tal y como se observó, no solo implica el deterioro del material lipídico sino que por ser un proceso mediado por radicales libres representan cambios importantes en la reactividad del medio por lo que el resto de los componentes de la formulación son afectados directamente.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se estableció una concentración menor a la reportada en etiqueta tanto para vitamina A como para la vitamina C, se recomienda poner especial atención en las operaciones de mezclado.
- Se estableció que la reacción de formación de peróxidos y la formación de productos secundarios de oxidación, para la fórmula equilibrada, se ajustan a la cinética de primer orden.
- Se comprobó que la vitamina A alcanza el 20 % de pérdida en las muestras almacenadas a 22 °C, en 105 días.
- Se comprobó que la vitamina C alcanzó el 7 % de pérdida en las muestras almacenadas a 22 °C, en 105 días.
- Se estableció que con base en la calidad química de los lípidos y considerando las recomendaciones del productor la vida útil del producto es de 3 meses a 25 °C.
- La vida de anaquel del producto está limitada por la reacción de autooxidación lipídica, por lo que sería importante para el productor, un estudio de efectividad de los antioxidantes añadidos a la formulación.
- Se estableció que la vida de anaquel máxima alcanzada por el producto es ocho veces menor a la reportada por el productor que es de 24 meses.
- De acuerdo a las condiciones climáticas que se presentan en el país se puede establecer que la fórmula tiene una vida media de 9 meses en zonas frías (10 °C) y de 2 meses en zonas cálidas (35°C).

RECOMENDACIONES

- Con respecto a la reactividad de las proteínas presentes en la matriz, sería recomendable un estudio de los cambios conformacionales que éstas presentan, por ejemplo de Calorimetría Diferencial de Barrido, para establecer si es a estos cambios a los que se debe la disminución de la solubilidad proteínica.
- Para determinar si las proteínas interactúan con otros componentes de la formulación, carbohidratos, o con los compuestos generados por los procesos de oxidación secundaria de los lípidos, aldehídos principalmente, se puede realizar un estudio cinético de la formación de compuestos coloridos como el Hidroximetil furfuraldehído o las melanoidinas.
- O bien realizar un estudio de digestibilidad de la proteína in vivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Albalá-Hurtado-A, S., Veciana-Nogués M.T., Izquierdo-Pulido M., Mariné-Font, A. 1997. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, *778*, 247-253.
- Albalá-Hurtado-B, S., Veciana-Nogués M.T., Vidal-Carou M.C. y Mariné-Font, 2000. Stability of vitamins A, E and B complex in infant milks claimed to have equal final composition in liquid and powdered form, *Journal of Food Science*, *65*, 1052-1055.
- Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogués M.T., Riero-Valls E., Mariné-Font, A. y Vidal-Carou M.C. 2000, Stability of vitamins during the storage of liquid infant milks, *Journal of Dairy Research*, *67*, 225-231.
- AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Vol. I-II, 1995
- Avery, H.E. 1982. *Cinética química básica y mecanismos de reacción*, editorial Reverté S.A., España.
- Belitz H.D., Grosh W., 1998. *Química de los Alimentos*, Acribia S.A., España
- Caric, M.; Gavarić, D.; Milanović, S. 1984, Determination of intensity of Maillard reactions in dairy products. *Special Publication-R Society Chemistry*, *9*, 303-311.

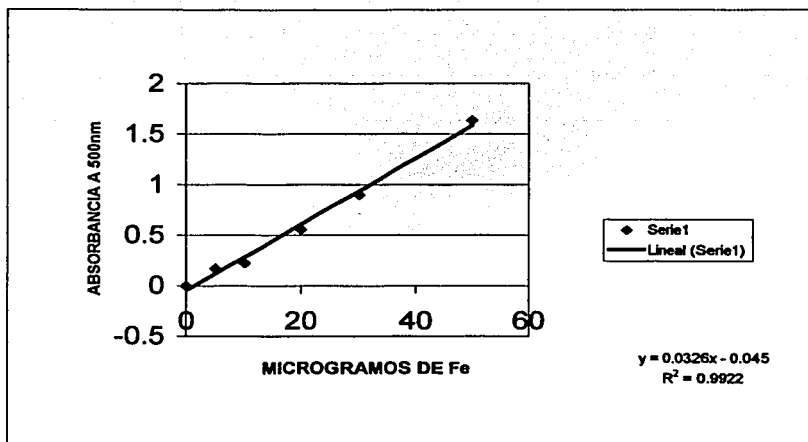
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L., y Lorient, D. 1993. Aminoácidos: péptidos y proteínas, *err.* Fennema O.R.(ed), *Química de los alimentos*, Zaragoza España
- Chung C.Y. y Toyomizu, M. 1976. Studies on browning of dehydrated foods as a function of water activity effect of Aw on browning in amino acid-lipid Systems, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 42, 697-702.
- Dalgleish, D.G., Hunt, J.A. 1995. Protein-Protein Interactions in food materials, en: Gaonkar, A.G. (ed), *Ingredient Interactions, effects on Food Quality*, USA, 199-234.
- Eitenmiller, R.R., Lander, W.O. 1995. Vitamins, en: Jean, I.J., Ikins, W.G., (eds), *Analyzing Food for Nutrition Labeling and Hazardous Contaminants*, edit. Board, USA, 195-282.
- Evangelisti, F., Calcagno, C., Nardi, S., Zunin, P., 1999. Deterioration of protein fraction by Maillard reaction in dietetic milks, *Journal of Dairy Research*, 66, 237-243.
- Ferrer, E.; Alegría, A.; Farré, R.; Abellán, P.; Romero, P. 1999. Indicators of damage of protein quality and nutritional value of milk. *Food Science. Technology. International*, 5, 447-461.
- Ferrer, E.; Alegría, A.; Farré, R.; Abellán, P.; Romero, P. 2000, Effects of thermal processing and storage on available lysine and furfural compounds contents of infant formulas. *Journal-of-Agricultural-and-Food-Chemistry*; 48 (5) 1817-1822, 27.

- Finot P.A. 1973. Chemical modifications of the food proteins incidence in their nutritive value, *Protein Seminar Biological Value, s/v*, 47-54.
- Finot, P.A. 1997. Effects of processing and storage on the nutritional value of food proteins, en: Damordaran, S., Paraf, A. (eds), *Food Proteins and Their Applications*, Marcel Dekker, Inc. USA, 551-578.
- Frias, J. y Vidal-Valverde, C. 2001. Stability of thiamine and vitamins E and A during storage of enteral feeding formula, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 2313-2317.
- Gray, J.I. 1978. Measurement of Lipid Oxidation: A Review, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 55, 539-546.
- Guo, M.R., Flynn, A. y Fox P.F. 1999. Heat-induced changes in the nutritional properties of sodium caseinate, *International Dairy Journal*, 9, 243-247.
- Haylock, S.J., Towler, C. y Hewitt, S.A. 1995. Dairy Component Interactions in Food Products, en: Gaonkar, A.G. (ed), *Ingredient Interactions, effects on Food Quality*, Marcel Dekker, Inc, USA, 295-321.
- Hewedy, M. M.; Kiesner, C.; Meissner, K.; Hartkopf, J.; Erbersdobler, H. F. 1994, Effects of UHT heating of milk in an experimental plant on several indicators of heat treatment. *Journal Dairy Research*, 61, 305-309.
- Howell, N.K. 1995. Interactions of proteins with selected small molecules, en: Gaonkar, A.G. (ed), *Ingredient Interactions, effects on Food Quality*, Marcel Dekker, Inc, USA, 269-294.

- Iturbe C.F., Laboratorio de Análisis de Alimentos, Manual de Metodologías Generales, S/A de edición ,UNAM, Facultad de Química, México D.F.
- Labuza T.P. 1971. Kinetic of lipid oxidation in foods, *CRC Critical Reviews in Food Technology*, October. 369.
- Labuza T.P. 1979. A theoretical comparison of losses in food under fluctuating temperature sequences, *Journal Food Science*, 44, 1162-1168.
- Labuza T.P. 1982 .Shelf-Life Dating of Foods, *Food and Nutrition Press*, Westport, Connecticut
- Möller, A.B., Andrews, A.T. & Cheesman, G. 1977. Chemical changes in ultra-heat-treated milk during storage, *Journal of Dairy Research*, 44,267-275.
- Morales-FJ; Jimenez-Perez-S. 1998. Study of hydroxymethylfurfural formation from acid degradation of the Amadori product in milk-resembling systems, *Journal-of-Agricultural-and-Food-Chemistry*; 46 (10) 3885-3890
- Nawar, W.W. 1993. Lípidos, *err. Fennema O.R.(ed), Química de los alimentos*, Zaragoza, España
- Park, P.W. 1995 .Toxic Compounds Derived from Lipids, en: Jean, I.J., Ikins, W.G., (eds), *Analyzing Food for Nutrition Labeling and Hazardous Contaminants*, edit. Board, USA, 363-434.
- Piñeiro G.R., Pérez P.E. y Leyva M.J. 1995. *Diccionario de ciencias de la salud*, Interamericana Mc.Graw-Hill, España

- Qian, H. y Sheng, M. 1998. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A,D and E and pro-vitamin D2 in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis, *Journal of Chromatography A*, 828, 127-133.
- Schwartz D.P. y Parks O.W. 1983. The Lipids of Milks Deterioration *err.* Webb B.H., Johnson A.H. (Eds) *Fundamentals of Dairy Chemistry*, The Avi Publishing Company Inc.
- Singh, R.P., Heldman, D.R. & Kirk, J.R. 1976. Kinetics of quality degradation: ascorbic acid oxidation in infant formula during storage, *Journal Food Science*, 41, 304-308.
- Singh R.P. 1994. *err.* Charalambous G. (ed), *Shelf Life Evaluation of Foods*, Blackie Academic & Professional, USA.
- Solomons, T.W. 1982. *Química Orgánica*, Editorial Limusa, México
- Tannenbaum S.R., Vernon R.Y., y Archer M.C.1993. Vitaminas y Minerales *err.* Fennema O.R.(ed), *Química de los alimentos*, Zaragoza España
- Van Mil, P. J. J. M.; Jans, J. A. 1991, Storage stability of whole milk powder: effects of process and storage conditions on product properties. *Neth. Milk Dairy*, 45, 145-167.
- Woollard, D.C. y Fairweather, J.P. 1985. The storage of vitamin A in fortified ultra-high temperature processed milk, *Journal of Micronutrient Analysis*, 1.

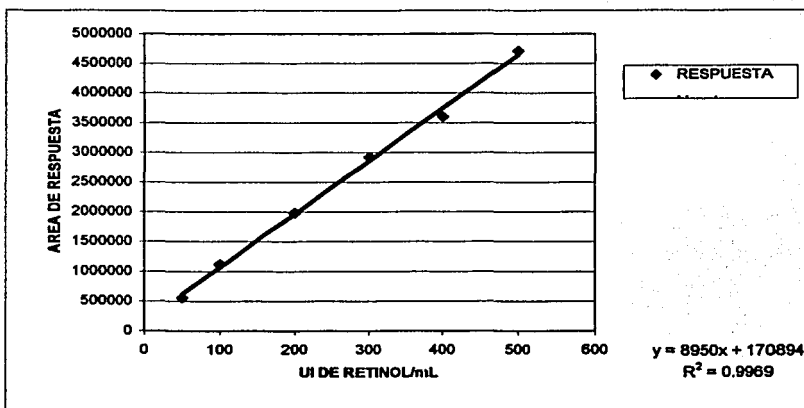
ANEXOS



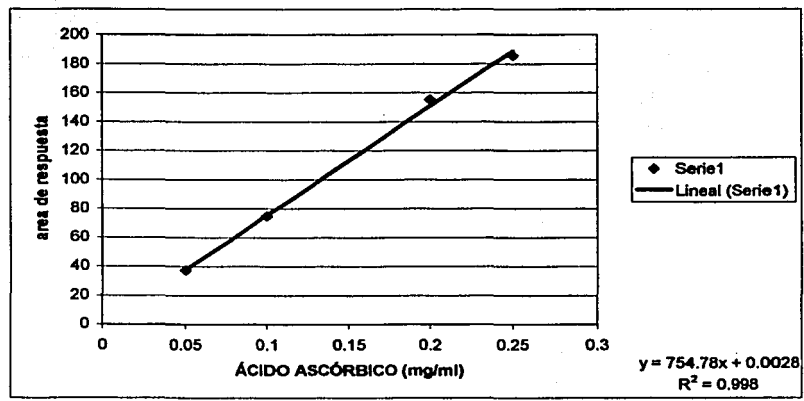
CURVA ESTÁNDAR PARA LA DETERMINACIÓN DE PERÓXIDOS.

UI / ML	AREA DE RESPUESTA	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
500	4710648	4.53
400	3602416	2.43
300	2920821	1.24
200	1986268	14.03
100	1121503	6.13
50	556176	5.26

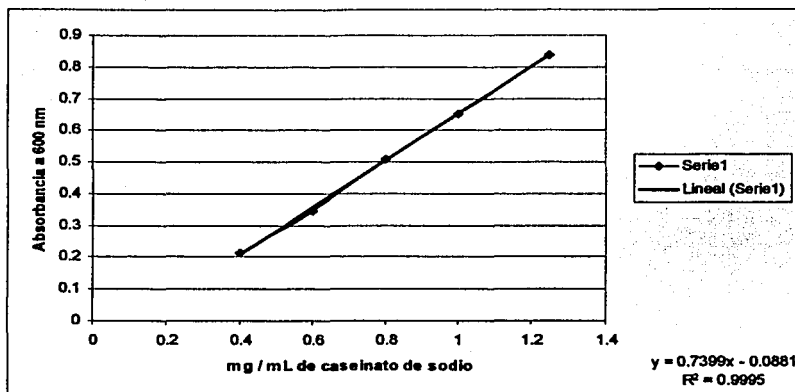
Tabla 7 CURVA ESTANDAR, PARA CUANTIFICACION DE VITAMINA A.



CURVA ESTANDAR DE VITAMINA A



CURVA ESTANDAR DE VITAMINA C



CURVA ESTANDAR DE CASEINATO DE SODIO

**1a RESULTADOS DEL MONITOREO DEL INDICE DE PEROXIDOS EN
FORMULA EQUILBRADA**

	MEQ PERÓXIDO/KG DE GRASA	CV	MEQ PERÓXIDO/KG DE GRASA	CV	MEQ PERÓXIDO/KG DE GRASA	CV
TIEMPO(DIAS)	22 °C	4.75	37 °C	4.75	45 °C	4.75
0	1.89	1.46	1.89	1.1	1.89	0.72
7	1.95	6.66	1.95	3.37	1.98	3.79
14	2.01	2.97	1.98	0.85	2.05	2.61
21	2.06	1.8	2.41	4.1	2.63	5.17
35	1.98	1.45	2.43	3.24	2.9	0.75
42	2.06	7.99	2.79	1.47	3.06	4.88
49	2.25	2.02	2.85	2.90	3.15	0.85
56	2.15	5.55	2.78	5.67	3.04	3.15
63	2.2	3.52	2.81	2.25	3.05	3.61
91	2.58	6.13	3.08	0.6	4.39	0.32
98	2.5	0.6	2.92	10.0	4.24	1.23
105	2.6	4.45	3.25	4.38	4.36	6.08

1b RESULTADOS DEL MONITOREO DE LA FORMACION DE PRODUCTOS SECUNDARIOS DE OXIDACION, MEDIANTE INDICE DE KREIS EN FORMULA EQUILIBRADA

	ABS / G DE GRASA	CV	ABS / G DE GRASA	CV	ABS / G DE GRASA	CV
TIEMPO(DIAS)	22°C	4.13	37°C	4.13	45°C	4.13
0	0.573	9.59	0.573	1.9	0.573	3.13
7	0.589	1.12	0.612	3.8	0.599	2.40
14	0.587	2.44	0.62	7.41	0.610	4.96
21	0.592	3.89	0.666	4.15	0.9	5.07
35	0.634	6.06	0.903	0.86	1.33	22.07
42	0.597	6.94	1.01	1.45	2.08	9.28
49	0.569	3.42	0.956	4.55	2.86	4.87
56	0.624	4.18	1.12	8.75	2.82	4.81
63	0.656	5.14	1.22	2.52	2.83	3.27
91	1.36	16.1	3.53	13.23	10.99	1.30
98	1.49	2.27	4.22	11.61	14.28	1.97
105	1.47	7.21	5.67	1.37	15.97	1.93

1c EVOLUCION DE LA PERDIDA DE VITAMINA A EN FORMULA EQUILIBRADA

	UI/ 100 G	CV	UI/ 100 G	CV	UI/ 100 G	CV
TIEMPO(DIAS)	22°C		37°C		45°C	
0	733.36	1.81	733.36	1.81	733.36	1.81
7	721.38	1.38	715.75	0.56	714.79	0.63
14	720.43	0.83	702.43	0.83	688.61	3.14
21	720.78	2.3	703.96	1.6	694.13	2.47
35	689.61	1.37	631.47	3.57	619.72	1.66
42	667.75	2.52	578.97	3.47	551.59	6.35
49	665.9	1.95	566.42	2.13	496.63	3.22
56	661.51	4.18	573.32	5.85	464.18	8.73
63	653.28	0.3	561.26	2.14	426.73	3.18
91	620.05	1.66	510.37	1.25	391.61	2.19
98	612.2	1.19	501.01	1.50	381.17	1.11
105	588.75	3.32	483.94	2.74	356.05	5.05

**1d EVOLUCION DE LA PERDIDA DE VITAMINA C EN FORMULA
EQUILIBRADA**

	MG AC.ASCORBICO / 100G	CV	MG AC.ASCORBIC O/ 100G	CV	MG AC.ASCORBIC O/ 100G	CV
TIEMPO(DIAS)	22°C	0.55	37°C	0.55	45°C	0.55
0	18.43	0.63	18.43	1.03	18.43	1.32
7	17.89	0.90	17.74	0.92	17.58	5.12
14	17.93	0.95	17.78	3.52	17.24	2.88
21	17.6	1.92	17.23	3.95	16.97	1.35
35	17.57	1.45	17.1	1.74	16.32	1.60
42	17.64	1.75	16.47	1.13	16.16	1.58
49	17.65	1.71	16.35	2.74	15.94	0.85
56	17.56	2.5	16.55	1.55	16.12	1.45
63	17.42	3.11	16.46	2.7	15.91	2.90
91	16.62	11.7	15.54	1.46	11.6	2.46
98	16.79	1.95	15.42	5.3	10.42	2.07
105	17.12	1.52	15.30	3.15	10.01	3.51

**1e EVOLUCION DE LA PERDIDA DE SOLUBILIDAD PROTEINICA EN
FORMULA EQUILBRADA**

	G DE PROTEINA SOLUBLE/100 G	CV	G DE PROTEINA SOLUBLE/100 G	CV	G DE PROTEINA SOLUBLE/100 G	CV
TIEMPO (DIAS)	22 °C		37 °C		45 °C	
0	18.8	1.31	18.84	1.31	18.84	1.31
7	18.78	2.15	18.72	3.5	18.75	5.10
14	18.83	0.89	18.83	3.25	18.72	7.8
21	18.78	3.55	18.69	2.6	18.57	3.15
35	18.73	4.4	18.34	2.13	18.43	2.0
42	18.74	0.9	18.69	3.25	18.29	3.3
49	18.79	1.31	18.68	2.23	18.07	3.11
56	18.77	4.05	18.63	4.11	17.92	2.56
63	18.76	2.13	18.63	2.65	17.15	3.6
91	18.73	3.55	18.34	4.05	16.23	3.78
98	18.72	2.10	18.18	3.10	16.08	5.45
105	18.65	1.6	18.07	1.66	15.99	3.6