



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Facultad de Farmacia

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Ciencias de la
Alimentación, Toxicología y Medicina Legal

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE ESTEROLES, LÍPIDOS
POLARES, ÁCIDO SIÁLICO Y GANGLIÓSIDOS EN
LA ALIMENTACIÓN DEL LACTANTE**

*Programa de Doctorado con Mención hacia la Excelencia en
CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN*

Presentada por:
Lorena Claumarchirant García

Dirigida por:
Dra. Amparo Alegría Torán
Dra. M^a Jesús Lagarda Blanch

Valencia, Enero 2017



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



Facultat de Farmàcia

Las Dras. Amparo Asunción Alegría Torán y M^a Jesús Lagarda Blanch, profesora titular y catedrática respectivamente, del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, de la Universitat de València,

CERTIFICAN QUE:

La licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos Dña. Lorena Claumarchirant García ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título **“Caracterización de esteroles, lípidos polares, ácido siálico y gangliósidos en la alimentación del lactante”** El trabajo ha dado lugar a cinco artículos.

1. *Sterol composition in infant formulas and estimated intake. Journal of Agricultural and Food Chemistry, (2015), 63, 7245-7151.*
Índice de impacto JCR (2015): 2,857 (20/125) Q1. Ciencia y Tecnología de los Alimentos.
2. *Addition of milk fat globule membrane as an ingredient of infant formulas for resembling the polar lipids of human milk. International Dairy Journal, (2016), 61, 228-238.*
Índice de impacto JCR (2015): 1,938 (43/125) Q2. Ciencia y Tecnología de los Alimentos.
3. *Evaluation of sialic acid in infant feeding: contents and bioavailability. Journal of Agricultural and Food Chemistry, (2016), 64, 8333-8342.*
Índice de impacto JCR (2015): 2,857 (20/125) Q1. Ciencia y Tecnología de los Alimentos.



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



Facultat de Farmàcia

4. *Ingrediente rico en membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM) como fuente de gangliósidos en preparados para lactantes. Acta Pediátrica, (aceptado enero 2017, pendiente de publicación).*
5. *Sterols in infant formulas: validation of a gas chromatographic method. International Journal of Food Sciences and Nutrition, (aceptado enero 2017, pendiente de publicación. DOI: 10.1080/09637486.2017.1287883). Índice de impacto JCR (2015): 1,451 (63/125) Q3. Ciencia y Tecnología de los Alimentos.*

Para ello, autorizan su presentación para optar al Grado de Doctor en Ciencias de la Alimentación.

Y para que conste a los efectos oportunos,

En Burjassot, 31 de enero de 2017

Fdo.: Amparo Alegría Torán

Fdo: M^a Jesús Lagarda Blanch



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



Facultat de Farmàcia

Las Dras. Amparo Asunción Alegría Torán y M^a Jesús Lagarda Blanch, profesora titular y catedrática respectivamente, del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, de la Universitat de València

INFORMAN QUE:

La licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos Dña. Lorena Claumarchirant García ha contribuido en el trabajo que lleva por título “*Sterols in infant formulas: validation of a gas chromatographic method*” a partes iguales con Dña. Islam J.A. Hamdan. Los datos de este trabajo no han sido publicados en tesis anteriores.

En Burjassot, 31 de enero de 2017

Fdo:: Amparo Alegría Torán

Fdo: M^a Jesús Lagarda Blanch



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA [Q*]



La presente tesis doctoral se ha realizado en el grupo Bionutest (03/003) y se enmarca en el proyecto CDTI (*Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial*) concedido a Hero España S.A (Nº: 20120542). Forma parte del Contrato de Investigación entre la Univesitat de València y Hero España S.A, para el proyecto/convenio (UV-BI-12-019) “Identificación y caracterización de gangliósidos, fosfolípidos y esteroles en leche humana e ingredientes destinados a la alimentación infantil”.

La doctoranda Lorena Claumarchirant García ha disfrutado de una beca de Investigación (UV-BI-12-019), en el periodo entre julio y diciembre 2012 y un contrato de Investigación entre enero 2013 y julio 2015, concedidos por la Universitat de València.

Al finalizar un trabajo tan laborioso y lleno de dificultades en algunos momentos, como es el desarrollo de la tesis doctoral, es inevitable mostrar sentimientos de satisfacción y alegría por todo lo realizado y aprendido. Aquello que parecía un sueño imposible y pensaba que nunca llegaría a su fin, se ha hecho realidad. Volviendo la vista atrás, me resulta difícil creer que hayan transcurrido más de cuatro años desde que empezó mi andadura aquí, y solo tengo palabras de agradecimientos a todas aquellas personas que de manera directa e indirecta me han ayudado o han formado parte de esta etapa de mi vida. Espero no olvidar a nadie.

En primer lugar, agradecer a mis directoras, las Dras. Amparo Alegría y M^a Jesús Lagarda, la oportunidad que me brindaron de poder realizar la tesis doctoral junto a ellas y formarme como investigadora. Gracias por vuestra dedicación, ayuda, rigor científico y paciencia y, perdón por cualquier error cometido. Agradecer también a las Dras. Reyes y Lupe y al Dr. Toni su predisposición y ayuda en cualquier momento que lo he necesitado para resolverme cualquier problema. Sin duda, los cinco constituís un gran equipo de investigación (grupo Bionutest).

Agradecer al Dr. Javier Fontecha y todo su grupo de investigación del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación de Madrid (Pilar, Alba, ...) la oportunidad de poder realizar las determinaciones de lípidos polares, que tanto se resistían en Valencia. Una estancia breve, de la que aprendí mucho y me sentí como en casa. Gracias por vuestra ayuda.

Gracias a Hero por la financiación y las muestras proporcionadas para la investigación, en especial a Esther y Luisma.

Agradecer también a todas las madres (Juana, Aurea, M^aJosé, Amparo, M^aIsabel, Carolina, Rocío, Alicia, ...) que de forma voluntaria donaron parte de su leche para que este trabajo pudiera ser llevado a cabo. Una labor que no fue nada fácil, porque no todo el mundo está dispuesto a donar parte de este alimento tan importante para sus hijos. Y como no, a esos niños (Nacho, Irene, Lola, Edurne, Alex, ...) que de manera indirecta me cedieron una pequeña parte de su alimentación.

Gracias a las Dras. Ana Frígola, María José Esteve, Ana y Cristina Juan (vecinas del laboratorio) por amenizar el día a día, así como a toda la gente del laboratorio vecino de toxicología, tanto a profesores como becarios por facilitar el trabajo diario y prestarme material siempre que ha sido necesario.

Muchas gracias al personal administrativo del departamento (Carmen, Amparo, Juanjo) por resolverme todas y cada una de las dudas.

Gracias al estadístico Gonzalo por su ayuda.

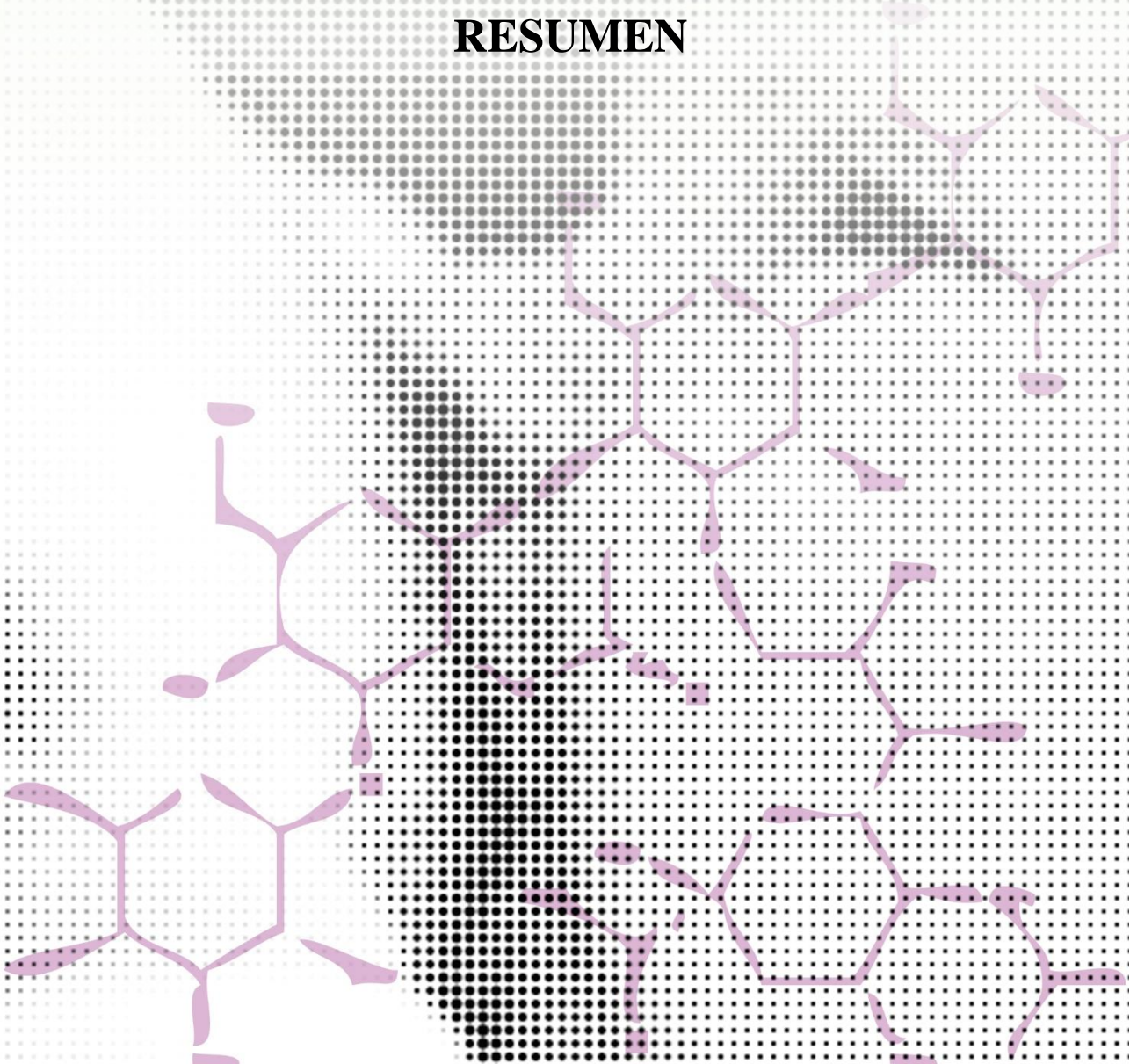
Gracias a mis compañeros del laboratorio, los que están (Gabi, Islam, Virginia, María, Andrea, Lorena) y los que no (Eli, Ramón, Silvia, Magda, Hannen, Daniel, Emilio, Antonio, Laia, Francisco, Maira, Francesca, Juana, Laura, Mar, Andrea, Patricia, Camila, Sonia, Elisa) por la ayuda prestada. Muchísimas gracias por compartir y vivir tantísimos buenos momentos, así como por animarme y alegrarme en los no tan buenos. Momentos que quedaran para el recuerdo: risas en los montaditos después de un largo día; ese donut para merendar (¡verdad Virgi y Gabi!); celebración de cumpleaños con su foto típica; largas conversaciones en la comida; momentos de bajón donde junto a mis dos compis Andrea y María cantábamos esa canción de *“Oye, abre tus ojos, mira hacia arriba, disfruta las cosas buenas que tiene la vida, ...”* que nos daba optimismo y ánimo de seguir,

Agradecer, también, a mis amigas el interés sobre el desarrollo de mi tesis, con preguntas sobre la leche, ... y la alegría mostrada cuando les decía que tenía una publicación más. Las alegrías compartidas son doble alegría.

Y finalmente quiero dar gracias a mi familia, un pilar fundamental en mi vida y a los que estoy muy agradecida. Gracias a mis padres y hermanos por estar siempre ahí, animándome y ayudándome, incluso en momentos donde más os debería de haber ayudado a vosotros. Me habéis dado todo a cambio de nada, y seguís haciéndolo. En parte, el llegar hasta aquí es gracias a vosotros. Muchas gracias de corazón.

“Cualquier cosa en la vida que valga la pena tener, vale la pena trabajar para conseguirla” *Andrew Carnegie*

RESUMEN



El alimento idóneo para los lactantes en los 6 primeros meses de vida es la leche humana (LH) y en su defecto, se recurre a preparados para lactantes (PL). A estos PL, con el propósito de asemejarlos a la LH, se le añaden diferentes ingredientes como aceites vegetales, membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM), grasa láctea, β -suero, etc., que aportan compuestos bioactivos, presentes de forma natural en la LH, entre los que se encuentran los esteroides, fosfolípidos y esfingolípidos (lípidos polares -LP), ácido siálico (Sia) y gangliósidos (GG), con grandes efectos en los lactantes.

El colesterol es un compuesto esencial para las membranas celulares y células nerviosas y se ha hipotetizado que altas cantidades de colesterol en la infancia pueden favorecer un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares en la edad adulta. La esfingomielina (SM) y fosfatidilcolina (PC) aportan cantidades importantes de colina, necesaria para el crecimiento y el desarrollo cerebral. Además, junto con el resto de LP aportan ácidos grasos esenciales para las membranas neuronales. El Sia y los GG desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del cerebro y la prevención de infecciones intestinales del lactante.

El objetivo de este trabajo es, conocida la importancia del colesterol, LP, Sia y GG en la alimentación infantil, evaluar las posibles diferencias entre la LH y los PL. Para ello, se analizan LP y Sia en LH de diferentes periodos de lactancia (0-12 meses) correspondientes a dos zonas geográficas de España (centro y litoral) y esteroides, LP, Sia y GG en 13 PL comercializados en Europa, mostrando especialmente interés en aquellos que llevan adicionado MFGM en su formulación. Además, se estima la ingesta de estos compuestos bioactivos por el lactante y se calcula la bioaccesibilidad de Sia mediante una digestión gastrointestinal estática *in vitro*. Por otra parte, se estudia los contenidos que proporciona diferentes ingredientes (mazada, ingrediente rico en MFGM, concentrado de LP, nata y β -suero), algunos de ellos utilizados en la elaboración de PL.

Los ingredientes ricos en MFGM son los que aportan mayores contenidos (mg/100 g) de colesterol (263,6-288,7 vs. 45,5-133,16), Sia total (1749,5-1845,1) y

GG (80,7-144,8), seguido del concentrado de LP > β -suero > mazada > natas, a excepción del aporte alto de colesterol por las natas, solo superado por el ingrediente rico en MFGM. En el caso de los LP, totales e individuales (fosfatidiletanolamina (PE) > SM > PC > fosfatidilserina (PS) > fosfatidilinositol (PI)), el concentrado de LP (12344,2 mg/100 g) y el β -suero (8887,1 mg/100 g) son los que presentan mayores contenidos, seguido del ingrediente rico en MFGM (4468,2-4804,8 mg/100 g).

El contenido total (mg/100 mL) de LP totales y Sia total en LH durante la lactancia disminuye desde 48,62 (transición) a 28,66 (6 meses) y de 136,14 (calostro) a 24,47 (6 meses), respectivamente, siendo la SM el LP mayoritario, seguido de PE > PC > PS > PI. Todos estos contenidos, con excepción de la SM y PE, son significativamente menores en la zona centro que el litoral.

Se valida la identificación y cuantificación de esteroides por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (CG-FID) para la posterior determinación de estos compuestos en los PL estudiados en esta tesis. Se observa que presenta buenos límites de detección (<1 μ g/100 mL) y cuantificación (<4 μ g/100 mL), precisión (interdía: 1,6-8,8% y intradía: <10%) y exactitud (93-108%).

Los contenidos (mg/100 mL) de colesterol en los PL varían de 1,46 a 5,1 y los de esteroides vegetales (EV) entre 3,1 y 5, siendo el EV mayoritario el β -sitosterol, seguido del campesterol, estigmasterol y brasicasterol. El perfil de esteroides depende del tipo y cantidad de grasa utilizada (aceites vegetales, natas, etc). La adición de MFGM a los PL asemeja la relación de esteroides animales/vegetales a la presente en LH. Los contenidos de LP oscilan de 25,11 a 58,07 mg/100 mL, y la PE es el LP mayoritario, seguido de SM > PC > PS > PI. Los contenidos de Sia total (NeuAc más del 95%) están comprendidos entre 13,15 - 25,78 mg/100 mL y los de GG oscilan de 0,30 a 2,69 mg de Sia unido a lípidos (ASUL)/100 mL.

Destacar que los mayores contenidos de estos compuestos bioactivos, con excepción del Sia, se observan en aquellos PL que llevan adicionados MFGM en su

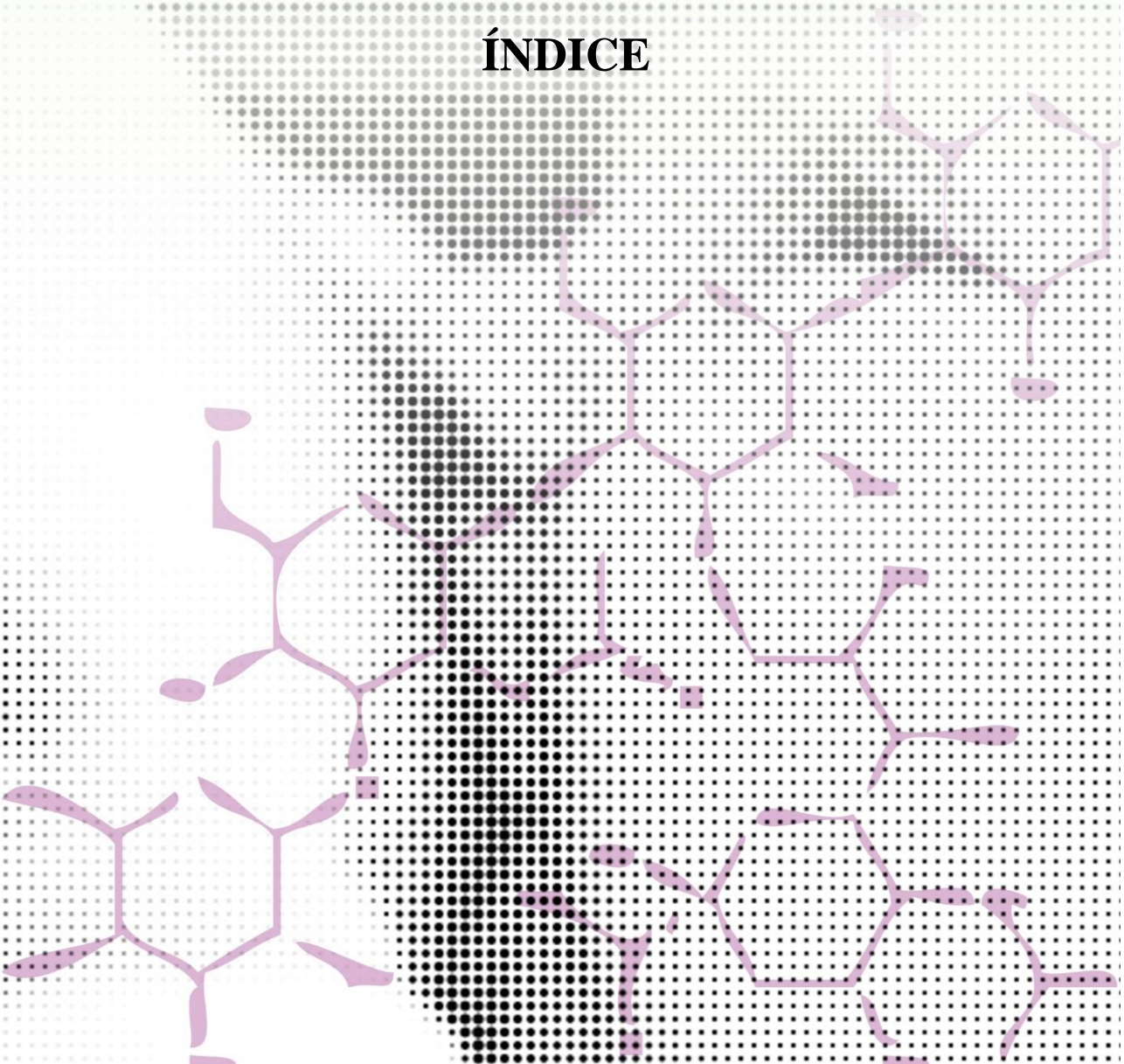
formulación y son más próximos a los proporcionados por la LH, alimento de referencia para el lactante. Solo los contenidos de LP de estos preparados con MFGM pueden suplir aquellos proporcionados por la LH en todos los periodos de lactancia, con excepción de la SM que no alcanza los contenidos proporcionados por la LH de transición.

A pesar del menor contenido de Sia total en los PL y sus fracciones bioaccesibles con respecto a los contenidos proporcionados por la LH, la bioaccesibilidad de Sia en los PL (88-93%) es significativamente mayor que en LH madura (72%) y similar a la observada en calostro (96%).

Independientemente del PL utilizado las ingestas de todos los compuestos bioactivos aumentan progresivamente desde los 0,5 a los 2 meses y se estabilizan durante los 3 meses siguientes, mostrando un ligero aumento en el 5º mes, solamente estadísticamente significativo para los LP. Posteriormente la ingesta disminuye hasta llegar a los 6 meses, donde se introduce la alimentación complementaria. El perfil de ingestas para Sia y LP, calculado a partir de LH es completamente diferente. En los primeros 15 días las ingestas aumentan significativamente, para posteriormente producirse una ligera disminución hasta los 6 meses. Solo un PL alcanza las ingestas de Sia en LH desde el segundo mes de lactancia. En cambio, las ingestas de LP a partir de ambos tipos de alimentación, generalmente, no muestran diferencias.

Son necesarios más estudios en ingredientes utilizados en la elaboración de PL para disponer de productos con un perfil y contenido en compuestos bioactivos más cercano a la LH.

ÍNDICE



	<u>Página</u>
Índice de tablas	IV
Índice de figuras	VI
Abreviaturas	VII
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO	5
PLAN DE TRABAJO	9
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	13
1.-Compuestos bioactivos	15
1.1.- Esteroles	15
1.2.- Fosfolípidos y esfingolípidos	18
1.3.- Ácido siálico	22
1.4.- Gangliósidos	26
2.- Glóbulo de grasa y membrana del glóbulo graso de la leche	30
3.- Funciones fisiológicas	36
4.-Leche humana	45
4.1.- Composición	45
4.2.- Contenido en compuestos bioactivos	49
5.-Preparados para lactantes e ingredientes utilizados en su elaboración	60
5.1.- Elaboración	60
5.2.- Contenido en compuestos bioactivos	65
5.2.1.- Esteroles	65
5.2.2.- Fosfolípidos y esfingolípidos	69
5.2.3.- Ácido siálico	73
5.2.4.- Gangliósidos	76
6.- Ingestas de compuestos bioactivos: Leche humana vs. Preparados para lactantes	79
7.- Biodisponibilidad	85

	<u>Página</u>
7.1.- Biodisponibilidad del ácido siálico	90
RESULTADOS	95
1.-Ingredientes de posible utilización en la elaboración de preparados para lactantes	101
2.-Sterols in infant formulas: validation of a gas chromatographic method	113
3.- Sterol composition in infant formulas and estimated intake	137
4.- Addition of milk fat globule membrane as an ingredient of infant formulas for resembling the polar lipids of human milk	161
5.- Evaluation of sialic acid in infant feeding: contents and bioavailability	195
6.- Ingrediente rico en membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM) como fuente de gangliósidos en preparados para lactantes	227
DISCUSIÓN GENERAL	245
1.- Composición en compuestos bioactivos de ingredientes de posible utilización en la elaboración de preparados para lactantes	247
2.- Validación de un método cromatográfico para esteroles	250
3.- Influencia del periodo de la lactancia y zona geográfica en la composición en lípidos polares y ácido siálico de leche humana	252
4.- Composición de compuestos bioactivos en preparados para lactantes	257
4.1.- Comparación con la legislación	257
4.2.- Influencia de la adición de MFGM	257
4.3.- Influencia de otros ingredientes	259
4.4.- Comparación preparados para lactantes vs. leche humana	261
5.- Bioaccesibilidad de ácido siálico en leche humana y preparados para lactantes	264
6.- Evaluación de ingesta de compuestos bioactivos por el lactante	266
CONCLUSIONES	271
BIBLIOGRAFÍA	277

	Página
ANEXOS	303
I. Composición de los preparados para lactantes	305
II. Metodología	307
III. Protocolo de recogida de leche humana	326
IV. Muestras de leche humana	333
V. Ingredientes y composición declarada en la etiqueta de los preparados para lactantes analizados	334
VI. Cálculo de ingestas en función del grupo de edad	337
DIFUSIÓN DE RESULTADOS	339

Índice de Tablas

Nº de Tabla		Página
1	Nomenclatura y estructura de algunos gangliósidos.	28
2	Composición de la leche humana: calostro y leche madura (en gramos, miligramos o nanogramos por 100 mL).	46
3	Contenidos de colesterol en leche humana (mg/100 mL).	50
4	Precusores de colesterol en leche humana (mg/100 mL).	51
5	Contenido de lípidos polares en leche humana (mg/100 mL, entre paréntesis porcentajes relativos).	53
6	Contenidos de ácido siálico en leche humana (mg/100 mL).	56
7	Contenidos de gangliósidos en leche humana (mg ASUL/L).	59
8	Diferencias en macronutrientes entre leche de vaca, leche de cabra y leche humana (g/100mL).	63
9	Contenido de esteroides en preparados infantiles (mg/100 mL).	68
10	Lípidos polares en ingredientes y leche.	70
11	Contenidos de lípidos polares en preparados infantiles (mg/100 mL).	72
12	Contenido de siálico y gangliósidos en ingredientes proteicos y MFGM (expresados en mg/100g).	73
13	Contenido de ácido siálico (mg/100 mL) en preparados destinados a la alimentación infantil.	74
14	Porcentaje de los compuestos que forman parte de los ingredientes comerciales Lacprodan.	77
15	Gangliósidos en preparados destinados a la alimentación infantil.	78
16	Ingestas de compuestos bioactivos proporcionadas por la alimentación infantil (mg/día).	80
17	Composición de posibles ingredientes a utilizar en preparados para lactantes (g/100g).	101
18	Contenido y porcentajes relativos de esteroides en ingredientes.	103
19	Contenido graso (g/100 g) y porcentaje relativo de los lípidos en los ingredientes.	105
20	Contenido de lípidos polares (fosfolípidos y esfingolípidos) y porcentajes relativos en ingredientes.	106
21	Contenido y porcentaje relativo de ácido siálico en ingredientes.	110

Índice de Tablas

Nº de Tabla		Página
22	Contenido de gangliósidos totales (ASUL) en ingredientes.	111

Índice de Figuras

Nº de Figura	Página	
1	Estructura del colesterol y alguno de sus precursores.	15
2	Esteroles y estanoles vegetales principales en alimentos de origen vegetal.	16
3	Ruta de síntesis del colesterol.	18
4	Estructura de los fosfolípidos y esfingolípidos.	20
5	Rutas de síntesis de fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS).	21
6	Estructura general y sustituciones del ácido siálico.	23
7	Compuestos de la familia del ácido siálico. (a) Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico (Neu5Ac). (b) Ácido <i>N</i> -glicolilneuramínico (Neu5Gc).	24
8	Ruta de síntesis de ácido siálico en el ser humano.	25
9	Estructura de gangliósidos.	27
10	Biosíntesis de la ceramida.	29
11	Síntesis de los gangliósidos de las series 0, a, b y c.	30
12	Formación, crecimiento y secreción de los glóbulos grasos de la leche.	31
13	Estructura de la membrana del glóbulo graso de la leche.	32
14	Esquema general de la elaboración de preparados para lactantes.	61
15	Modificación de los glóbulos de grasa de la leche durante su procesado.	62
16	Obtención del ingrediente de la membrana del glóbulo graso de la leche.	67
17	Esquema de la biodisponibilidad.	85
18	Esquema del diseño experimental.	98
19	Desarrollo del diseño experimental. Relación con resultados.	99

Lista de abreviaturas

AA: ácido araquidónico

AAP: Academia Americana de Pediatría

ADPH: adipofilina

AG: ácidos grasos

AP: ácido fosfatídico

ARA: ácido araquidónico

ASUL: ácido siálico unido a lípidos

BA: bioaccesibilidad

BD: biodisponibilidad

BTN: butirofilina

CDP: citidina difosfato

Cer: ceramida

CG-FID: cromatografía de gases con detector de ionización de llama

CG-MS: cromatografía de gases con detector de masas

CMP: citidina monofosfato

DAG: diacilglicéridos

DHA: ácido docosahexaenoico

EFSA: Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos (European Food Safety Authority)

EPA: ácido eicosapentaenoico

ESPGHAN: Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica

EV: esteroides vegetales

FB: fracción bioaccesible

FOS: fructooligosacáridos

Gal: galactosa

GalCer: galactosilceramida

GalNAc: N-acetilgalactosamina

GalNAc-T: N-acetil-galactosaminil-transferasa

Gal-T2: galactosil-transferasa

GG: gangliósidos

Gg: ganglio

Glc: glucosa

GluCer: glucosilceramida

GOS: galactooligosacaridos

HDL: lipoproteínas de alta densidad

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HPLC-ELSD: cromatografía líquida de alta resolución con detector de dispersión de luz evaporativo

HPTLC: cromatografía en capa fina de alta resolución

IDR: ingesta dietética de referencia

Ig: inmunoglobulinas

IL: interleuquinas

I_d: fase líquida desordenada

I_o: fase líquida ordenada

IUPAC-IUB: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada - Unión Internacional de Bioquímica

LacCer: lactosilceramida

LC-ESI-MS/MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas con ionización por electrospray

LDL: lipoproteínas de baja densidad

LH: leche humana

- Liso-AP:** ácido lisofosfatídico
- LP:** lípidos polares
- MAG:** monoacilgliceridos
- MFGM:** membrana del glóbulo graso de la leche
- MUC:** mucina
- Neu:** ácido neuramínico
- Neu5Ac:** ácido N-acetilneuramínico
- Neu5Gc:** ácido N-glicolilneuramínico
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- P:** grupo fosfato
- PAS:** Per, Arnt, Sim
- PC:** fosfatidilcolina
- PCL:** poliinsaturados de cadena larga
- PE:** fosfatidiletanolamina
- PI:** fosfatidilinositol
- PL:** preparados para lactantes
- Pm:** peso molecular
- PS:** fosfatidilserina
- RE:** retículo endoplasmático
- RTS:** Reglamentación Técnico Sanitaria
- SAT:** sialiltransferasa
- SHIME:** Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem
- Sia:** ácido siálico
- SM:** esfingomielina
- TAG:** triacilgliceridos
- TLC:** cromatografía en capa fina

TNF: factor de necrosis tumoral

TNO: The Netherlands Organization

UE: Unión Europea

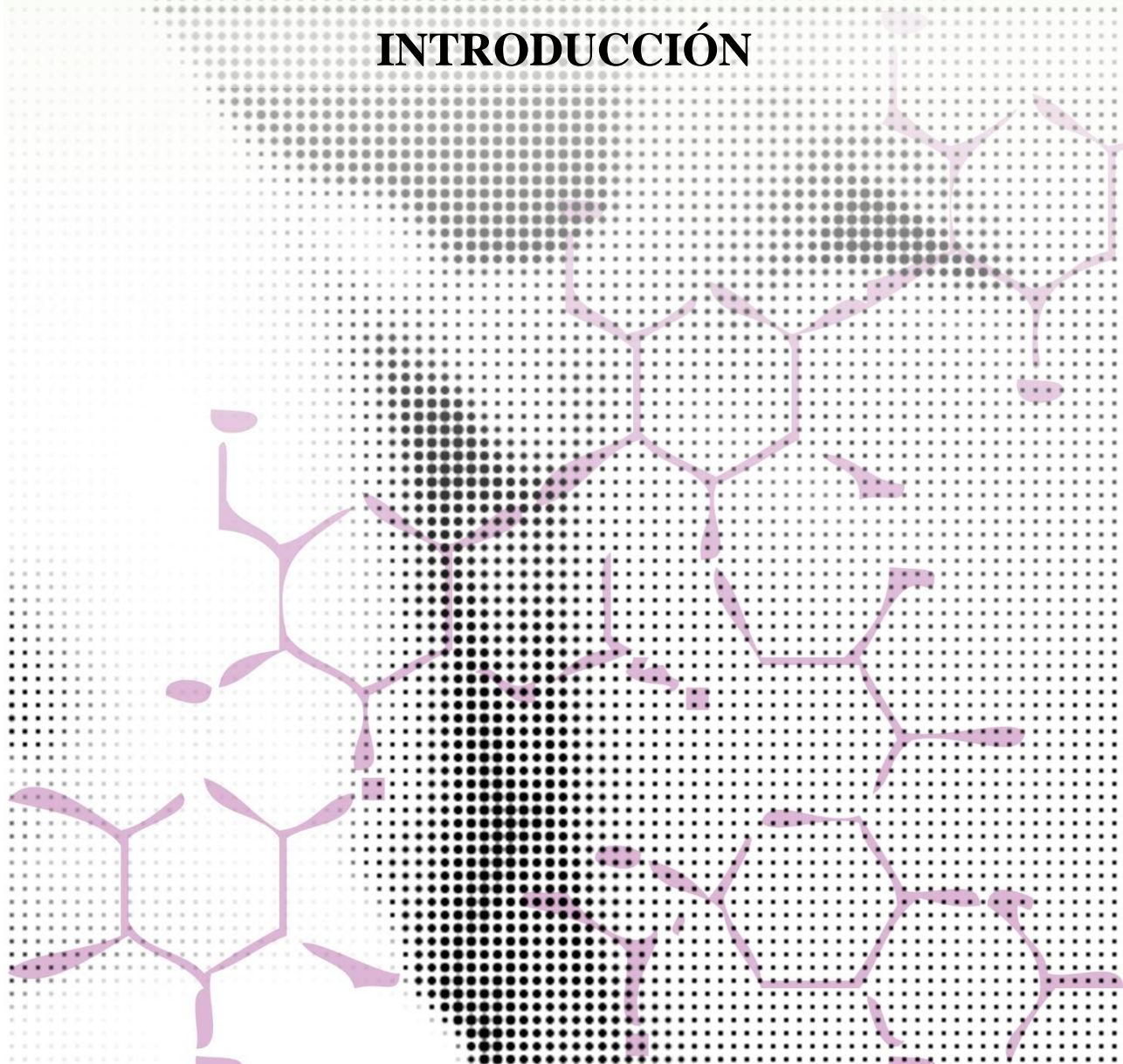
UHT: esterilización a alta temperatura

UV: ultravioleta

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

XDH/XO: xantina deshidrogenasa/oxidasa

INTRODUCCIÓN



Durante el primer año de vida se produce el crecimiento y desarrollo físico y psíquico más importante que tiene lugar en la vida de una persona; se triplica el peso del nacimiento (duplicándose previamente en los primeros cuatro meses), se duplica el tamaño del cerebro, incrementa la capacidad del estómago (de 10 a 200 mL), se produce maduración de las funciones fisiológicas (aparato digestivo, riñón, aparato locomotor, etc.) y cambios bioquímicos, entre otros. Por ello, la alimentación en las primeras etapas de la vida debe satisfacer las necesidades de crecimiento y maduración de tejidos y órganos del lactante. (Maldonado *et al.*, 2010).

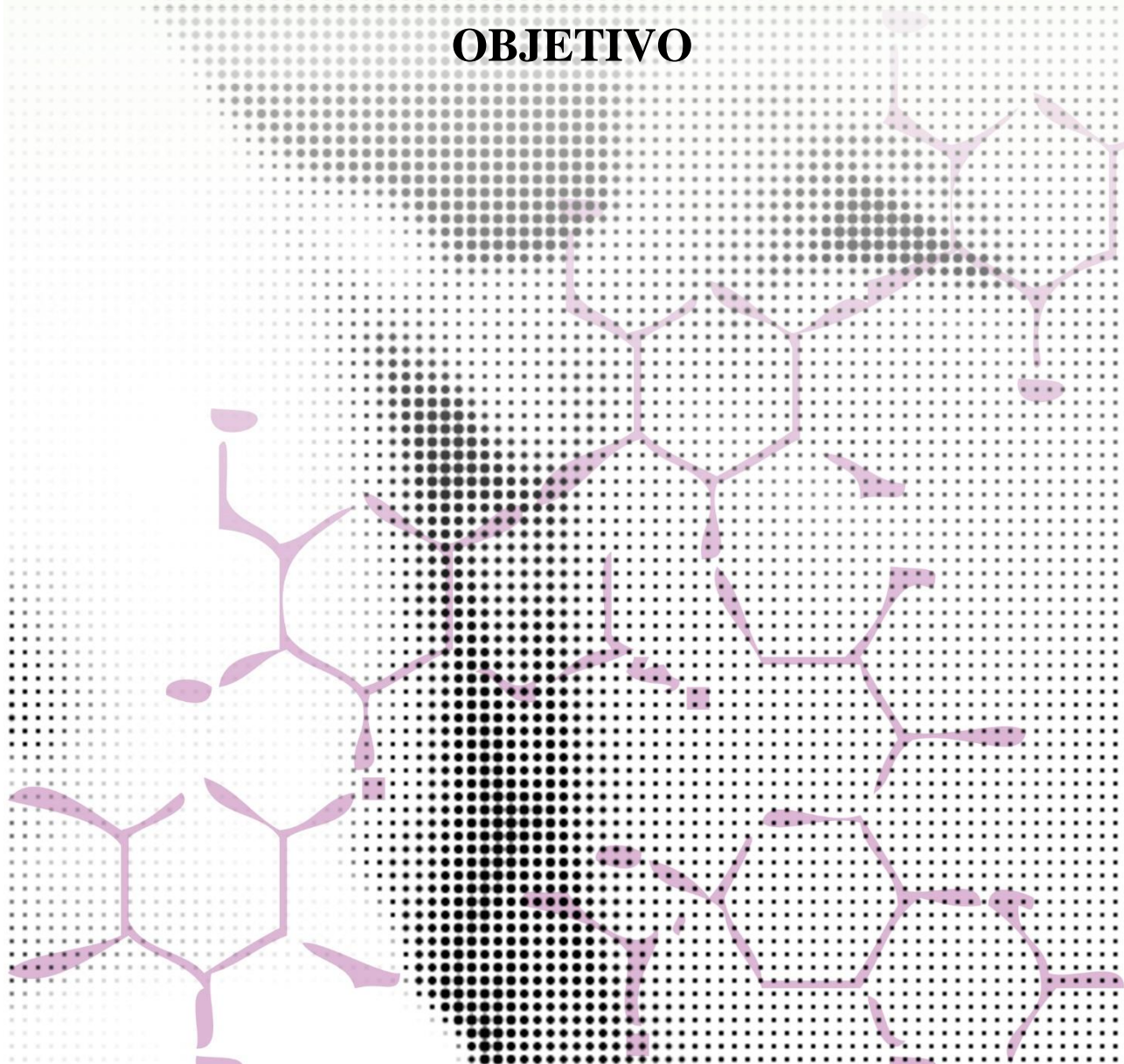
La alimentación del lactante, definido el término lactante como niño menor de 12 meses (RD 867/2008), debe ser la adecuada, tanto en cantidad como en calidad, a cada edad y etapa madurativa, y al grado de maduración del aparato digestivo (capacidad de ingestión, digestión y absorción), del sistema nervioso y de la función renal (capacidad de eliminación). Además, su capacidad de aprendizaje influye en la adquisición de habilidades motoras y sensoriales para que evolucione paulatinamente y al final sea capaz de aceptar sin problemas la comida del adulto (Pavón *et al.*, 2007).

Durante los primeros 4-6 meses de la vida, la alimentación del lactante debe ser exclusivamente a base de leche materna, ya que sus limitaciones digestivas y metabólicas y su inmadurez solo le permite utilizar sus reflejos primarios de succión y deglución. Diversos organismos internacionales como la Academia Americana de Pediatría (AAP, 2005), la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN, 2009) y la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016) recomiendan la leche humana (LH) como alimento exclusivo en esta etapa, ya que aporta los nutrientes óptimos para un correcto desarrollo del recién nacido; no obstante, cuando esta no es posible se utilizan preparados para lactantes (PL). Estos se definen como los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes durante los primeros meses de vida, que satisfagan por sí mismos las necesidades nutritivas de estos lactantes hasta la introducción de una alimentación complementaria apropiada (RD 165/2014). A partir de los 4-6 meses

se inicia la diversificación alimentaria o alimentación complementaria (*beikost*), introduciendo de forma gradual alimentos distintos de la LH y cambiando los PL por los preparados de continuación. Durante esta etapa progresa la maduración digestiva, renal y neurológica, y el lactante adquiere la capacidad de digerir otros alimentos y absorber y metabolizar mejor los nutrientes (Pavón *et al.*, 2007).

En la lactancia artificial, se utilizan preparados lácteos generalmente derivados de la leche de vaca, modificados tanto en calidad como en cantidad para lograr un alimento que sea lo más parecido posible a la LH, ya que es el único alimento que contiene todos los nutrientes indispensables, en proporciones adecuadas, para un correcto crecimiento. Además, la LH proporciona compuestos bioactivos que se definen como aquellos compuestos, nutrientes o no, presentes en bajas concentraciones que ejercen un efecto beneficioso en funciones corporales del individuo, produciendo una mejora en su salud y bienestar o reduciendo un riesgo de enfermedad (Olmedilla-Alonso & Granado-Lorencio, 2008). Entre los principales compuestos bioactivos de la LH cabe destacar los nucleótidos, inmunoglobulinas (Ig), factor de crecimiento, agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, lactoferrina, lisozima, oligosacáridos, agentes inmunomoduladores y probióticos. Recientemente, se han atribuido estas propiedades a compuestos de la fracción grasa de la membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM). Por esta razón, en la elaboración de algunos PL se utilizan ingredientes como concentrado de suero proteico, natas y extracto de MFGM, entre otros, ricos en compuestos bioactivos. Algunos componentes de la MFGM como los esteroides, fosfolípidos y esfingolípidos, ácido siálico (Sia) y gangliósidos (GG) son considerados compuestos bioactivos y son el objeto de estudio de este trabajo.

OBJETIVO



El objetivo principal del presente trabajo es el estudio comparativo de compuestos bioactivos: esteroides, lípidos polares, ácido siálico y gangliósidos en leche humana y preparados para lactantes.

Este objetivo se concreta en los siguientes objetivos parciales:

- Conocer la composición en compuestos bioactivos de ingredientes utilizados en la elaboración de preparados para lactantes.

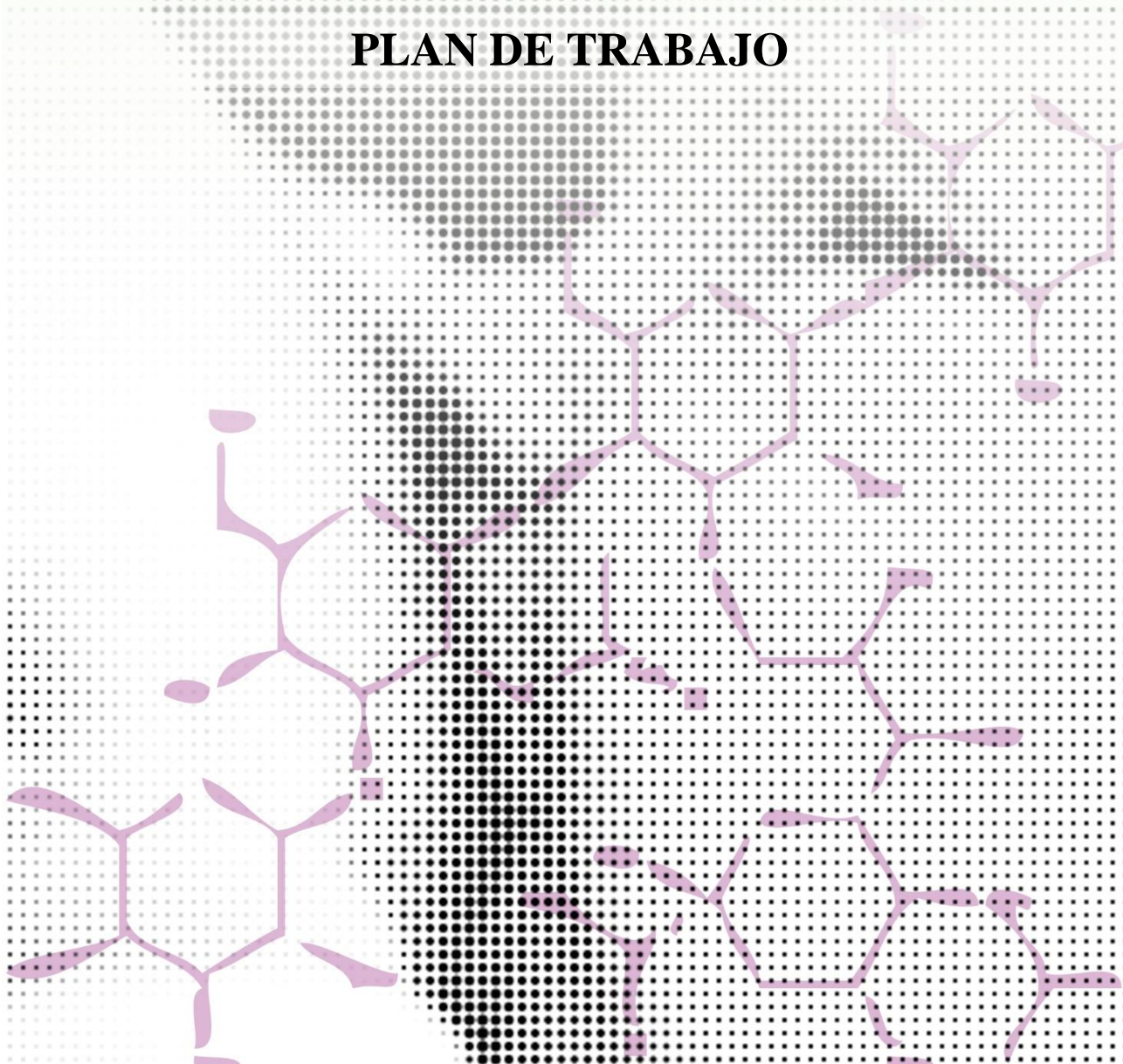
- Evaluar la influencia de dos zonas geográficas de España (centro y litoral) y de los diferentes periodos de la lactancia en la composición en lípidos polares (fosfolípidos y esfingolípidos) y ácido siálico de leche humana, como referencia para la elaboración de preparados para lactantes.

- Comparar la composición en compuestos bioactivos de preparados para lactantes elaborados con o sin ingrediente rico en membrana del glóbulo graso de la leche.

- Estimar la bioaccesibilidad del ácido siálico en leche humana y preparados para lactantes con o sin membrana del glóbulo graso de la leche.

- Evaluar la ingesta de compuestos bioactivos por el lactante.

PLAN DE TRABAJO



Para conseguir los objetivos propuestos se propone el siguiente plan de trabajo:

- Validación de un método de determinación de esteroles en PL por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID).
- Determinación del contenido de esteroles por CG-FID y gangliósidos por espectrofotometría UV-visible, en los diferentes PL y sus ingredientes.
- Determinación del contenido de lípidos polares (LP) (fosfolípidos y esfingolípidos) por cromatografía líquida de alta resolución con detector de dispersión de luz evaporativo (HPLC-ELSD) y de Sia por HPLC-fluorescencia, en LH, PL e ingredientes.
- Determinación de Sia en la fracción bioaccesible (FB) resultante de aplicar una digestión gastrointestinal simulada a LH y PL.
- Estimación de la ingesta de compuestos bioactivos a partir de datos bibliográficos que estiman el consumo de LH y PL por el lactante.
- Evaluación de los resultados, redacción de la memoria y difusión de los resultados.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS



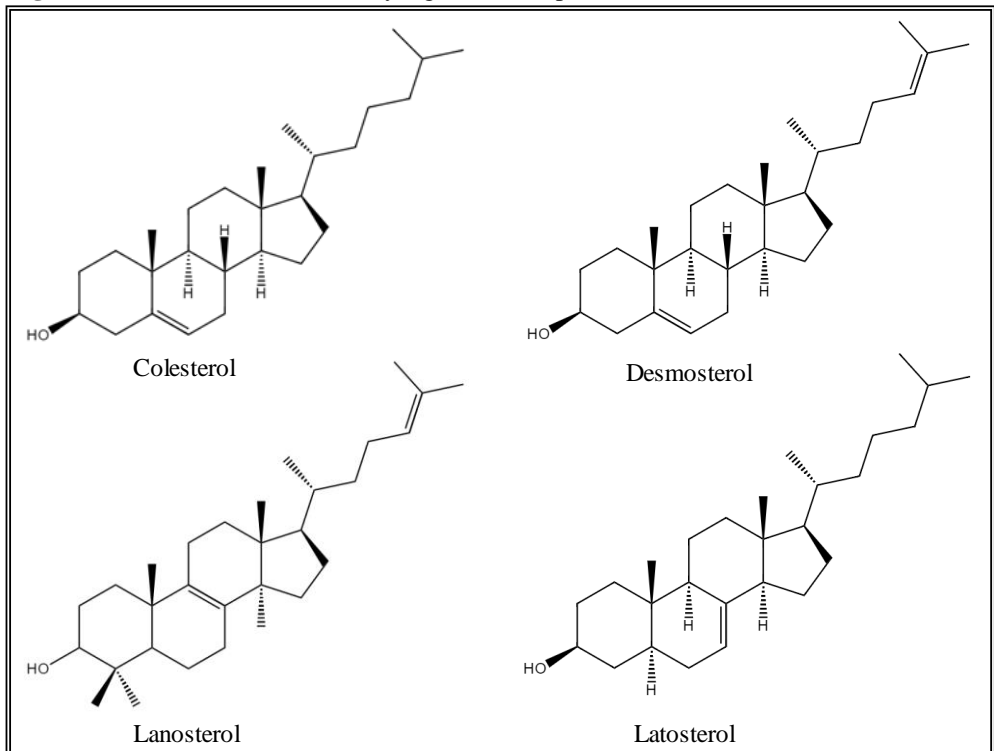
1. Compuestos bioactivos

1.1. Esteroles

Los esteroides son componentes minoritarios de la fracción lipídica presentes en la MFGM y forman parte de la fracción insaponificable. Pueden clasificarse en esteroides de origen animal (colesterol) o esteroides de origen vegetal (fitosteroides y fitostanoles).

Son compuestos alicíclicos que poseen una estructura ciclopentanoperhidrofenantreno con un grupo hidroxilo en el C-3 y una cadena lateral de 8 a 10 carbonos en el C-17 (ver Figura 1) (García-Llatas & Rodríguez-Estrada, 2011). El colesterol se caracteriza por una insaturación entre los carbonos C-5 y C-6, un radical metilo en las posiciones C-10 y C-13 y una cadena alifática ramificada de 8 carbonos en el C-17.

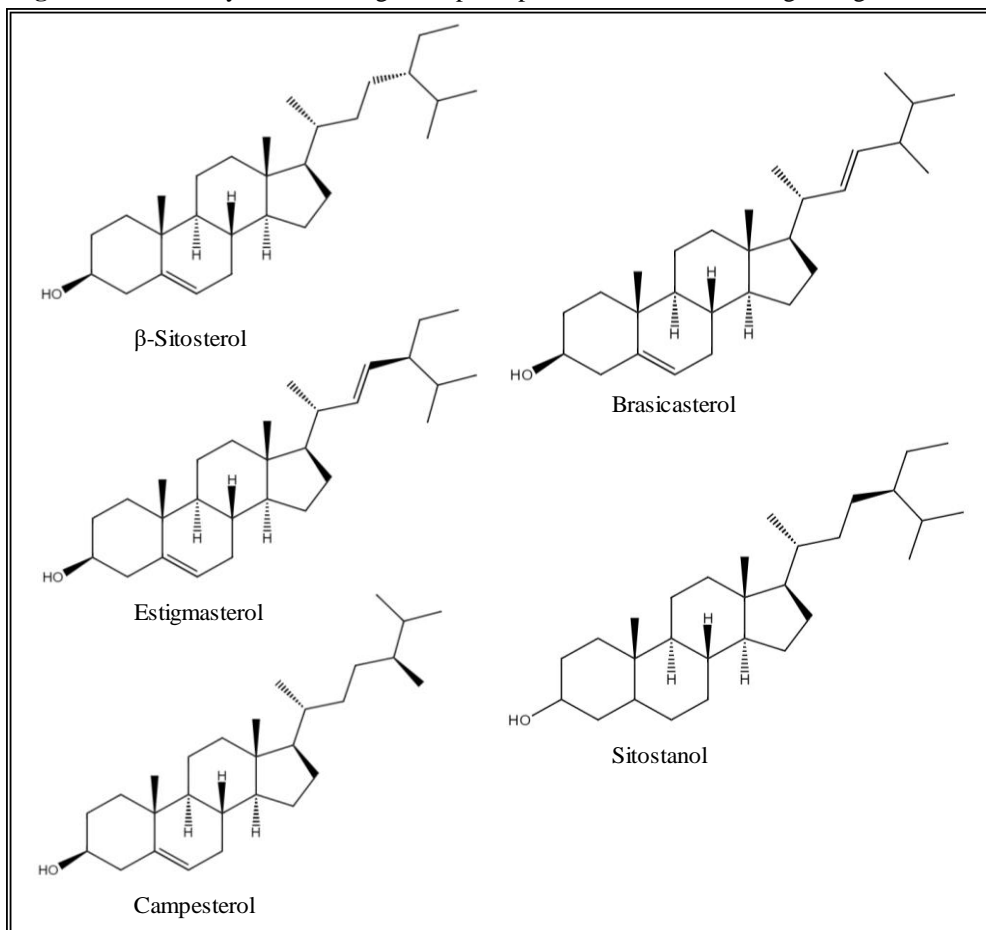
Figura 1. Estructura del colesterol y alguno de sus precursores.



En la Figura 1 se muestran algunos de los precursores del colesterol. El desmosterol, precursor inmediato de colesterol, es un esteroide de 27 carbonos con dos dobles enlaces, $\Delta 5$ y $\Delta 24$, en la cadena lateral. El lanosterol, con tres grupos metilo, se caracteriza por la cadena lateral insaturada del que derivan todos los esteroides. El latosterol, con cadena lateral saturada, es otro precursor del colesterol que no siempre actúa en la síntesis del colesterol (Kallio *et al.*, 1989).

Los esteroides vegetales (EV), estructuralmente son muy similares al colesterol, pero incluyen un grupo alquilo (metilo o etilo) en el carbono C-24 de la cadena hidrocarbonada lateral (Figura 2).

Figura 2. Esteroides y estanoles vegetales principales en alimentos de origen vegetal.



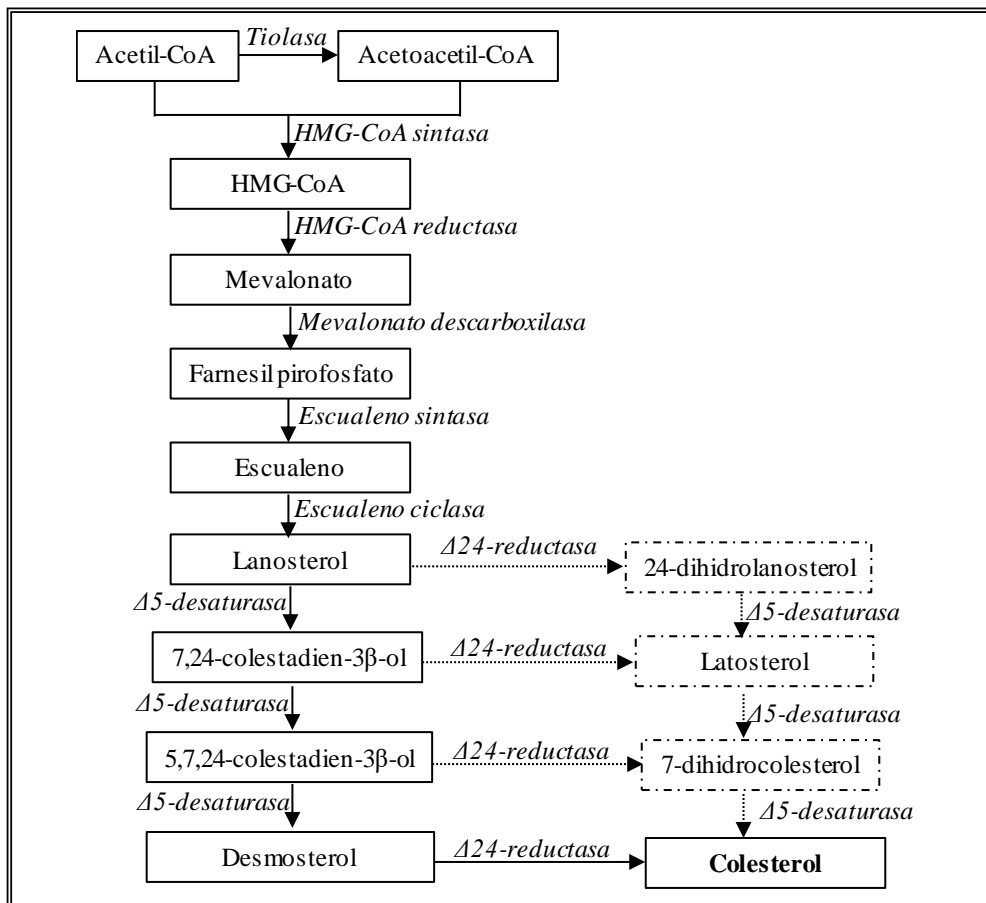
Dentro de los EV pueden diferenciarse dos grupos, los fitosteroles, con un doble enlace entre la posición C-5 y C-6 y los fitostanoles con estructura saturada (Ostlund, 2002). Los fitosteroles son más abundantes que los fitostanoles y pueden ser convertidos en estos por hidrogenación.

Los principales EV son: β -sitosterol, campesterol, estigmasterol y brassicasterol, siendo las principales fuentes alimentarias aceites vegetales, frutas, verduras, frutos secos, semillas, etc (Lagarda *et al.*, 2006).

El 20% de colesterol presente en leche es de síntesis *de novo* en la glándula mamaria y el resto (80% aproximadamente) derivada del torrente sanguíneo (Ontsouka & Albrecht, 2014). En cambio, los EV son aportados exclusivamente a la LH de forma exógena, a través de la dieta materna.

La síntesis de colesterol se desarrolla en la membrana del retículo endoplasmático (RE) y en el citosol de la mayoría de las células, siendo acetil-CoA la fuente de todos los átomos de carbono que forman la molécula de colesterol. En la Figura 3 se representa un esquema de la ruta de síntesis del colesterol. La síntesis se inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA por la tiolasa citosólica. A partir de acetil-CoA y acetoacetil-CoA se sintetiza una molécula de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) por acción de la HMG-CoA sintasa. El HMG-CoA es reducido a mevalonato por NADPH y la enzima HMG-CoA reductasa (reacción limitante de la síntesis de colesterol). Seguidamente el mevalonato es fosforilado por ATP para generar varios intermediarios fosforilados activos. Mediante una descarboxilación se forma una unidad activa de isoprenoide (isopentenilpirofosfato). A continuación, seis moléculas de isopentenilpirofosfato (farnesil pirofosfato) condensan y posteriormente son reducidas por NADPH para formar escualeno, el cual se cicla para formar lanosterol (esteroide progenitor) por acción de la enzima ciclasa. Finalmente, el núcleo esteroide del lanosterol se descarboxila en el RE y el doble enlace, en la posición 24 de la cadena lateral, se reduce hasta formar colesterol, mediante la acción de la enzima Δ 24-reductasa (Fernández *et al.*, 2003).

Figura 3. Ruta de síntesis del colesterol.



Fuente: Fernandez et al., 2003

1.2. Fosfolípidos y esfingolípidos

Los fosfo- y esfingolípidos son LP que están presentes en tejidos animales y vegetales. Son constituyentes fundamentales de las membranas celulares por su naturaleza anfífilica, ya que la cabeza hidrofílica y la cola hidrofóbica hacen posible el mantenimiento de la bicapa, tanto en células como en orgánulos. En lácteos, los LP forman parte de una compleja mezcla de diferentes compuestos lipídicos, muchos de los cuales presentan efectos beneficiosos sobre la salud (Fontecha *et al.*, 2011).

Los fosfolípidos comparten una estructura común que consiste en dos ácidos grasos (AG) esterificando al glicerol en las posiciones *sn*-1 (mayoritariamente

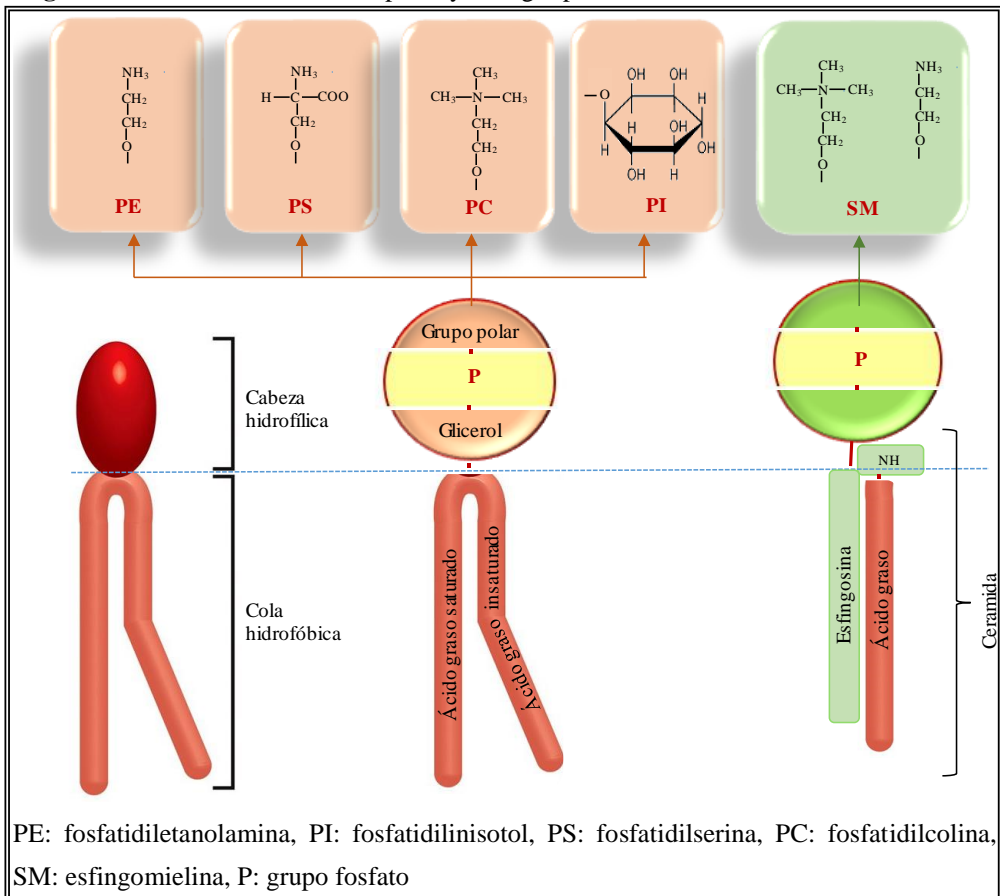
saturados) y *sn*-2 (mayoritariamente insaturados), atribuyéndose a ellos la hidrofobicidad de la molécula. El componente que le otorga carácter hidrofílico (Figura 4), está constituido por el grupo fosfato unido al último -OH de la posición *sn*-3 del glicerol, que mediante un enlace fosfodiéster puede unirse a su vez a cuatro posibles grupos como la etanolamina, el inositol, la serina o la colina, de los que los fosfolípidos toman su nombre (fosfatidiletanolamina -PE-, fosfatidilinositol -PI-, fosfatidilserina -PS- o fosfatidilcolina -PC-, respectivamente) (Vance, 2002). Cuando alguno de estos fosfolípidos pierde uno de los AG que forman parte de su estructura por acción de la fosfolipasa, se origina la correspondiente lisoforma del compuesto (liso-PE, liso-PI, liso-PS y liso-PC). Sin embargo, cuando el componente que se elimina es la cabeza polar, la estructura resultante se denomina ácido fosfatídico (AP).

La esfingomielina (SM) pertenece al grupo de los esfingolípidos, por lo que no comparte una estructura común con los fosfolípidos. Se encuentra únicamente en las células animales y su análogo en plantas es la ceramida fosforilinositol. La estructura de la SM consiste en una ceramida (AG unido a una esfingosina a través de un enlace amida) que lleva incorporada la mayor parte de las veces, una fosforilcolina en la posición *sn*-1, aunque también puede contener una fosfoetanolamina (Figura 4).

El ciclo de biosíntesis de los fosfolípidos comienza en la capa externa de la membrana mitocondrial y en el RE, con la acción de la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa, que incorpora un acilo graso CoA, normalmente saturado, a la posición *sn*-1 del glicerol-3-fosfato dando lugar al ácido lisofosfatídico (liso-AP) (ver Figura 5). Para la obtención del AP en el RE, es necesaria la acción de una segunda enzima, acilglicerol-3-aciltransferasa, que unirá otro acilo graso CoA, generalmente insaturado, en la posición *sn*-2 del glicerol. Posteriormente, el AP se convierte en sustrato de dos vías enzimáticas metabólicas importantes. En la membrana del RE, la fosfatasa actúa sobre el AP citosólico, separando el grupo fosfato de la posición *sn*-3, dando lugar a diacilglicéridos (DAG). Mediante la acción de la diacilglicerol aciltransferasa, se puede esterificar otro AG en dicha posición

dando lugar a triacilgliceridos (TAG). La otra vía consiste en la síntesis de PC y PE en la superficie y en el interior del RE, respectivamente. Dicha síntesis se inicia a partir de AP por la unión de una molécula de colina o etanolamina mediante la acción de las enzimas citidina difosfato (CDP): CDP-colina:1,2-diacilglicerol colina fosfotransferasa y CDP-etanolamina:1,2-diacilglicerol etanolamina fosfotransferasa, respectivamente (Baenke *et al.*, 2013).

Figura 4. Estructura de los fosfolípidos y esfingolípidos.

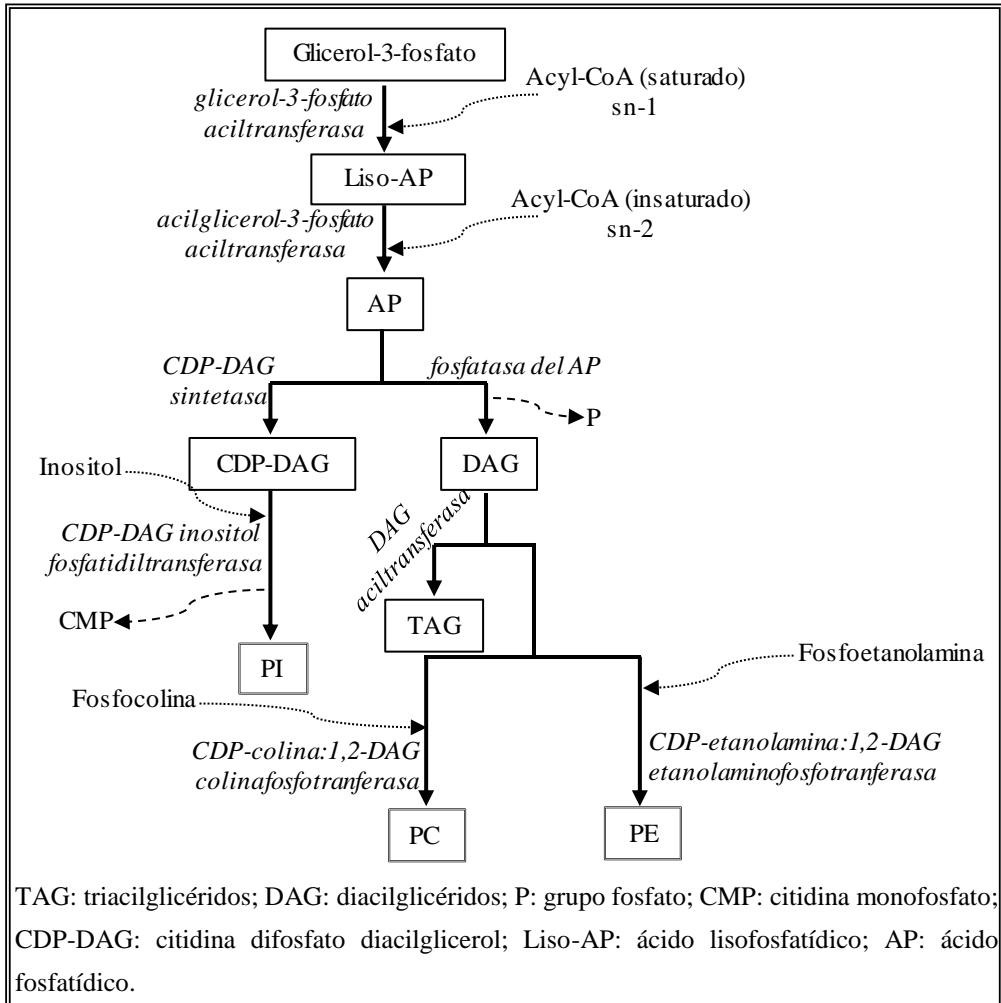


Fuente: Castro-Gómez *et al.*, 2015 modificada

Durante la síntesis de PI, el AP es inicialmente transformado en CDP-DAG por la acción de CDP-DAG sintetasa. Posteriormente, en presencia de la CDP-DAG inositol fosfatidiltransferasa, el inositol es capaz de unirse a la molécula de CDP-

DAG dando PI y citidina monofosfato (CMP), como productos de la reacción (Figura 5) (Gardocki *et al.*, 2005).

Figura 5. Rutas de síntesis de fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS).



Fuente: Castro-Gómez *et al.*, 2015 modificada

La biosíntesis de la PS se puede desarrollar por dos posibles rutas metabólicas y es dependiente de la presencia de PC y de PE. Al entrar en contacto la PC o PE con una molécula de serina, en presencia de enzima PS sintetasa I o II, se produce el intercambio de colina o etanolamina por serina.

La síntesis de la SM puede tener lugar tanto en el aparato de Golgi como en la membrana plasmática, estando catalizada por la SM sintetasa I y la SM sintetasa II, respectivamente. Utilizando como sustrato PC y ceramida, dichas enzimas producen SM y DAG. La ruta que implica la PE, transcurre en el RE y consiste en transformar la ceramida en una ceramida fosforiletanolamina tras adquirir este grupo de una PE metilada (Merrill, 2011).

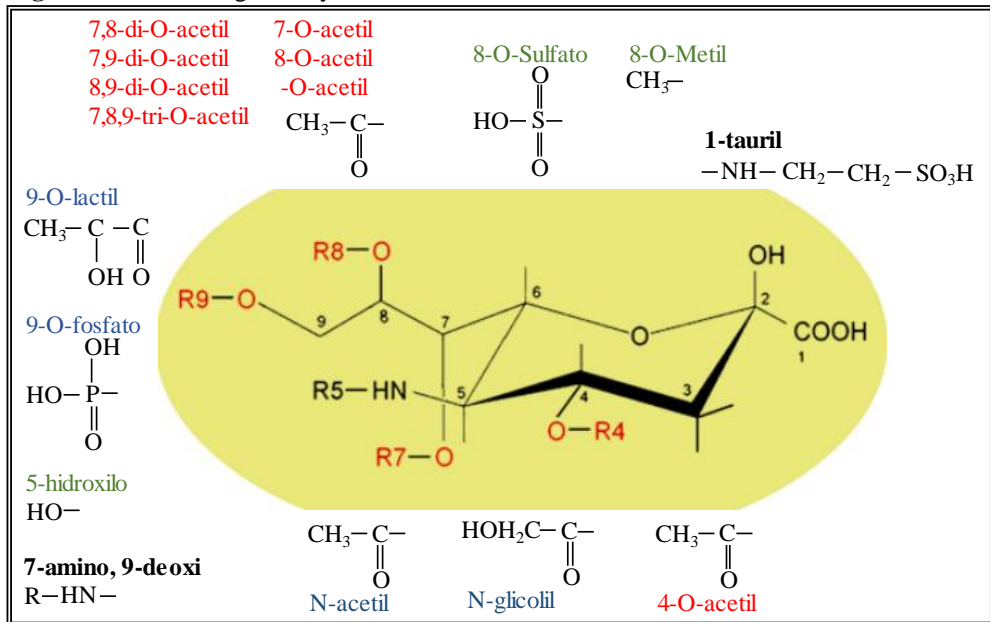
1.3. Ácido siálico

Sia es un término genérico para la familia de los derivados del ácido neuramínico (Neu), un monosacárido de 9 carbonos. Los primeros compuestos descritos como Sia forman parte de las glicoproteínas de mucinas salivares (Blix, 1936) y de GG de cerebro (Klenk, 1941), de hecho, la palabra siálico proviene del griego *sialos*, que significa saliva. Posteriormente, Kuhn & Brossmer (1954) identifican en leche un compuesto similar, al que denominan ácido lactámico; Zilliken *et al.* (1955) descubren el mismo compuesto y lo denominan ácido ginamínico. Con el fin de homogenizar la nomenclatura de estos compuestos, en 1957, Blix *et al.* utilizan el nombre de “ácido siálico” (Lacomba *et al.*, 2010; Cabezas, 2011). En la actualidad este término define a más de 50 compuestos diferentes que presentan una estructura de α -ceto azúcares ácidos de 9 carbonos con una amina en el carbono 5, como muestra la Figura 6.

Esta variabilidad se debe a modificaciones naturales sobre la estructura básica. Las sustituciones más comunes se dan sobre el nitrógeno unido al C-5, donde se puede encontrar un grupo amino (con sus respectivas sustituciones) o hidroxilo (KDN). El C-5 normalmente tiene un grupo N-acetil, dando ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) (Figura 7a) y este N-acetil puede ser hidroxilado, dando ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) (Figura 7b). También puede darse que en el C-5 no haya ninguna sustitución (ácido Neu) (Wang, 2009). A partir de estas moléculas pueden producirse sustituciones adicionales sobre los hidroxilos de los carbonos C-4, C-7, C-8 y/o C-9. Además de estas sustituciones, existen formas insaturadas y/o anhidro. El grupo carboxilo en C-1, en condiciones fisiológicas, se

ioniza y condensa en forma de lactona (con algún grupo hidroxilo de azúcares), en forma de lactama (con un grupo amino libre en C-5 de otro Sia) o se polimeriza. También pueden formar parte de heterodisacáridos, por unión de fucosa o galactosa al C-4 y glucosa al C-8.

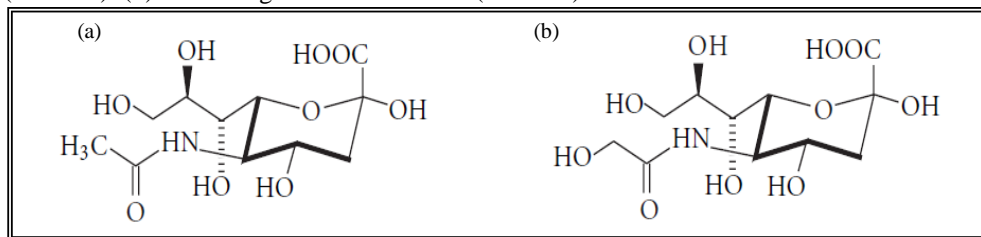
Figura 6. Estructura general y sustituciones del ácido siálico.



Fuente: Schauer et al., 2011

El Sia se encuentra en todos los tejidos y fluidos biológicos de los vertebrados y está ampliamente distribuido a lo largo de tejidos humanos como hígado, riñones, plasma, cerebro, y varios fluidos, incluyendo suero, saliva, orina, líquido amniótico y LH (Svennerholm, 1958; Wang *et al.*, 2001). En menor medida también se ha descrito en invertebrados inferiores, hongos (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*), bacterias (*Escherichia coli* K1, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*), protistas (*Entamoeba histolytica*, *Theileria sergenti*), arqueas, virus y células procariotas. Su distribución en tejidos y fluidos biológicos es característica para cada organismo, pudiendo variar sus contenidos a lo largo de la vida o según las condiciones ambientales; su síntesis es específica para cada especie (Lacomba *et al.*, 2010).

Figura 7. Compuestos de la familia del ácido siálico. (a) Ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac). (b) Ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc).



Fuente: Kolter, 2012

El Sia puede sintetizarse *de novo* a partir de glucosa u otros productos de la glucólisis, siguiendo la ruta de síntesis de las hexosas (aminoazúcares). El producto de la ruta de las hexosas (*N*-acetilmanosamina-6-fosfato) es el que se utiliza como inicio de la síntesis propiamente dicha de Sia, que tiene lugar en el citosol celular; siendo su precursor la *N*-acetilglucosamina-6-fosfato (Mártinez & Suarez, 2010) (Figura 8).

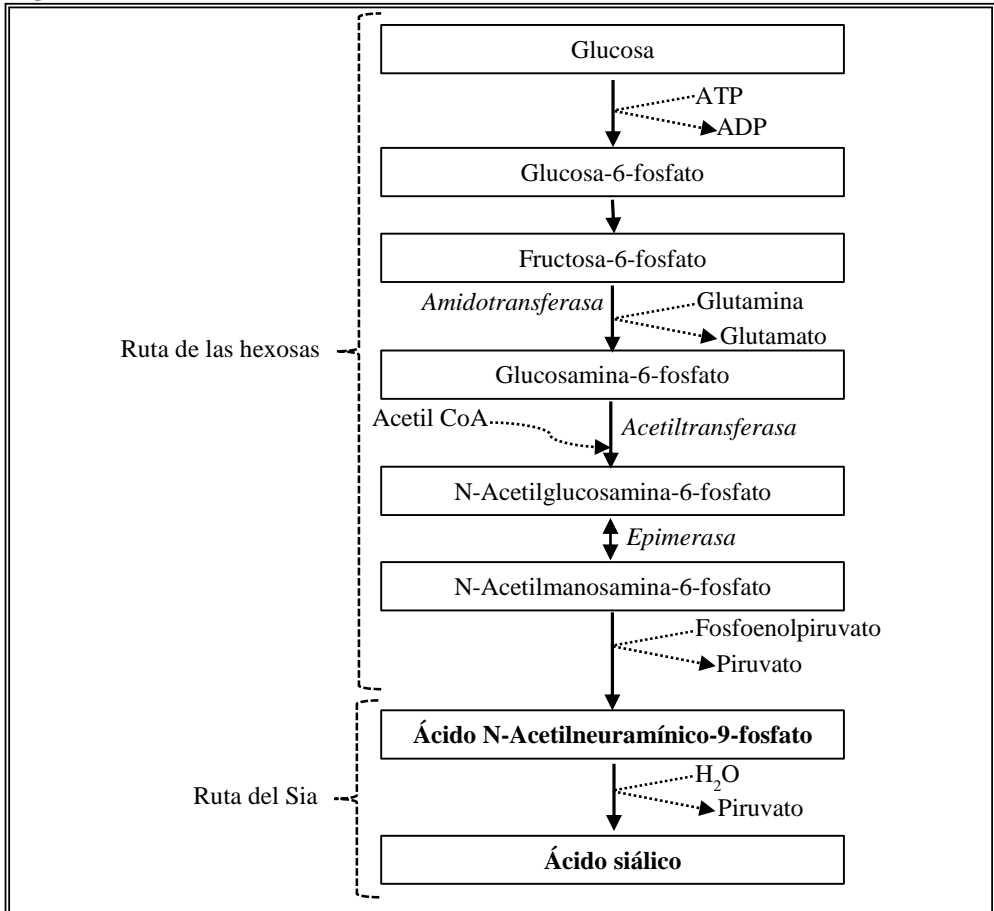
Las tres formas más frecuentes que se encuentran en la naturaleza son Neu5Ac, Neu5Gc y *N*-acetil-9-*O*-acetilneuramínico. El Neu5Ac es la forma más común de Sia presente en glicoconjugados humanos, incluyendo glicoproteínas, glicosaminoglicanos, GG y mucinas. El Sia también se encuentra como moléculas terminales de cadenas de glicanos y en forma de Sia libre, en proporción muy baja (3%) (Wang, 2009).

La incorporación del Sia a los glicanos, para generar glicoconjugados, se cataliza por la acción de enzimas específicas como sialiltransferasas; mientras que la eliminación del Sia de los sialoconjugados se cataliza por sialidasas. La modificación del Sia también está mediada por otras enzimas, en particular, la hidroxilasa CMP-Neu5Ac (codificada por el gen CMAH) que realiza la conversión de Neu5Ac a Neu5Gc.

Debe destacarse que la forma Neu5Gc no puede ser sintetizada por el ser humano (por carencia del gen CMAH), por lo que su presencia en tejidos y fluidos es prácticamente nula. Un mínimo porcentaje (alrededor del 1%) de Neu5Gc

respecto al Sia total se ha descrito en hígado, riñones, piel, bazo, testículos, corazón y un 0,01% en cerebro (Schröder *et al.*, 1983). Además, se ha detectado su presencia en el meconio de los neonatos y en tejido tumoral o en el plasma de pacientes con ciertos tipos de cánceres como colon, retina, piel y mama (Tzanakakis *et al.*, 2006). En el resto de mamíferos es una forma habitual y mayoritaria (Varki, 2001).

Figura 8. Ruta de síntesis de ácido siálico en el ser humano.



Fuente: Martínez & Suarez, 2010

El Neu5Gc, ingerido a través de la dieta (principalmente carne roja y productos lácteos), en ausencia de patologías, es rápidamente hidrolizado o excretado por la orina, en su práctica totalidad. No obstante, en presencia de toxinas como la Shiga

producida por *Escherichia coli*, pueden desencadenar el síndrome urémico hemolítico, ya que esta toxina se adhiere a las células humanas que contienen Neu5Gc. Además, la acumulación de Neu5Gc puede causar desórdenes en el sistema inmune debido al aumento de la concentración de anticuerpos IgA, IgM e IgG (Wang, 2009).

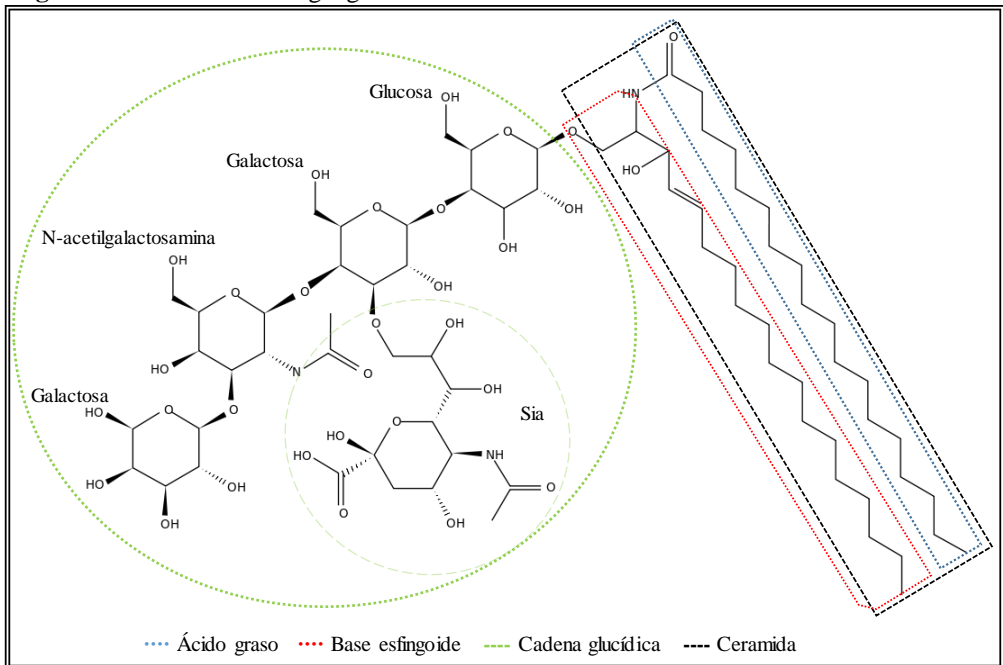
1.4. Gangliósidos

Los GG son glicosfingolípidos ácidos, por contener en su estructura al menos un residuo de Sia (Cabezas *et al.*, 1989). Se trata de compuestos anfóteros, constituidos por una ceramida (parte hidrofóbica) unida al menos a un monosacárido (parte hidrofílica). La ceramida a su vez está compuesta por una base esfingoide (cadena hidrocarbonada de 16 a 20 átomos de carbono que contiene grupos amino y alcohol, así como insaturaciones) unida por un enlace amida a un AG (Vesper *et al.*, 1999) (Figura 9). En los animales, este monosacárido puede ser glucosa o galactosa, generando glucosilceramida (GluCer) o galactosilceramida (GalCer), respectivamente. En el caso de la glucosa pueden establecerse otros enlaces glucosídicos; normalmente uniéndose a una galactosa, generando lactosilceramida (LacCer) y sobre ésta otros compuestos, que dan lugar a distintas series de glicosfingolípidos (lacto, neolacto, muco, globo, isoglobo y ganglio). En función del tipo de glúcidos que se unan a la base esfingoide, los glicosfingolípidos pueden ser neutros (monosacáridos sin carga) o ácidos (sulfátidos -azúcares sulfatados, fosfoglicosfingolípidos -fosfodiéster, o GG -Sia) (Zancada, 2008). Los GG presentan una gran variabilidad estructural, debido a la composición de la ceramida (distinta base esfingoide y AG) y a la cadena glucídica unida a la ceramida (glucosa, galactosa, N-acetilgalactosamina y galactosa). Además, sobre cada uno de los monosacáridos puede unirse uno o varios residuos de Sia en sus diversas estructuras (Rueda *et al.*, 1998a). A modo de ejemplo, en la Figura 9 se muestra la estructura de un GG.

Al ser un grupo tan diverso y heterogéneo de compuestos su nomenclatura es compleja. Existen dos formas de nombrar a los GG, una común, poco precisa, simple

y fácil de recordar propuesta por Svennerholm (1963) y otra más precisa propuesta por la IUPAC-IUB (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada - Unión Internacional de Bioquímica) (1997), ya que aporta una información más completa que abarca a todos los glicosfingolípidos (más de 300 moléculas diferentes) y permite hacer frente al amplio espectro de estructuras identificadas en los últimos años. En ambos casos, para simplificar la nomenclatura, no se tiene en cuenta la composición de la ceramida. En la Tabla 1 se muestran varios ejemplos de ambas nomenclaturas.

Figura 9. Estructura de los gangliósidos.



En la nomenclatura de Svennerholm se utiliza un código alfanumérico de tres o cuatro caracteres (Tabla 1), comenzando con la letra G, la cual es común a todos los GG. A continuación, con las letras M, D, T, Q, P, H o S se indica el número de residuos de Sia, según sean uno, dos, tres, cuatro, cinco, o excepcionalmente seis o siete. Con un número, se indica la longitud de la cadena glucídica: 1-cuatro monosacáridos, 2 -falta galactosa, 3 -falta galactosa y N-acetilgalactosamina y 4 -

sólo tiene glucosa. Finalmente, en los GG en los que el Sia puede estar en más de una posición, se coloca una letra minúscula (a, b o c) que indica donde se sitúa (Svennerholm, 1963).

Tabla 1. Nomenclatura y estructura de algunos gangliósidos.

Estructura	IUPAC-IUB	Svennerholm
NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc-Cer	II ³ - α -Neu5Ac-Gg ₂ Cer	GM ₃
NeuGc α 2,3Gal β 1,4Glc-Cer	II ³ - α -Neu5Gc-Gg ₂ Cer	
NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc-Cer	II ³ ,V ⁸ - α -Neu5Ac ₂ -Gg ₂ Cer	GD ₃
NeuGc α 2,8NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc-Cer	II ³ - α -Neu5Ac-V ⁸ -Neu5Gc-Gg ₂ Cer	
NeuGc α 2,8NeuGc α 2,3Gal β 1,4Glc-Cer	II ³ ,V ⁸ - α -Neu5Gc ₂ -Gg ₂ Cer	
GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer	II ³ - α -Neu5Ac-Gg ₃ Cer	GM ₂
GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer	II ³ - α -(NeuAc)2-Gg ₃ Cer	GD ₂
Gal β 1,3GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer	II ³ - α -Neu5Ac-Gg ₄ Cer	GM ₁
NeuAc α 2,3Gal β 1,4GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer	II ³ ,IV ³ - α -Neu5Ac ₂ -Gg ₄ Cer	GD _{1a}
Gal β 1,3GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer	II ³ ,V ⁸ - α -Neu5Ac ₂ -Gg ₄ Cer	GD _{1b}
NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer	II ³ ,IV ³ ,VI ⁸ - α -Neu5Ac ₃ Gg ₄ Cer	GT _{1a}
NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer	II ³ ,IV ³ ,V ⁸ - α -Neu5Ac ₃ -Gg ₄ Cer	GT _{1b}
NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,8NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc-Cer	II ³ ,IV ³ ,V ⁸ VII ⁸ α Neu5Ac ₄ -Gg ₄ Cer	GQ _{1b}

Cer: ceramida; Gal: galactosa; GalNAc: N-acetilgalactosamina; Gg: ganglio; Glc: glucosa

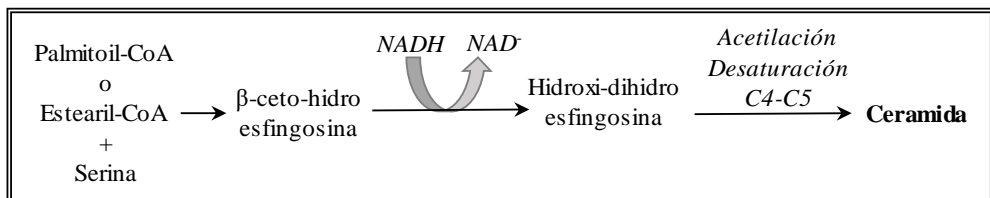
Según el método de la IUPAC-IUB, comenzando de derecha a izquierda, se nombra la ceramida de modo genérico como “Cer”, seguido del símbolo “Gg”, que define la serie ganglio, con un subíndice que indica la longitud de la cadena glucídica, pero en este caso el 1 indica que sólo está presente la glucosa, 2 -glucosa y galactosa, 3 -glucosa, galactosa y N-acetilgalactosamina, y el 4 que está la cadena completa. A continuación, se nombra el Sia haciendo referencia a la estructura de éste (Neu5Ac, Neu5Gc, etc.), con un subíndice que indica el número de los mismos presentes en la estructura, y precedido por el tipo de enlace con el que se une a la cadena glucídica (α o β). Por último, con números romanos se indica la localización del Sia en la cadena glucídica (I -Glc, II -Gal, III -GalNAc, IV -Gal terminal, V unido

al primer residuo de Sia, VI al segundo, etc.), y con un superíndice el átomo de carbono implicado en la unión (IUPAC-IUB, 1997).

Los GG han sido aislados en cerebro, hígado, páncreas, bazo, placenta, linfocitos, eritrocitos, plasma, líquido amniótico y leche (Rueda *et al.*, 1998a; Lacomba *et al.*, 2010). En el ser humano se localizan, fundamentalmente, en el tejido neuronal; aunque, es posible encontrar algunos en tejidos extraneuronales y fluidos biológicos como la LH. Los GG pueden ser sintetizados de *novo* en el organismo, pero en los recién nacidos, debido a la inmadurez de su sistema metabólico, es esencial su ingesta mediante la dieta para un correcto desarrollo cerebral y cognitivo, pudiendo actuar también como moduladores de la respuesta inmune (Wang, 2009).

La síntesis de *novo* de los GG comienza con la formación de la ceramida (Figura 10). Una vez formada, la ceramida es transportada al aparato de Golgi proximal insertándose en la cara citosólica de la membrana donde es glucosilada. La GluCer se trasloca a la cara luminal de la membrana, donde se producen diversas glicosilaciones, la primera es la síntesis de LacCer. Entre las glicosilaciones se incluye la inserción de Sia por la acción de las sialittransferasas (SAT) I (generación de GM₃), II (GD₃) y III (GT₃) (Tettamanti, 2004).

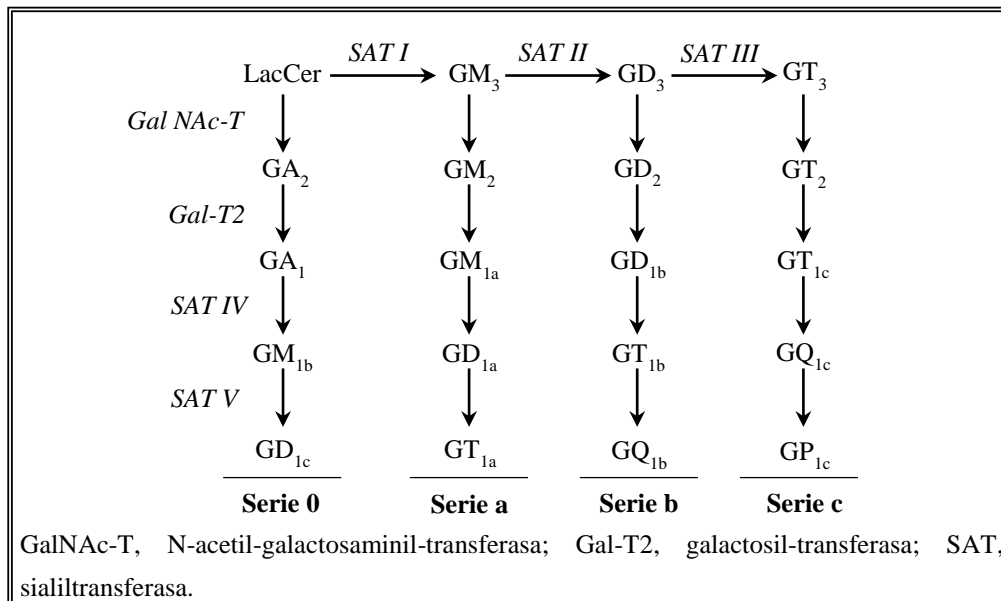
Figura 10. Biosíntesis de la ceramida.



Fuente: Rueda, 2007 modificada

A partir de LacCer, GM₃, GD₃ y GT₃ se sintetizan las series de GG 0, a, b y c, respectivamente. En la síntesis de cada serie, las enzimas N-acetil-galactosaminil-transferasa, galactosil-transferasa y SAT IV y V introducen, secuencialmente, un residuo de N-acetilgalactosamina, galactosa y Sia, respectivamente, para dar lugar a los GG más complejos (ver Figura 11) (Tettamanti, 2004).

Figura 11. Síntesis de los gangliósidos de las series 0, a, b y c.



Fuente: Tettamanti, 2004

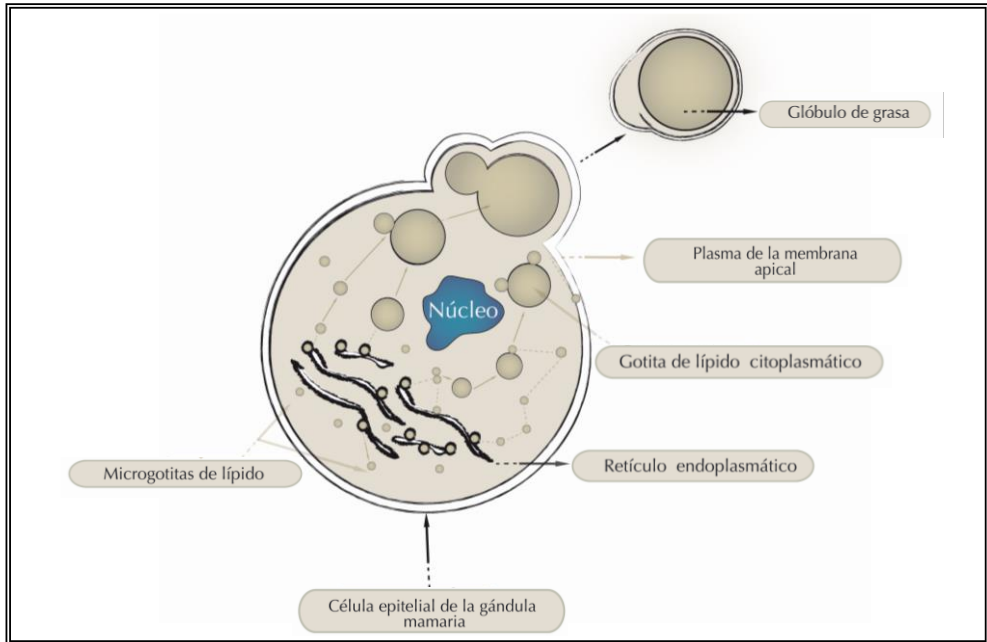
La síntesis está fuertemente regulada para asegurar la distribución correcta de cada uno de los GG en fluidos y membranas celulares. En éstas hay enzimas que pueden glicosilar y desglicosilar para transformar los GG, sin pasar por el aparato de Golgi. Además, se han descrito rutas de recuperación y reutilización de los GG (Tettamanti, 2004).

2. Glóbulo de grasa y membrana del glóbulo de la leche

Los lípidos son excretados, en la glándula mamaria, en forma de glóbulos de grasa de tamaños comprendidos entre 0,3 y 15 µm (3,5-5 µm de diámetro medio) y rodeados de una membrana biológica conocida como la MFGM, que actúa como un emulsionante y los protege de la coalescencia y degradación enzimática (Dewettinck *et al.*, 2008; El-Loly, 2011). Estos glóbulos de grasa, conteniendo mayoritariamente TAG, son sintetizados en el RE de las células epiteliales mamarias y crecen en tamaño conforme se mueven hacia la membrana de la célula apical hasta ser depositados en el lumen alveolar (Buchheim, 1986; El-Loly, 2011). Durante el proceso de deposición, el glóbulo es envuelto por porciones de membrana celular

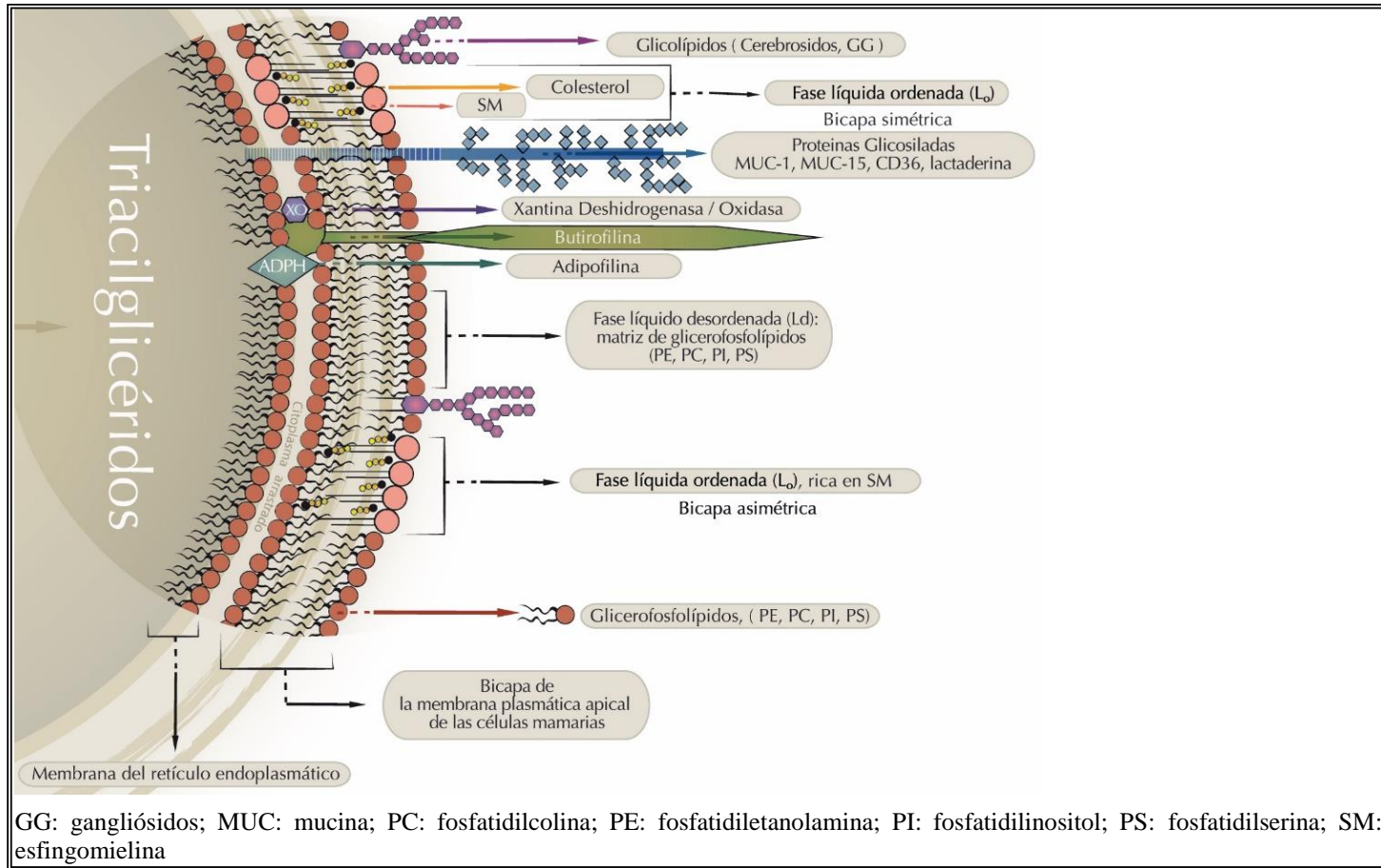
formando el glóbulo graso de la leche y su membrana (Figura 12) (Lopez *et al.*, 2008).

Figura 12. Formación, crecimiento y secreción de los glóbulos grasos de la leche.



La MFGM, estructuralmente, es una tricapa lipídica de aproximadamente 10-20 nm de espesor que representa entre el 2-6% de la masa del glóbulo graso. Desde el núcleo del glóbulo graso al exterior existe una monocapa lipídica rica en proteínas adquiridas del RE de las células mamarias, en la cual las colas hidrofóbicas de los LP están en contacto con el núcleo de TAG. Seguida a ésta, se encuentra una capa proteica electrodensa, y finalmente, está rodeado por la bicapa procedente de la membrana plasmática apical de las células epiteliales mamarias, cuando el glóbulo está siendo excretado (Figura 13).

Figura 13. Estructura de la membrana del glóbulo graso de la leche.



Esta membrana está compuesta principalmente por un 25-70% de proteínas (asociadas a la membrana y enzimas) y un 26-41% de LP (fosfo- y esfingolípidos) (El-Loly, 2011; Smoczyński *et al.*, 2012). El colesterol representa el 90% de todos los esteroides de la MFGM y se localiza también en el interior del glóbulo graso en menor cantidad (Lopez *et al.*, 2008). Además, presenta otros compuestos como AG saturados, TAG, DAG, monoacilgliceridos (MAG), glicoproteínas, glicolípidos (globósidos -GluCer, cerebrósidos -LacCer y GG) (Dewettinck *et al.*, 2008; Lopez, 2011), algunos esteroides minoritarios como desmosterol y latosterol (Heid & Keenan, 2005), trazas de vitamina E, la cual es importante por su actividad antioxidante, y caroteno en muy pequeñas cantidades, ya que en su mayoría está presente en el interior del glóbulo (Smoczyński *et al.*, 2012).

Al igual que ocurre en las membranas celulares, la distribución de cada uno de los LP en la MFGM es diferente, lo que puede ser debido a sus propiedades físico-químicas, relacionadas principalmente con el grado de insaturación de sus AG y con el grupo presente en la cabeza polar (Smoczyński *et al.*, 2012). La monocapa (proveniente del RE) está formada, mayoritariamente, por PC y PE, mientras que la parte de la bicapa lipídica más cercana a ésta, contiene principalmente PE, PI y PS. En la parte externa de esta bicapa están los LP que contienen colina (PC y SM) y glicolípidos (cerebrósidos y GG), encontrándose además en ella los dominios lipídicos (“rafts”) de colesterol adquiridos de la membrana de la célula mamaria (Lopez *et al.*, 2011). Estos dominios lipídicos, ricos en SM y colesterol, presentan una disposición molecular ordenada llamada fase líquida ordenada (l_o), donde debido a su alta compactación es imposible que puedan ser anclados otros compuestos como proteínas. En cambio, alrededor de estos dominios se encuentra la fase líquida desordenada (l_d), en la que los fosfolípidos presentes se caracterizan por tener AG insaturados, que le confieren alta fluidez a esta zona y, por tanto, se pueden insertar otras sustancias como glicolípidos y glicoproteínas (Lopez, 2011; Zou *et al.*, 2012; Gallier *et al.*, 2015). La PE, debido a su reducido tamaño, facilita el anclaje y la inserción de proteínas a la bicapa, manteniendo de esta manera la estabilidad de la membrana (Vance, 2002).

Otros compuestos que contribuyen a la rigidez y curvatura de las membranas son los plasmalógenos. Se trata de fosfogliceridos, en los que en la posición sn-1 del glicerol, mediante un enlace éter, tienen unido un alcohol de cadena larga, manteniéndose común el resto de la estructura. La falta de un oxígeno hace que estos compuestos sean más lipofílicos y, por tanto, sean causantes de la rigidez. En LH, los plasmalógenos de PE representan el 40%.

Los fosfolípidos se componen de AG insaturados (18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3), los cuales son esenciales en la regulación de la fluidez de la MFGM y no contienen prácticamente AG de cadena corta y media (C4-C14). Este alto contenido de AG insaturados, particularmente AG esenciales n-6 y n-9, en los LP de la MFGM (43-65%) es mayor que en los TAG del glóbulo graso (núcleo) (30-41%) (Dewettinck *et al.*, 2008; Sánchez-Juanes *et al.*, 2009a). En particular, la PE es sumamente insaturada (68%), con altos niveles de 18:1 (52%) y 18:2 (14%), seguida por el PI y la PS, mientras que la PC contiene más AG saturados (16:0) que otros glicerofosfolípidos (Sánchez-Juanes *et al.*, 2009a). Curiosamente, el ácido oleico (18:1n-9) se distribuye de manera igualitaria en la posición sn-1 y sn-2, mientras que el ácido linoleico (18:2n-6) es mayoritariamente esterificado en la posición sn-2 para PC y PE, y el ácido palmítico (16:0) se localiza principalmente en la posición sn-1. La SM presenta mucha variabilidad en el tipo de AG, siendo mayoritariamente (~97%) AG saturados de cadena larga (16:0, 22:0, 23:0, 24:0), unido a una base esfingoide (18:1, 16:1, 17:1) (Bitman *et al.*, 1984; Lopez, 2011).

Las proteínas, al igual que los lípidos, están dispuestas asimétricamente. La adipofilina (ADPH) presenta alta afinidad por los TAG, localizándose en la monocapa interior, al igual que la proteína fijadora de AG, ya que son proteínas de la membrana no glicosiladas (Riccio, 2004). La xantina deshidrogenasa/oxidasa (XDH/XO) se localiza sobre la parte interior de la monocapa lipídica, y está muy unida a la butirofilina (BTN), una proteína transmembrana de la capa externa y a la ADPH. Estas proteínas actúan como puntos de anclaje, formando un complejo supramolecular que interconecta la monocapa (interior de la membrana) con la

bicapa (exterior). Junto con la ADPH y la XDH/XO, la BTN tiene un papel importante en la estabilización de la MFGM. En la parte externa de la membrana se localizan proteínas como la lactadherina (dominio PAS VI/VII) y se glicosilan algunas proteínas como la mucina-1 (MUC-1). Otras glicoproteínas presentes en la MFGM son la mucina-15 (MUC-15 o dominio PAS III) y la proteína CD36 (dominio PAS IV) (El-Loly, 2011).

Los hidratos de carbono de los glicolípidos (como los GG) y glicoproteínas están orientados hacia el exterior (fase acuosa) y se encuentran uniformemente distribuidos sobre la superficie externa de la membrana, formando el glicocalix de la MFGM (Smoczyński *et al.*, 2012).

En el caso de la LH, el tamaño de los glóbulos de grasa está influenciado por la genética de la mujer y, a medida que aumenta el tamaño del glóbulo, aumenta el contenido de TAG y la MFGM disminuye (Bourlieu *et al.*, 2015a). Esto puede ser debido a que con el transcurso de la lactancia la biosíntesis de LP en la glándula mamaria disminuye (Bitman *et al.*, 1984), unido a una secreción más fina de esta membrana (Bourlieu *et al.*, 2015a). La secreción de la leche en pequeños glóbulos de grasa es un proceso biológico que requiere una elevada producción de membrana para cubrir toda la superficie del glóbulo y, por tanto, una alta actividad de síntesis de las células lactantes. En este sentido, el calostro tiene menor cantidad de grasa dispuesta en una elevada cantidad de glóbulos grasos de pequeño tamaño, que apenas contienen TAG; pero sí una elevada cantidad de membrana (Lopez, 2011) y, por tanto, mejor accesibilidad para que la lipasa actúe (Boersma *et al.*, 1991). El diámetro de los glóbulos de grasa aumenta con el transcurso de la lactancia (1,74 μm en el calostro, 1,84 μm en transición y 4,10 μm en LH madura) (Bitman *et al.*, 1983). Debido a factores genéticos y hábitos alimentarios, el glóbulo de grasa puede ser mayor en el calostro y disminuir con el transcurso de la lactancia de 5,75, 4,01 y 4,74 μm para calostro, LH de transición y madura, respectivamente (Zou *et al.*, 2012) o variar de 8,9 y 2,8 μm , para calostro a las 12 y 96 h después del nacimiento, a 5 y 6,5 μm para LH madura a los 3 y 6 meses, respectivamente (Michalski *et al.*, 2005).

Por lo tanto, la MFGM en base a la estructura descrita anteriormente constituye una fuente de compuestos bioactivos, cuyas funciones fisiológicas, de forma general, se describen a continuación.

3. Funciones fisiológicas

Las distintas funciones de los compuestos bioactivos objeto de estudio vienen determinadas por componentes de su estructura como es el caso de los AG que forman parte de fosfolípidos, ceramidas y esfingosinas (Rombaut & Dewettinck, 2006) o la colina (nutriente esencial para los recién nacidos) de la SM y PC. Del mismo modo la funcionalidad del Sia se ve reflejada en los GG, condicionada por su contenido y localización en los mismos y su ionización en condiciones fisiológicas.

Estos compuestos participan en funciones como son el desarrollo de la mucosa intestinal, del sistema inmune y nervioso del recién nacido, al igual que en la actividad metabólica. El colesterol aportado por la LH es importante para la síntesis de hormonas esteroideas, vitaminas y sales biliares (Adams & Hollis, 2002; Dietschy & Turley, 2004) y es imprescindible para el metabolismo del calcio y otros nutrientes. Aparentemente actúa como nutriente durante el periodo neonatal y factor de activación del metabolismo hepático. Además, junto con los AG son compuestos estructurales necesarios para formar membranas celulares (Uauy & Hoffman, 1991). Como curiosidad mencionar que el cerebro contiene cinco veces más colesterol que otros órganos y representa el 2-3% del peso total y un 20-30% de todos los lípidos del cerebro (Pfrieger, 2003). Otros compuestos que también forman parte de la membrana celular son los GG; debido a su carácter anfipático modulan la formación y estabilización de dominios lipídicos, confiriéndole mayor o menor curvatura a la misma según la composición lipídica de cada zona de la bicapa (Sonnino *et al.*, 2006).

Los LP, de manera indirecta, forman parte de procesos metabólicos, neurológicos y de señalización intracelular esenciales para la vida como son: el crecimiento, el reconocimiento y la apoptosis celular, el transporte, la replicación del DNA, la secreción o señalización neuronal, entre otros (Pettus *et al.*, 2004; Guo *et*

al., 2005). Motouri *et al.* (2003), después de realizar un estudio con ratas alimentadas con leche, observan que la SM y sus metabolitos pueden desempeñar un importante papel en la maduración del intestino neonatal durante el periodo de lactancia. Además, dada la estructura y las propiedades de la superficie activa de la MFGM, puede desempeñar un papel clave en el transporte y en la transferencia de nutrientes liposolubles a lo largo del tracto gastrointestinal (Liu *et al.*, 1995; Bourlieu *et al.*, 2015a).

Las funciones más importantes y específicas en las que intervienen estos compuestos son:

- **Acción frente a patógenos entéricos:** Es bien conocido que los episodios más frecuentes de diarrea infantil de origen bacteriano son causados por distintas cepas de *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Helicobacter*, *Shigella* y *Listeria* (Rosenberg, 2007; OMS, 2013). Tanto las bacterias, como los virus, utilizan los carbohidratos de las superficies celulares (glicocalix) como puntos de anclaje a las células hospedadoras. Este anclaje es el primer paso para inducir una infección (Wang & Brand-Miller, 2003). El Sia que forma parte de los GG, libre o unido a otras superficies celulares (mucina), actúa como falsos receptores de los agentes patógenos, inhibiendo su adhesión al enterocito y epitelio (Séverin & Wenshui, 2005). De esta forma protegen al lactante de enterobacterias (Newburg, 1999), rotavirus y enterotoxinas, previniendo diarreas infecciosas moderadas, o severas, causadas por *Campylobacter jejuni*, calicivirus y la toxina ST de *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* y la enterotoxina de *Vibrio cholerae* (Laegreid *et al.*, 1986; Rueda *et al.*, 1998a; Salcedo *et al.*, 2013), ya que su situación en la parte externa del glóbulo de grasa les confiere una gran superficie de contacto con el medio.

Se ha hipotetizado que el organismo humano modifica la estructura del Sia, presente en las membranas celulares, para ser reconocido por los patógenos. Esto explicaría la gran cantidad de estructuras conocidas de Sia. Las diferencias en la estructura de Sia entre distintas especies evita que ciertos patógenos superen la barrera de la especie. Sin embargo, debido a que los patógenos tienen capacidad de

replicación mucho mayor que la de las células hospedadoras, este mecanismo de defensa no es suficientemente efectivo. (Angata & Varki, 2002).

Los LP se caracterizan por sus propiedades antioxidantes, antivirales y antimicrobiana, esta última atribuida a productos formados durante la digestión (Van Hooijdonk *et al.*, 2000). En este sentido los liso-fosfolípidos, fuertes humectantes, causan lisis de bacterias Gram positivas. La SM puede ser transformada en liso-SM, la cual, según estudios *in vitro*, tiene un alto poder bactericida frente *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* and *Clostridium Perfringens*, y moderadamente menor contra *Escherichia coli* y *Salmonella Enteritidis* (Sprong *et al.*, 2001). Por tanto, los esfingolípidos de la LH pueden disminuir la adhesión de patógenos a la mucosa intestinal y facilitar la eliminación de patógenos.

Por otra parte, existen estudios que avalan el efecto protector de la PC sobre la mucosa gastrointestinal. Este LP previene alteraciones de sustancias tóxicas como la aspirina (Anand *et al.*, 1999) y reduce la enterocolitis necrotizante en niños pre-término hospitalizados (Carlson *et al.*, 1998) ya que mantiene la barrera hidrofóbica defensiva de la mucosa gástrica.

En un estudio con lactantes peruanos de 6 meses de edad se ha constatado la influencia de las proteínas de la MFGM; al suplementar la dieta de los lactantes con estas proteínas presentaban una menor diarrea que el grupo control, lo que apoya adicionalmente la actividad antimicrobiana de esta fracción de la leche. Esta disminución de la diarrea puede atribuirse a un efecto directo sobre la microbiota, una mejora de la función inmune o a los componentes que funcionan como falsos receptores para los patógenos. En este sentido, Newburg *et al.* (1998) demuestran que la infección por rotavirus en niños mexicanos disminuye cuando se añade lactadherina (Zavaleta *et al.*, 2011).

También se ha observado que la alimentación de lactantes de 4 meses de edad con PL que llevan adicionado un ingrediente rico en MFGM (INPULSE®), disminuye significativamente los episodios febriles comparado con el grupo control

(alimentados con PL sin adición de INPULSE®), algo que es atribuido a los LP de la MFGM (Veereman-Wauters *et al.*, 2012).

Además de los compuestos ya mencionados, la MFGM contiene glicoproteínas que confieren protección contra bacterias y virus. Entre estas se encuentra MUC-1, lactadherina y XDH/XO. MUC-1 es capaz de unirse a la *Escherichia coli* y cepas de rotavirus previniendo su replicación (Yolken *et al.*, 1992; Schroten *et al.*, 1992, 1993). La lactadherina protege contra la diarrea provocada por rotavirus en recién nacidos (Kvistgaard *et al.*, 2004). La XDH/XO inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*, debido a la formación de peróxido de hidrógeno, o al estímulo del sistema de lactoperoxidasa en la leche (Harrison, 2004, 2006; Martin *et al.*, 2004).

- **Función prebiótica:** El Sia contribuye a disminuir el pH intestinal favoreciendo la colonización de la microbiota intestinal por parte de las bifidobacterias. Además, la propia cadena de oligosacáridos que forma parte de los GG presentes en los glóbulos de grasa de la leche, sirve como sustrato para las bacterias de la microbiota intestinal. Se ha demostrado que en niños alimentados con PL suplementado con una cantidad de GG similar a la presente en LH, se favorece el crecimiento de bifidobacterias, en detrimento del de *Escherichia coli* y probablemente de otras especies potencialmente patógenas (Rueda *et al.*, 1998b).

- **Función probiótica:** Lactantes de 4 meses alimentados con PL elaborados con Lacprodan MFGM-10 (ingrediente rico en MFGM), presentan niveles de probióticos (*Lactobacillus gasseri*) en saliva superiores a los alimentados con PL no suplementados (0,697 vs. 0,363 pg/ μ L), pero menores a los alimentados con LH (2,14 pg/ μ L) (Vestman *et al.*, 2013).

- **Función inmunitaria:** Los lactantes alimentados con LH presentan diferencias en el desarrollo del sistema inmune intestinal, respecto a los alimentados con lactancia artificial. Así, compuestos presentes en la LH en concentraciones muy bajas, como nucleótidos, Ig-A, GG y AG poliinsaturados, son factores críticos en la

expresión de la respuesta inmune a nivel intestinal (Rueda *et al.*, 2002). Los anticuerpos presentan moléculas de Sia en su estructura en mayor o menor proporción, viéndose su efecto modificado por la presencia del mismo: los anticuerpos con altos contenidos de Sia tienen disminuida su afinidad con los receptores celulares, con lo que tienen un efecto anti-inflamatorio. El Sia disminuye la afinidad de los anticuerpos Ig-G sobre los receptores Fc, los cuales son proteínas que se encuentran en la superficie de leucocitos y tienen como función el reconocimiento de los anticuerpos (Ig) mediante el fragmento Fc que las compone. Los individuos con patologías autoinmunes, por ejemplo, con artritis reumatoide, presentan los anticuerpos Ig-G sin Sia y sin galactosa en el residuo 297 de la fracción Fc (donde en condiciones normales están presentes), disminuyendo la afinidad de dichos anticuerpos (Nimmerjahn *et al.*, 2007; Mora & Rosales, 2009).

La función inmunitaria de los GG se debe no sólo a su acción antimicrobiana demostrada *in vitro* e *in vivo*, sino también a que induce los procesos de proliferación y activación de las células T y la diferenciación de los linfocitos Th1 y Th2. Por tanto, suplementar los PL con GG, concretamente con GD₃ por ser el más importante en LH, podría desempeñar un importante papel en el proceso de proliferación, activación y diferenciación de las células del sistema inmune intestinal en el recién nacido (Rueda *et al.*, 1998b, 2002).

Hay pocos estudios que evalúen el efecto del Sia y GG en la respuesta inmune intestinal, siendo la mayoría de ellos estudios *in vivo*. Así, se observa que al alimentar ratas con una dieta rica en GG (composición similar al calostro humano, pero mayor contenido) durante 2 semanas y posteriormente inducir una respuesta inmune al inyectar una solución de lipopolisacárido de *Escherichia coli*, el intestino presenta menor daño que en ratas control. Ello es debido a un aumento de la interleucina anti-inflamatoria IL-10 y un descenso de interleuquinas pro-inflamatorias (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral (TNF- α), así como una disminución de otras sustancias pro-inflamatorias (NO, TLB4 y PGE2) tanto en plasma como en mucosa (Park *et al.*, 2007, 2010), previniendo la degradación de la proteína de unión estrecha ocludina,

la cual forma parte de la barrera intestinal. De forma similar, se ha evaluado cómo los GG disminuyen el efecto negativo en el intestino de niños (9 niños entre 9-40 semanas de vida) con enterocolitis necrotizante producida por *Escherichia coli* unido a hipoxia. Se ha observado un efecto protector al disminuir la producción de IL-1 β , IL-6 y IL-8, así como de otras sustancias pro-inflamatorias como NO, H₂O₂ y mediadores pre-inflamatorios eicosanoides (Schnabl *et al.*, 2009).

- **Desarrollo neuronal:** Los nervios están recubiertos de mielina, una sustancia especialmente rica en colesterol y colina, la cual es esencial para la función nerviosa y la plasticidad de los mismos (Rozner & Garti, 2006). El colesterol, junto con la SM y sus metabolitos intervienen en la formación del sistema nervioso central, donde es requerido para el crecimiento y desarrollo del cerebro, concretamente en la mielinización (Spitsberg, 2005; Dewettinck *et al.*, 2008). Los GG forman parte de la membrana de las células nerviosas y actúan como ligando de glicoproteínas asociadas a mielina, cuyas funciones son mantener la estabilidad y estructura de la vaina de mielina en el axón neuronal y controlar la regeneración de los nervios (Vias & Schnaar, 2001). De un modo similar, el Sia ayuda a regenerar la mielina de las neuronas periféricas. Por ello, se ha propuesto utilizar polímeros de Sia para realizar bioimplantes en reconstrucciones de tejido nervioso periférico o reparar áreas dañadas del sistema nervioso central (Haile *et al.*, 2007).

El contenido de Sia y GG en el sistema nervioso durante las primeras etapas de la vida es muy elevado y necesario, siendo utilizado fundamentalmente para un correcto desarrollo cerebral (Abad-Rodríguez & Robotti, 2007). Tras el nacimiento este contenido decae, pero sigue expresándose en determinadas regiones del cerebro adulto, para generar plasticidad en membranas neuronales (Ong *et al.*, 1998) y regenerar el sistema nervioso (Oumesmar *et al.*, 1995; Varki, 2008).

Las moléculas adhesivas presentes en células neuronales son Ig, ampliamente distribuidas en la superficie de las células del sistema nervioso central, que se encargan de regular la migración celular, el crecimiento de las neuritas, la elongación de los axones y la formación de la unión sináptica. Su estructura contiene polímeros

de Sia (150-180 unidades) y estas cadenas poliméricas son de vital importancia en neurobiología, ya que regulan las funciones de estas inmunoglobulinas durante el desarrollo cerebral (Nakata & Troy, 2005).

Los GG también intervienen en los procesos de comunicación intercelular, ya que son capaces de inducir la apertura de los canales de calcio de las membranas presinápticas neuronales y permitir así la transmisión de la señal nerviosa (Rahmann, 1995). La adición exógena de GG, como activadores del desarrollo neuronal, indica un posible papel en la evolución postnatal del sistema nervioso del recién nacido durante el período en que sus propios mecanismos metabólicos no están aún desarrollados (Zancada, 2008).

Debe destacarse que, en 2009, la Autoridad Europea sobre Seguridad Alimentaria (EFSA) emitió un informe desfavorable en base a la propuesta de declaración de propiedad saludable, relativa al Sia como ingrediente activo del Lacprodan CGMP-10 (artículo 13.1 del Reglamento (CE) n° 109/2008). La declaración saludable solicitada fue: “está involucrado en el desarrollo cerebral”, concretado este efecto como “el Sia puede mejorar el aprendizaje y la memoria”. Este informe desfavorable destaca que, aunque el Sia está suficientemente caracterizado, faltan estudios causa-efecto que relacionen la ingesta dietética de Sia y la mejora del aprendizaje y la memoria en humanos (EFSA, 2009a).

Hasta la fecha se han realizado pocos ensayos clínicos en humanos que evalúen el impacto de los GG administrados por vía oral en las funciones neurológicas cognitivas y otras, pero los resultados son prometedores. La administración de GG fabricados biomédicamente (GM1a, GD1a, GD1b y GT1b) durante 3 meses por vía oral, a 2230 niños que sufren de parálisis cerebral mejora los síntomas neurológicos asociados con la parálisis cerebral, en particular, la tensión muscular, la función de las extremidades, la capacidad lingüística y la inteligencia, incluso más rápido en los niños más pequeños (0-3 años) (Xu & Zhu, 2005).

En otro pequeño estudio clínico llevado a cabo para evaluar el impacto de los GG, donde se suplementó los PL con GG a niveles de la LH, se observa que en lactantes normales y sanos de 0-6 meses, los niveles de GG en suero aumentaron y mejoró el rendimiento cognitivo en la escala de Griffith, la coordinación de manos y ojos y el rendimiento y coeficiente intelectual, en comparación con el grupo control (PL sin suplementar). Además, la concentración de GG en suero y las medidas cognitivas en el grupo suplementado fueron muy similares al grupo de referencia alimentado con LH (Gurnida *et al.*, 2012; Palmano *et al.*, 2015).

Posteriormente, Timby *et al.* (2014) observan que los lactantes de 12 meses, alimentados con PL suplementados con MFGM desde los 2 hasta los 6 meses, tienen mejor desarrollo cognitivo que los alimentados con PL no suplementadas, no existiendo diferencias significativas entre los alimentados con LH y PL suplementados. Por tanto, la MFGM contiene diferentes compuestos esenciales para el desarrollo del cerebro, que mejoran el desarrollo cognitivo. Entre estos compuestos esenciales, además de GG y Sia, están el colesterol y los LP que contienen colina (Veereman-Wauters *et al.*, 2012).

El colesterol es un elemento clave para la formación de las neuronas dopaminérgicas. Las dopaminas están relacionadas con el desarrollo del comportamiento, el control motor, los ciclos del sueño, el aprendizaje y la memoria (Lozoff *et al.*, 2006). En ratones se ha demostrado que el correcto funcionamiento de células productoras de dopamina del cerebro depende de formas oxidadas del colesterol (oxisteroles) que son capaz de activar un receptor específico. En cultivos de células madre embrionarias, el tratamiento con oxisteroles ayuda a la formación de un mayor número de células productoras de dopamina y reduce el crecimiento incontrolado de las células madre. Además, la unión de oxisterol a dos receptores nucleares (LXR-alfa y beta), afecta a la división celular, al crecimiento celular en el cerebro medio ventral y al desarrollo de neuronas dopaminérgicas en los embriones de ratón (Sacchetti *et al.*, 2009).

Generalmente, el colesterol total sérico en humanos está vinculado tanto a la función cognitiva, como la fluidez verbal, concentración y razonamiento abstracto (Scholtz *et al.*, 2013). La cantidad de colina es crítica para el normal desarrollo cerebral (Holmes-Macnary *et al.*, 1996) y la síntesis de neurotransmisores de acetilcolina que intervienen en la memoria. Además, regula la señal de transducción celular. La SM y la PC como fuentes de colina promueven la síntesis de neurotransmisores implicados en la memoria y en el desarrollo cerebral (Blusztajn, 1998). Además, es necesario el aporte de AG de cadena larga por los LP de la LH (linoleico, α -linolénico, araquidónico (ARA) y docosahexaenoico (DHA)) para la síntesis de la membrana neuronal (Bitman *et al.*, 1984) y el desarrollo del sistema nervioso infantil (Fleith & Clandinin, 2005). El ARA y DHA son imprescindibles para la síntesis de eicosanoides (Leis & Tojo, 2001; Pavón *et al.*, 2007) y son abundantes en el cerebro y retina, siendo necesarios para el óptimo desarrollo de las funciones visuales y cognitivas en las etapas pre- y posnatal (Innis, 1991; 2007; Toca *et al.*, 2015). Respecto al DHA, existen declaraciones de propiedades saludables que han sido emitidas y autorizadas por la EFSA (Reglamento (CE) n° 440/2011) como: “La ingesta de DHA (100 mg/día) contribuye al desarrollo visual normal de los niños hasta los 12 meses de edad” (EFSA, 2009b) y “La ingesta materna de DHA contribuye al desarrollo normal de los ojos (EFSA, 2009c) y cerebro (EFSA, 2009d) del lactante alimentado con leche materna”.

4.-Leche humana

4.1. Composición

La LH es un fluido biológico heterogéneo, cuya composición es muy variable en función de diversos factores: genéticos, dieta materna, periodo de lactancia, duración del embarazo, sexo del lactante, además de otros factores potenciales asociados a la situación geográfica, tradiciones culturales y estatus socioeconómico. También varía en la misma mujer entre ambos pechos, a lo largo del tiempo de lactancia, del día e incluso en una misma toma (Pita *et al.*, 1985; Smit *et al.*, 2002).

A lo largo del periodo de la lactancia, en función de su diferente composición, se distinguen tres tipos de secreción láctea: calostro, leche de transición y leche madura.

-Calostro: es la secreción amarillenta y espesa que se produce los primeros 5 días después del nacimiento. Se considera el alimento óptimo transitorio en la adaptación a la vida extrauterina, ya que además de contener los nutrientes específicos, presenta propiedades anti-infecciosas (Walker, 2010). En comparación con la leche madura, tiene una baja densidad energética (menos grasa) y contenido elevado de proteínas (ver Tabla 2) (incluyendo Ig-A secretora y lactoferrina), oligosacáridos, diversos minerales, colesterol, AG esenciales y anticuerpos que favorecen la colonización de microbiota intestinal.

-Leche de transición: es la secreción que sigue al calostro, incluye el periodo de 6 a 15 días; presenta menor cantidad de Ig y mayor cantidad de lactosa, grasa y vitaminas hasta alcanzar los valores correspondientes a la leche madura.

-Leche madura: es la producida desde el día 15 hasta el final de la lactancia. Tiene un aporte energético variable y superior al de los otros periodos, repartido entre hidratos de carbono (35-50%), grasa (50-55%) y proteínas (5,5%) (Narbona *et al.*, 2005) (ver Tabla 2).

Tabla 2. Composición de la leche humana: calostro y leche madura (por 100 mL).

Componente	Calostro	Leche madura	Componente	Calostro	Leche madura
Energía (Kcal)	45,1-64,9	50,4-78,2	Oleico (18:1)	36,6	35,5
Hidratos de carbono (g):	2,6-7,6	5,0-8,3	Linoleico (18:2 n-6)	6,8	7,2
Lactosa (g)	5,3	7,3	Linolénico (18:3 n-3)	-	1
Nitrógeno total (mg)	360	171	Poliinsaturados (C20 y C22)	10,2	2,9
Nitrógeno proteico (mg)	313	129	Colesterol (mg)	27	16
Nitrógeno no proteico (mg)	47	42	Vitaminas liposolubles (ng)		
Proteína total (g)	1,4-6,5	0,8-2,1	Vit A (equiv. retinol)	89	47
Caseína (mg)	140	187	β-caroteno	112	23
α-lactoalbúmina (mg)	218	161	Vit D	-	0,004
Lactoferrina (mg)	330	167	Vit E (total tocoferol)	1280	315
Ig-A (mg)	364	142	Vit K	0,23	0,21
Seroproteína:caseína	90:10	60:40	Vitaminas hidrosolubles (ng)		
Aminoácidos (mg):			Tiamina	15	16
Alanina	-	52	Riboflavina	25	35
Arginina	126	49	Niacina	75	200
Aspartate	-	110	Ácido fólico	-	5,2
Cistina	-	25	Vit B-6	12	28
Glutamato	-	196	Biotina	0,1	0,6
Glicina	-	27	Ácido pantoténico	183	22,5
Histidina	57	31	Vit B-12	200	26
Isoleucina	121	67	Ácido ascórbico	4,4	4
Leucina	221	110	Minerales (mg)		
Lisina	163	79	Calcio	23	28
Metionina	33	19	Magnesio	3,4	3
Fenilalanina	105	44	Sodio	48	15
Prolina	-	89	Potasio	74	58
Serina	-	54	Cloro	91	40
Treonina	148	58	Fósforo	14	15
Triptofano	52	25	Azufre	22	14
Tirosina	-	38	Elementos trazas (ng)		
Valina	169	90	Cromo	-	39
Taurina	-	8	Cobalto	-	1
Urea	10	30	Cobre	46	35
Creatinina	-	3,3	Flúor	-	7
Lípidos (g):	1,0-3,0	2,8-4,9	Yodo	12	7
Ácidos grasos (%):			Hierro	45	40
Láurico (12:0)	1,8	5,8	Manganeso	-	0,4-1,5
Mirístico (14:0)	3,8	8,6	Níquel	-	2
Palmitico (16:0)	26,2	21	Zinc	540	166
Esteárico (18:0)	8,8	8			

Equiv. retinol: equivalente de retinol

Fuente: Shellhorn & Valdés, 1995; Hester et al., 2012

Aunque el hidrato de carbono mayoritario es la lactosa (90%), presenta un contenido destacable de oligosacáridos (10%) constituidos por glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa, y Neu5Ac, en cantidades muy variables (Bourlieu et al., 2015a).

La concentración de lípidos depende de las características de la glándula mamaria y de la estimulación de la lipasa lipoproteica por acción de la prolactina.

Principalmente, la concentración aumenta con el período de la lactancia, siendo mayor al final de la mamada, tiene un ritmo diurno, es diferente entre las distintas glándulas y varía de una mujer a otra, no existiendo relación entre el volumen de leche y el contenido de lípidos durante el transcurso de calostro a madura. Sin embargo, en leche madura se observa una correlación negativa entre el volumen de leche y los lípidos (Bourlieu *et al.*, 2015a). Por su parte los TAG (98-99%) son los compuestos mayoritarios y su composición depende de la dieta, tanto previa como la que se sigue durante la lactancia (Jensen, 1996; Lopez *et al.*, 2015). En la LH se han identificado más de 150 AG procedentes de dos fuentes: síntesis de *novo* en la glándula mamaria (AG de cadenas cortas y medias) y lípidos del plasma procedentes de la dieta (AG de cadena larga) (Lopez, 2011). Los TAG contienen AG de cadena larga, entre los que predomina: oleico, palmítico, linoleico (omega-6) y α -linolénico (omega-3). Las combinaciones más predominantes de AG para formar TAG (unión de tres AG a una molécula de glicerol)-, como *sn*-1/3-*sn*-2-*sn*-1/3, son 12:0-16:0-16:0, 16:0-16:0-18:1, y 18:2n6-16:0-12:0, y representan el 30% de los TAG de la LH (García & Innis, 2013). La presencia tan elevada de estos AG es debida a que el lactante absorbe en mayor proporción los AG de cadena larga que los de cadena corta, evitando la pérdida fecal de calcio y el aumento de colesterol inducido por los AG saturados (García-Onieva, 2007). El resto de componentes de esta fracción son fosfolípidos, MAG y DAG, colesterol y componentes minoritarios, como vitaminas liposolubles, β -caroteno y esfingolípidos entre los que se encuentran los GG.

Las proteínas de la LH son una fuente importante de aminoácidos necesarios para el rápido crecimiento del lactante, y su contenido en LH madura tiene una relación inversa con el volumen de leche (Bourlieu *et al.*, 2015a). Las proteínas del suero se encuentran en una mayor proporción de seroproteínas:caseína (90:10) al inicio de la lactancia y desciende rápidamente durante el transcurso de la misma, a 60:40 para la leche madura y 50:50 al final de la lactancia. Esta evolución guarda relación con la mayor digestibilidad de las seroproteínas y la maduración del sistema digestivo del lactante durante los primeros 6 meses de vida (Narbona *et al.*, 2005; Pavón *et al.*, 2007). La proteína sérica mayoritaria es la α -lactoalbúmina de alto valor

nutritivo, adecuado a los requerimientos del neonato. En segundo lugar, está la lactoferrina, con acción bacteriostática, especialmente contra la *Escherichia coli*. Otras proteínas que tienen una función protectora son la Ig-A secretora y la lisozima (Macías *et al.*, 2006).

El contenido de vitaminas y minerales en la LH depende exclusivamente de la dieta de la madre y factores medioambientales, lo que provoca una gran variabilidad de los mismos. Si la dieta materna es adecuada, se cubren los requerimientos del recién nacido, aunque es necesario suplementar con sales de hierro a los lactantes nacidos en países poco desarrollados y con vitamina D y Fe a los prematuros. El contenido mineral de la LH no es muy alto comparado con otras especies, pero este hecho se compensa por su alta biodisponibilidad (BD), favorecida por la presencia de lactosa y la relación Ca/P (Cilleruel & Calvo, 2004).

Además de los nutrientes, la LH contiene compuestos bioactivos (algunos mencionados anteriormente) que son responsables de muchos de los beneficios que conlleva la lactancia materna a corto plazo: protección frente a diversas infecciones (Dewey *et al.*, 1995), incluyendo otitis (Timby *et al.*, 2015), diarrea (Beaudry *et al.*, 1995; Bhandari *et al.*, 2003; Kramer *et al.*, 2003; Zavaleta *et al.*, 2011) e infecciones del tracto respiratorio (Blaymore *et al.*, 2002; Bachrach *et al.*, 2003; Chulada *et al.*, 2003), así como la mejora del desarrollo neuronal incrementando la función cognitiva y habilidad mental (Anderson *et al.*, 1999; Der *et al.*, 2006; Gurnida *et al.*, 2012). En estudios a largo plazo se observa que los niños alimentados con LH podrían tener una menor presión sanguínea (Owen *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005), hipercolesterolemia (Owen *et al.*, 2002), obesidad o sobrepeso (Armstrong & Reilly, 2002; Singhal *et al.*, 2002; Krebs *et al.*, 2003), así como la reducción de problemas relacionados con el sistema inmune, como alergias (Muraro *et al.*, 2004) y celiaquía (Akobeng *et al.*, 2006). La lactancia materna también aporta beneficios a la madre, ya que disminuye el riesgo de cáncer de pecho y ovario y favorece el retorno rápido al peso previo al embarazo (Labbok, 2001), sin olvidar la relación psico-afectiva.

4.2. Contenido en compuestos bioactivos

A continuación, se hace una descripción de la composición de la LH en relación a los compuestos bioactivos objeto de estudio. Generalmente, los contenidos de colesterol, LP, Sia y GG disminuyen con la lactancia, siendo mayores estos contenidos en la leche de lactantes pre-termino. Esta disminución se puede asociar al aumento del diámetro de los glóbulos de grasa y la delgadez de sus membranas con el transcurso de la lactancia.

◆ Esteroles

El colesterol representa el 90% de los esteroides presentes en LH y no guarda relación con la dieta materna o sus concentraciones plasmáticas (Bourlieu *et al.*, 2015a). En este sentido se ha comprobado que la ingesta de dietas maternas con contenidos de colesterol de 520 mg/día durante 4 semanas después de una dieta *ad libitum* (durante 4 semanas) no afecta al contenido de colesterol en LH (Mellies *et al.*, 1978).

Los contenidos de colesterol en LH disminuyen durante la lactancia (Tabla 3) oscilando de 3 a 36 mg/100 mL en calostro, de 4 a 27 mg/100 mL en transición y de 4 a 29 mg/100 mL en LH madura. Sin embargo, hay autores (Clark *et al.*, 1982, 1983), que observan valores constantes de colesterol (9,7-11 mg/100 mL) a lo largo de la lactancia. Se han observado concentraciones de colesterol en leche para prematuros mayores que para lactantes a término (Bitman *et al.*, 1983).

El contenido de colesterol en un mismo día, puede aumentar oscilando de 8,75-14 mg/100 mL a las 6 de la mañana hasta 11,2-22 mg/100 mL a las 22h de la noche (Lammi-Keefe *et al.*, 1990; Jensen *et al.*, 1995).

En LH madura se ha observado variabilidad del contenido de colesterol asociada a la zona geográfica. Boersma *et al.* (1991) compara los contenidos de LH madura de la ciudad de Sta. Lucia (19 mg/100 mL) con lo encontrados en otras ciudades del Caribe y observan variabilidad (14-31 mg colesterol/100 mL) debida a la dieta,

correspondiendo los mayores contenidos a las ciudades que ingieren una mayor cantidad de colesterol, grasa y proteínas.

Tabla 3. Contenidos de colesterol en leche humana (mg/100 mL).

Calostro	Transición	Madura	Referencia
		18,1-23,3	Potter & Nestel, 1976
		6,46-8,59	Mellies <i>et al.</i> , 1978
		15,6-28,3	Mellies <i>et al.</i> , 1979
		13,5-28,8 ^a	
		9,7-11	Clark <i>et al.</i> , 1982
		9,7-11	Clark <i>et al.</i> , 1983
26-35	24-27	21-23	Harzer <i>et al.</i> , 1983
16,6 ^b	12 ^b	10,8 ^b	Bitman <i>et al.</i> , 1983
13,8	12,5	9,8	
		15,66-17,94	Kallio <i>et al.</i> , 1989 ^c
		18,87 ^a	
		7,33-24,32 ^c	Van Beusekom <i>et al.</i> , 1990
36	19,7	19	Boersma <i>et al.</i> , 1991
		14,2 ^d	Wong <i>et al.</i> , 1993
		17,4	Jensen <i>et al.</i> , 1995
	16,62	12,04-13,53	Huisman <i>et al.</i> , 1996
		6,5-18,4	Scopesi <i>et al.</i> , 2002
		15,46 ^c	Laitinen <i>et al.</i> , 2009
29,21		9,50-17,44	Ramalho <i>et al.</i> , 2011
3,36-11,95	4,43-12,98	6,05-8,11	Kamelska <i>et al.</i> , 2012
		4,63-21,77	Kamelska <i>et al.</i> , 2013
		4,30-21,81 ^a	
		5,9-10,25 ^e	Oleynik <i>et al.</i> , 2013
		11,3	Álvarez-Sala <i>et al.</i> , 2015

^aContenidos en LH madura, a partir de los 6 meses.

^bContenidos en LH pre-termino

^cValor expresado en mg/100 mL, después de ser calculado a partir del peso molecular de cada esteroil

^dValor expresado en mg/100g

^eLH madura pasteurizada (procedente de un banco de leche)

Los precursores del colesterol presentes en la LH son escualeno, lanosterol, desmosterol, dimetilesterol, metostenol y latosterol (Clark *et al.*, 1983; Kallio *et al.*, 1989; Laitinen *et al.*, 2009; Benoit *et al.*, 2010; Ramalho *et al.*, 2011). En la Tabla 4 se recopilan los contenidos indicados en la bibliografía.

Tabla 4. Precursores de colesterol en leche humana (mg/100 mL).

Desmosterol	Latosterol	Lanosterol	Escualeno	Referencia
0,6-1,3				Clark <i>et al.</i> , 1983
1,35-1,51	0,042-0,089	0,094-0,098	0,39-0,49	Kallio <i>et al.</i> , 1989 ^a
1,14 ^b	0,11 ^b	0,11 ^b	0,45 ^b	
2,12	0,044		0,48	Laitinen <i>et al.</i> , 2009 ^a
0,77-3,33	0,07	0,02		Benoit <i>et al.</i> , 2010
3,08 ^c				Ramalho <i>et al.</i> , 2011 ^d
0,49-2,12				

^aValor expresado en mg/100 mL, después de ser calculado a partir del peso molecular de cada esteroil

^bContenidos en LH madura, a partir de los 6 meses.

^cContenidos en calostro

^dCalculado a partir del valor medio de colesterol (15 mg/100 mL)

El precursor mayoritario es el desmosterol y su contenido es directamente proporcional al contenido de colesterol (Ramalho *et al.*, 2011). Respecto al contenido de colesterol en LH sus precursores representan: desmosterol (10%) > escualeno (2-6%) > lanosterol (<1%) (Clark *et al.*, 1983; Kallio *et al.*, 1989).

Los precursores pueden ser pasivamente liberados a la LH en función de sus concentraciones intracelulares, reflejando posiblemente los cambios producidos en la síntesis de colesterol. Estos hallazgos sugieren que la glándula mamaria aparentemente sintetiza colesterol a través de la vía de la cadena lateral insaturada, con la consiguiente acumulación de Δ 24-esteroles en la leche, especialmente desmosterol (ver Figura 1) (Kallio *et al.*, 1989). La cantidad de desmosterol en LH refleja la producción intensa de colesterol en la glándula mamaria y quizás su conversión sea un paso limitante (Kallio *et al.*, 1989; Ramalho *et al.*, 2011).

Existe poca información sobre contenidos de EV en LH. El contenido total de EV (mg/100 mL) en LH oscila entre 0,61 - 11,2 (Mellies *et al.*, 1978; 1979). El EV más representativo es el β -sitosterol ($1,5 \cdot 10^{-3}$ - 0,02 mg/100 mL), seguido del campesterol (0,051 mg/100 mL) y los minoritarios como estigmasterol ($3,1 \cdot 10^{-3}$ mg/100 mL) y avenasterol (0,05 mg/100 mL) (Laitinen *et al.*, 2009; Benoit *et al.*, 2010). En este caso, la dieta de la madre sí que influye en su contenido. Un aporte alto de EV en la dieta (1200 mg fitosteroles/día) durante 4 semanas, respecto a una

dieta normal (*ad libitum* durante 4 semanas) incrementa hasta doce veces el contenido de EV en LH (2,2 vs. 0,17 mg/g grasa) (Mellies *et al.*, 1978).

♦ **Fosfolípidos y esfingomielina**

Los LP representan el 0,4-1,4% del contenido total de la grasa (García *et al.*, 2012). Al igual que en el caso del colesterol, los contenidos de LP totales generalmente disminuyen conforme avanza la lactancia (Tabla 5). Los intervalos de contenidos de LP en los diferentes periodos de lactancia oscilan de 12 a 160 mg/100 mL, de 13 a 90 mg/100 mL y de 6 a 78 mg/100 mL, para calostro, LH de transición y LH madura, respectivamente (Tabla 5), hecho relacionado con el diámetro del glóbulo graso (calostro > LH madura) (Lopez *et al.*, 2011). Algunos autores, describen este descenso (relación porcentaje de LP vs. tiempo) mediante un modelo matemático predictivo de regresión potencial ($\%LP = 1,42 \cdot x^{-0,28}$, donde x son días) para niños pre-término y mediante una regresión lineal ($\%LP = 0,55 - 0,0033x$, donde x son días) para niños a término (Bitman *et al.*, 1984).

Normalmente, los contenidos de LP totales en la LH de niños pre-término son mayores que los de niños a término (Bitman *et al.*, 1984; Holmes-Mcnary *et al.*, 1996). En LH de madres japonesas no se encuentran estas diferencias, si bien los contenidos de SM en niños pre-termino aumentan de calostro a LH madura y los de PC disminuyen (Shoji *et al.*, 2006).

Los LP mayoritarios en LH son SM y PC seguidos de PE y los minoritarios PS y PI. En cambio, Wang *et al.* (2000) obtienen mayores contenidos para la PE (36%) que la SM (31%), aportando a los lactantes un mayor contenido de ARA, DHA y ácido eicosapentaenoico (EPA) que ayudan al rápido desarrollo; solo Russo *et al.* (2013) indican que la PS es el LP mayoritario.

Harzer *et al.* (1983) son los primeros en estudiar la distribución de los distintos LP a lo largo de la lactancia. Describen un aumento significativo en los porcentajes relativos de SM y PE, junto con una disminución de la PC en LH madura vs. calostro, permaneciendo constante la concentración del resto de LP.

Tabla 5. Contenido de lípidos polares en leche humana (mg/100 mL, entre paréntesis porcentajes relativos).

PE	PI	PS	PC	SM	Total	Referencia
Calostro						
(22,3-26,8)	(4,8-6,5)	(8,4-12,9)	(29,2-35,2)	(28,3-29,3)	39-40	Harzer et al., 1983
			5,4	6,8		Holmes et al., 2000 ^a
			11,21	9,69		Icol et al., 2005 ^a
(5,86)	(6,03)	(7,91)	(38,40)	(40,49)	14,28	Sala-Vila et al., 2005 ^a
(15)*	(8)*	(6)*	(28,6)*	(36)*	23*	Shoji et al., 2006
(14)	(6,5)	(4,5)	(28)	(36)	25	
					27-160	Garcia et al., 2011
1,17	1,02	1,60	3,6	5,21	12,64	Zou et al., 2012 ^b
(9,33)	(8,31)	(12,67)	(28,46)	(41,23)		
Transición						
(27,9-28)	(5,1-5,2)	(8,3-9,4)	(27,4-29)	(29,9-30,9)	39-42	Harzer et al., 1983
(8,55)	(5,21)	(8,17)	(37,69)	(39,20)	14,78	Sala-Vila et al., 2005 ^a
(14)*	(7,5)*	(5,5)*	(25)*	(39)*	28*	Shoji et al., 2006
(16)	(7)	(5)	(26)	(36)	22	
2,43	1,26	2,55	4,72	7,47	18,46	Zou et al., 2012 ^b
(13,16)	(6,81)	(13,88)	(25,73)	(40,42)		
Madura						
(26,5-28,5)	(5,0-5,4)	(8,5-9,6)	(24,9-26,7)	(31,1-32,9)	38-40	Harzer et al., 1983
(19,8-19,5)*	(6,3-6,5)*	(8,6-8,8)* (8,4)	(26,4-29,4)*	(36,2-38,5)*		Bitman et al., 1984
(19,9)	(5,3)		(27,5)	(38,9)	15-20	
			11,06	13,46		Zeisel et al., 1986 ^a
(23,8)	(5,3)	(3,7)	(33,2)	(29)		Hundrieser & Clark., 1988
5-10	0,5-2	-	2-7	8-14		Kynast & Schmiyz, 1988
					6,12-58,82	Van Beusekom et al., 1990 ^a
			6,91*	7,81*		Holmes-Mcnary et al., 1996 ^a
			6,29	9,31		
			7,7	7,5		Holmes et al., 2000 ^a
(36,1)	(3,5)	(6,7)	(23,1)	(30,6)		Wang et al., 2000
0,19	0,05	0,07	0,23	0,21		Sala-Vila et al., 2003
			7,45-11,90	6,31-7,28		Icol et al., 2005 ^a

Tabla 5. (Continuación)

PE	PI	PS	PC	SM	Total	Referencia
			Madura			
(12,76)	(5,89)	(10,35)	(31,26)	(41,03)	10,39	Sala-Vila et al., 2005 ^a
(13)*	(6)*	(6)*	(22,5)*	(42,3)*	27,5*	Shoji et al., 2006
(14)	(8)	(6)	(27,2)	(36)	19	
			8,22	5,03		Fisher et al., 2010 ^a
(21,3)	(16,4)		(19)	(43,3)		Benoit et al., 2010
				3,1-9,1		Blaas et al., 2011 ^b
					14-78	Garcia et al., 2011
1,18-2,32	1,25-1,48	1,41-2,47	2,40-3,65	5,09-5,66	11,59-15,50	Lopez & Ménard, 2011 ^{b,c}
(10,1-15,1)	(9,2-11,7)	(12,3-18,4)	(19,3-23,5)	(36,4-45,5)		
2,61-10,28	0,22-2,07	1,13-4,47	3,21-12,42	4,99-13,29	15,29-47,36	Garcia et al., 2012
(12,4-25,6)	(1,1-5,2)	(5,4-15,2)	(19,8-30,2)	(25,7-33,8)		
2,73	1,48	3,02	3,85	7,09	18,22	Zou et al., 2012 ^b
(15,04)	(8,17)	(16,71)	(21,33)	(38,75)		
6,8	1,1	1,4	6	8,5	23,8	Giuffrida et al., 2013 ^b
(28,6)	(4,6)	(5,9)	(25,2)	(35,7)		
3,8	-	8,45	1,87	4,11	18,24	Russo et al., 2013
6,36-8,08	1,07-1,67	0,75-0,91	4,84-5,97	7,71-8,66	20,78-24,24	Thakkar et al., 2013

PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; PC: fosfatidilcolina; SM: esfingomielina. *LH de niños pre-término.

^aCalculado en mg/100 mL a partir del peso molecular (Pm). PC: 768 g/mol, SM: 751 g/mol, Pm medio de PL: 707 g/mol.

^bExpresado en mg/100 g.

^cConsiderando que la leche humana tiene un valor medio de grasa de 3,8 g grasa/100g.

Sin embargo, Holmes *et al.* (2000) no observan ninguna diferencia en el contenido de PC y SM entre calostro y LH madura. Sala-Vila *et al.* (2005) y Zou *et al.* (2012) indican un incremento en PE y PS, una disminución en PC, sin modificaciones en SM. Por otro lado, Shoji *et al.* (2006) no observan alteración alguna para los LP durante el transcurso de la lactancia. Sin embargo, en LP totales, estos autores observan discrepancias. Sala-Vila *et al.* (2005) y Shoji *et al.* (2006) observan una disminución significativa en los LP totales de calostro a LH madura, mientras que Zou *et al.* (2012) muestra un incremento en el contenido de los LP totales durante el transcurso de la lactancia (alcanzando un máximo en el periodo de transición).

Recientemente, una revisión explica cómo esta variabilidad de contenidos puede deberse a parámetros como método de extracción de la LH (mecánica o manual), momento de la extracción (en el inicio, medio o final de la toma), origen geográfico, número de muestras utilizadas, método de determinación (CG-FID, HPLC-UV, HPLC-ELSD, TLC-densitometría y método colorimétrico), entre otros (Cilla *et al.*, 2016). Además de estas variables, en los contenidos de LP de la LH también puede influir el sexo de los lactantes (Thakkar *et al.*, 2013).

La LH, además de la colina aportada por PC y SM, contiene colina libre, glicerofosocolina y fosfocolina (Holmes-McNary *et al.*, 1996; Icol *et al.*, 2005), siendo el contenido de colina más bajo durante la primera semana del nacimiento (Holmes *et al.*, 2000). Generalmente, los contenidos totales de colina en LH madura oscilan de 38,9 a 42,4 mg/100 mL (1349-1595 $\mu\text{mol/L}$), representando la colina aportada por PC y SM el 17% de la colina total (Holmes-McNary *et al.*, 1996; Icol *et al.*, 2005).

♦ **Ácido siálico**

El Sia en la LH se encuentra fundamentalmente formando parte de la fracción de oligosacáridos (70-80% del total) y de glicoproteínas (15-28%); mientras que las

fracciones menores corresponden al Sia unido a lípidos (GG) y libre (3-5%) (Wang *et al.*, 2001; Martín-Sosa *et al.*, 2004a).

La LH es una matriz alimentaria con altos contenido de Sia. En la Tabla 6 se muestra una recopilación de los contenidos de Sia total en LH. Martín-Sosa *et al.* (2004a) presenta contenidos en calostro tres veces mayores a los de la LH madura. Sin embargo, Carlson (1985) y Wang *et al.* (2001) observan valores superiores a los de Martín-Sosa *et al.* (2004a) (alrededor de 20% más en calostro y aproximadamente entre 16 y 17% más en transición y LH madura). Las diferencias observadas entre distintos autores se atribuyen a condiciones genéticas, geográficas y dietéticas, así como a los métodos de determinación (Wang, 2009).

Tabla 6. Contenidos de ácido siálico en leche humana (mg/100 mL).

Calostro	Transición	Madura (meses)						Referencia
		1	1,5	2	3	4	7	
140,5		89,8	48,1	37,4	20,8	20,8	20,8	Carlson, 1985
	93,3					28		Neeser <i>et al.</i> , 1991
	9-50							Sabharwal <i>et al.</i> , 1991
	130*	98,3*						Heine <i>et al.</i> , 1993*
	136 ^a	87,8 ^a						Brand-Miller <i>et al.</i> , 1994
	87,9				25,6			
178,1 ^a	132,1 ^a	79,1 ^a			40,2 ^a			Wang <i>et al.</i> , 2001
155,9	107	61,2			32,1			
				64,2*				Lee <i>et al.</i> , 2004*
127,7	91	52,5						Martin-Sosa <i>et al.</i> , 2004a
						29,9*		Lacomba <i>et al.</i> , 2011a*
		71,4*						Qiao <i>et al.</i> , 2013*
		60,3*						Li & Fan, 2014*
				23				Salcedo <i>et al.</i> , 2015

^aLeche humana de niños pre-término. *Contenidos determinados por HPLC.

El mayor contenido de Sia total en LH corresponde al calostro (127-156 mg/100 mL) y va disminuyendo conforme avanza el periodo de lactancia. Se ha indicado una disminución exponencial para el Sia unido a oligosacáridos ($\text{mg Sia/L} = 1475^{(-0,29x)} + 116$, donde $x = \text{semanas}$) (Carlson, 1985). Estas variaciones podrían atribuirse a que conforme aumenta la edad del lactante, aumenta la capacidad para sintetizar el Sia *de novo* (Wang, 2009).

Aunque Wang *et al.* (2001) indican mayores contenidos en LH de madres de niños pre-término (ver Tabla 6), respecto a la de madres de niños a término, igualándose éstos a partir del tercer mes de lactancia, no son datos concluyentes por la gran variabilidad individual y al escaso número de muestras analizadas.

Actualmente, los métodos más utilizados para su determinación son los cromatográficos incluyendo la etapa de derivatización, ya que son mucho más específicos y sensibles que los espectrofotométricos (solo obtienen cantidad total de Sia), además de permitir determinar varias formas de Sia con una misma preparación de la muestra. Martín-Sosa *et al.* (2004a) mediante cromatografía en capa fina no detecta Neu5Gc en la LH. Sin embargo, en el caso de la determinación de Sia por HPLC solo dos estudios detectan Neu5Gc: 0,3 mg/100 mL (Lee *et al.*, 2004) y 0,2 mg/100 mL (Lacomba *et al.*, 2011a). Según la revisión de Wang (2009), el Neu5Gc no puede ser sintetizado por los humanos, por lo que su presencia en la LH puede ser explicada por la ingesta de alimentos ricos en Neu5Gc, como carne roja, queso y leche. Sin embargo, en otros fluidos como la saliva, este compuesto se detecta después de 48 horas de haberlo ingerido (Tangvoranuntakul *et al.*, 2003), lo que justificaría su presencia en LH (Lacomba *et al.*, 2011a).

No obstante, en humanos, el Neu5Gc es un antígeno oncofetal que no ha sido detectado en tejidos adultos. La exposición a glicoconjugados con Neu5Gc produce una respuesta inmunológica en adultos (Tangvoranuntakul *et al.*, 2003). Por tanto, puede ser asumido que el Neu5Gc ingerido con LH o PL es degradado por los enzimas intestinales antes de ser incorporado al torrente sanguíneo. Sin embargo, la ausencia de esta respuesta inmunogénica en los primeros días de vida del lactante debe tenerse en cuenta y ser estudiada (Sánchez-Díaz *et al.*, 1997).

♦ **Gangliósidos**

Para la identificación y cuantificación de los GG son necesarias técnicas de separación, siendo la más habitual hasta hace poco tiempo, la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) seguida de detección densitométrica ($\lambda=580\text{nm}$) tras

revelado con el reactivo resorcinol, utilizando como fase estacionaria sílica 60. Normalmente, mediante esta técnica el contenido total de GG se determina de manera indirecta al cuantificar el Sia presente en el extracto, expresándose el resultado como ácido siálico unido a lípidos (ASUL). Actualmente, existen técnicas que combinan la separación de los GG individuales con la identificación y la cuantificación, en un solo paso, utilizando entre ellas cromatografía líquida-espectrometría de masas con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS). Estas nuevas técnicas mejoran la sensibilidad y selectividad de los métodos tradicionales y expresan los resultados directamente en cantidad de GG. Como puede observarse en la Tabla 7, los contenidos de GG en LH varían a lo largo de la lactancia (en mg ASUL/100 mL), disminuyendo normalmente con el paso del tiempo. Y la variabilidad entre estudios es debida, al igual que en Sia, a las diferencia geográfica, genéticas y dietéticas mencionadas anteriormente (Wang, 2009).

En general, el calostro es el periodo que mayores contenidos presenta (ver Tabla 7). En el caso de Ma *et al.* (2015a), su contenido es el doble que el calculado por otros estudios, lo que puede ser debido a la etnia de las donantes, al diseño del protocolo, técnica empleada (HPLC-MS) y al tamaño de muestra utilizado, que en este caso es mayor que el de otros estudios (n=132). El contenido de GG totales en LH madura aumenta con el periodo de lactancia para luego descender a partir de los 2 meses (Pan & Izumi, 1999; Iwamori *et al.*, 2008) o 6 meses (Ma *et al.*, 2015a), si bien otros autores no indican diferencias significativas durante el periodo de lactancia (13,1-22,9 mg/L) (Ma *et al.*, 2015b).

Los perfiles de GG, en LH, también varían con el periodo de lactancia. Mientras que en el calostro hay un mayor porcentaje de GD₃ que de GM₃ (49-70% vs. 3-29%), en leche madura se invierte esta relación (GD₃ 9-32% vs. GM₃ 85-28%). El contenido de GD₃ es mayor en el calostro de pre-términos que los nacidos a término (Rueda *et al.*, 1998a). Algunos autores indican que estos cambios en la distribución podrían justificarse por el papel que desempeña el GD₃ en la diferenciación y

proliferación celular en las glándulas mamarias. Este hecho, a su vez podría relacionarse con los mayores requerimientos de GD₃ en las primeras etapas de la vida, para el correcto desarrollo neuronal e intestinal (Takamizawa *et al.*, 1986).

Tabla 7. Contenidos de gangliósidos en leche humana (mg ASUL/L).

Calostro	Transición	Madura	Origen	nº muestras	Referencia
		11	Noruega	10	Laegreid <i>et al.</i> , 1986
4,45-7,23 (10-15,1*)	3,37-6,86 (8,3-13,9*)	3,31-4,82 (9,3-14,4*)	Japón	17	Takamizawa <i>et al.</i> , 1986
		10,4	Suiza	1	Neeser <i>et al.</i> , 1991
1,66-3,30 (2,8-4,1*)	1,59-7,88 (0,9-10,7*)	0,85-12,31 (1,6-23,8*)	España	8	Rueda <i>et al.</i> , 1995
9,1-10,37 (12-14,3*)	8,29-9,92 (12,5-25,1*)	6,54-9,54 (11,1-21,8*)	Japón	19	Pan & Izumi, 1999
10,1*	10-10,4*	10-16*	Japón	Mezcla: 2434	Nakano <i>et al.</i> , 2001*
2,42 (6,4*)	1,43 (3,3*)	0,83 (1,7*)	España	12	Martín-Sosa <i>et al.</i> , 2004a
2,3	1,38	0,8	España	12	Martín-Sosa <i>et al.</i> , 2004b
4,45-7,23	3,37	3,12-4,82	Japón		Iwamori <i>et al.</i> , 2008
		2,29	España	1	Lacomba <i>et al.</i> , 2011a
		2,31	España	1	Lacomba <i>et al.</i> , 2011b
43,6-61,4**	32,8-60,3**	27,8-54,6**	Japón	5	Uchiyama <i>et al.</i> , 2011**
		4,6-5,6*	Singapur	50	Thakkar <i>et al.</i> , 2013*
8,1*		9,1-10,7*	China	-	Giuffrida <i>et al.</i> , 2014*
26,8*	18,9*	14,8-25,3*	Malasia	132	Ma <i>et al.</i> , 2015a*
		13,1-22,9*	China	14-20	Ma <i>et al.</i> , 2015b*
		0,55	España	65	Salcedo <i>et al.</i> , 2015

*Valor expresado como gangliósidos totales (mg GG/L). **Leche humana de niños pre-término. Entre paréntesis, valor medio expresado en mg GG/L calculado por Rueda (2007).

5.- Preparados para lactantes e ingredientes utilizados en su elaboración

Numerosas organizaciones internacionales (OMS, AAP y ESPGHAN) emiten recomendaciones sobre cuáles han de ser las características cuantitativas y cualitativas de estos productos destinados a la alimentación del lactante. En la Unión Europea (UE), la composición y formulación de estos productos se regula mediante la Directiva 2013/46/UE, que modifica la anterior Directiva 2006/141/CE con respecto a los requisitos sobre proteínas de los preparados para lactantes y preparados de continuación. En España, esta Directiva esta transpuesta en la Reglamentación Técnico Sanitaria (RTS) específica de los PL y de los preparados para continuación (RD 165/2014, por el que se modifica el RD 867/2008) y el Reglamento Delegado (UE) 2016/127. En el Anexo-I de este trabajo se detalla la composición de estos preparados.

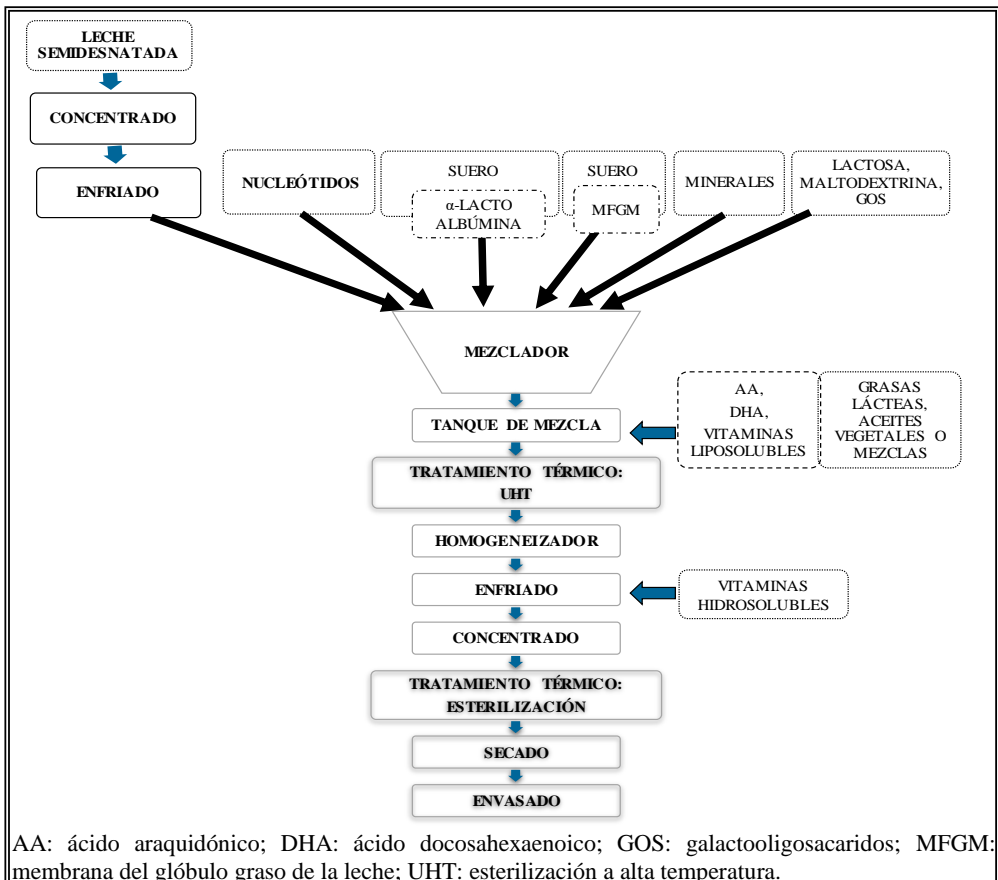
5.1.-Elaboración

Actualmente, la mayoría de los PL comercializados son productos sólidos que se obtienen a partir de leche de vaca desnatada, a la que se le adiciona diferentes ingredientes, o mediante disolución y/o emulsión y mezcla de todos sus ingredientes en agua. Además, se permite también la leche de cabra como fuente proteica de los preparados solas o combinadas con las proteínas de leche de vaca (Directiva 2013/46/CE). En la Figura 14 se esquematiza el proceso general de elaboración de estos preparados.

El proceso comienza con una etapa de reconstitución y mezclado de los constituyentes proteicos como seroproteínas de la leche enriquecidas, hidratos de carbono como lactosa, maltodextrinas y galactooligosacaridos (GOS), minerales y nucleótidos. La disolución obtenida se calienta ligeramente para conseguir fluidificarla y ayudar a la disolución e hidratación de los ingredientes en polvo. A continuación, se adiciona la grasa (combinación de aceites vegetales o mezcla de aceites vegetales y grasa láctea) y las vitaminas liposolubles y a la mezcla obtenida se aplica una esterilización a altas temperaturas (UHT) para eliminar la actividad microbiana y enzimática. El producto resultante se homogeneiza a alta presión,

aplicando fuerzas de cizalla para lograr que todos los componentes entren en contacto y así se produzca su emulsión. Así, se obtienen glóbulos de grasa más pequeños, cubiertos mayoritariamente por proteínas (micelas de caseína, agregados de suero proteico) y restos de MFGM (Bourlieu *et al.*, 2015a), representando estos últimos el 10% del material original de MFGM (Cano-Ruiz & Richter, 1997), incrementándose el área de interfase lipídica. Estos glóbulos de grasa recién formados pueden presentar diferentes propiedades físicas y químicas, porque la estructura del glóbulo se rompe y ocurren las interacciones entre los diferentes componentes de la leche como las caseínas y proteínas de suero, que a su vez influyen en las propiedades de los productos lácteos (Michalski *et al.*, 2002).

Figura 14. Esquema general de la elaboración de preparados para lactantes.

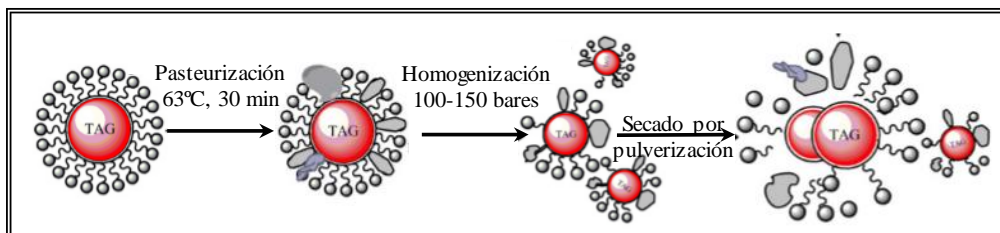


Fuente: Bourlieu *et al.*, 2015a modificada

A continuación, se añaden las vitaminas hidrosolubles y el producto se concentra y esteriliza. Si el producto se comercializa en polvo, se concluye con una etapa de secado por pulverización y se envasa para su posterior distribución. Como resultado, la grasa se encuentra en forma de pequeñas gotas (0,4-0,5 μm) en emulsión, estabilizadas principalmente por proteínas de la leche (caseínas y β -lactoglobulina como principal proteína del suero). Además, para estabilizar la emulsión, se adicionan tensioactivos como lecitinas o esteres, MAG y DAG (Lopez *et al.*, 2015).

Existen otros métodos de procesado que también afectan a la estructura de la MFGM y al glóbulo (Figura 15). La pasteurización desnaturaliza algunas proteínas de la membrana y se reduce el tamaño del glóbulo. Si se compara con otros tratamientos térmicos como UHT o mecánicos como microfiltración, se obtiene que el tratamiento que más reduce el tamaño del glóbulo, y por consiguiente mayor área superficial presenta es UHT > pasteurización > microfiltración (Lopez *et al.*, 2015). Por secado por pulverización (Yao *et al.*, 2016a) o liofilización (Yao *et al.*, 2016b) se consigue que los glóbulos pequeños se fusionen y lleguen a formar glóbulos de mayor tamaño. En el caso de la liofilización la formación de cristales de hielo repele materias diferentes de los intersticiales, provocando la agregación de los glóbulos, y en el caso del secado por pulverización el mecanismo modifica la estructura, influyendo en la reconstitución y absorción de proteínas de la leche y provocando un aumento en el tamaño del glóbulo graso (Yao *et al.*, 2016b).

Figura 15. Modificación de los glóbulos de grasa de la leche durante su procesado.



Fuente: Yao *et al.*, 2016a

En la Tabla 8 se compara la composición de la leche de vaca y de cabra con la de LH, con el fin de destacar sus diferencias y detallar las modificaciones que se llevan a cabo para la elaboración de PL. El aporte calórico de la leche de vaca y LH es similar (70 kcal/100 mL), pero se observan diferencias notables en su composición (Maldonado *et al.*, 2010). En relación a la leche de cabra ésta presenta mayor aporte calórico y también presenta diferencias en su composición.

Tabla 8. Diferencias en macronutrientes entre leche de vaca, leche de cabra y leche humana (g/100mL).

	Vaca	Cabra	Humana
Energía (kcal/100 mL)	69	76	70
Agua	88	87,1	88
Lactosa	4,8	4,1	7,3
Proteínas totales:	3,3	3,3	1,3
Nitrógeno no proteico	0,32	0,27	0,42
Caseína	2,73	2,4	0,25
Proteínas del suero	0,47	0,56	0,62
α -lactoglobulina	0,11	n.d	0,26
β -lactoglobulina	0,36	n.d	-
Lactoferrina	Trazas	n.d	0,17
Lisozima	Trazas	n.d	0,05
Ig-A	0,003	n.d	0,14
Relación suero:caseína	20:80	20:80	70:30
Lípidos totales:	3,8	3,9	4,2
AG saturados (%)	60	60	40
AG monoinsaturados (%)	22,2	31,7	29,7
AG poliinsaturados (%)	4,4	3,9	28,2
Minerales y vitaminas:			
Hierro (mg)	0,1	0,12	0,07
Calcio (mg)	125	110	28
Fósforo (mg)	96	n.d	15
Vitamina A (mg)	39	40	66
Vitamina C (mg)	1	1,5	5,2
Vitamina D (mg)	0,01	0,06	0,05

n.d: no detectable

Fuente: Maldonado *et al.*, 2010; Bedoya Mejía *et al.*, 2012

El contenido en hidratos de carbono es más bajo en la leche de vaca y de cabra que en LH, siendo el componente mayoritario la lactosa. Así pues, los preparados deben enriquecerse en lactosa que, además de su función energética, actúa como estímulo para la maduración de la actividad de la lactasa, supone la única fuente de

galactosa, favorece la absorción del calcio y establece una flora bifidógena. Además, los oligosacáridos, están prácticamente ausentes en la leche de vaca (Bourlieu *et al.*, 2015a).

Para asemejar la relación suero:caseína de la leche de vaca o cabra a la LH se añade concentrado de suero proteico. Además, estas proteínas son más digeribles y permiten un aporte de aminoácidos similar al proporcionado por la LH. Esto último también se consigue adicionando α -lactoalbumina, proteína con un alto valor biológico y que en leche de vaca solo está presente en cantidades trazas (Tabla 8). Destacar que la LH no tiene β -lactoglobulina, proteína predominante en la leche de vaca y una de las responsables de los problemas alérgicos del lactante alimentado con PL (Maldonado *et al.*, 2010).

La combinación de grasas vegetales y TAG de cadena media, usadas frecuentemente en preparados para pre-términos, pretende facilitar la absorción de AG y asegurar un aporte suficiente de AG esenciales. La implicación de los AG poliinsaturados de cadena larga (como el linoleico) en el desarrollo del sistema nervioso en los prematuros, justifica su adición a los preparados destinados a la alimentación de lactantes prematuros (Maldonado *et al.*, 2010).

En PL, la grasa procedente de la leche de vaca es sustituida en parte por distintas proporciones y tipos de aceites vegetales, para asemejar el perfil lipídico al de la LH, proporcionando adecuados niveles de AG esenciales, linoleico y linolénico (Long *et al.*, 2013). Entre los aceites vegetales utilizados destaca el de coco, canola, soja, cártamo rico en oleico, girasol alto en oleico y palma, quedando prohibida la utilización de aceites de sésamo y algodón (RD 165/2014). Como resultado de la distinta composición de AG de los aceites mencionados, muchos PL presentan una estructura de TAG que difiere de la LH (Bourlieu *et al.*, 2015a; Long *et al.*, 2013).

Otros aceites de algas, hongos y pescado se añaden a los PL como fuente de ARA y DHA (Long *et al.*, 2013). Además, algunos de los aceites añadidos se caracterizan por presentar contenidos de desmosterol, como es el caso aceites

procedentes del hongo *Mortierella alpina* (Nes & Nichols, 2006; Wang *et al.*, 2011) o del alga roja *Rhododymenia palmata* (Idler & Wiseman, 1970).

La grasa de los PL difiere de la de la LH en relación a la presencia y concentración de una gran variedad de esteroides, fosfolípidos, SM, ceramidas glicosil neutras, glicolípidos ácidos y GG (Long *et al.*, 2013). Nuevas evidencias sugieren que la adición de grasa láctea (natas) a la mezcla de aceites anteriormente mencionados, podría asemejar más la composición y estructura de los PL a la LH, al igual que las propiedades fisiológicas, ya que proporciona una gran variedad de especies lipídicas, incluyendo fosfolípidos y colesterol, los cuales no están presentes en aceites vegetales (Delplanque & Baudry, 2015).

5.2. Contenido en compuestos bioactivos

5.2.1. Esteroides

◆ Ingredientes

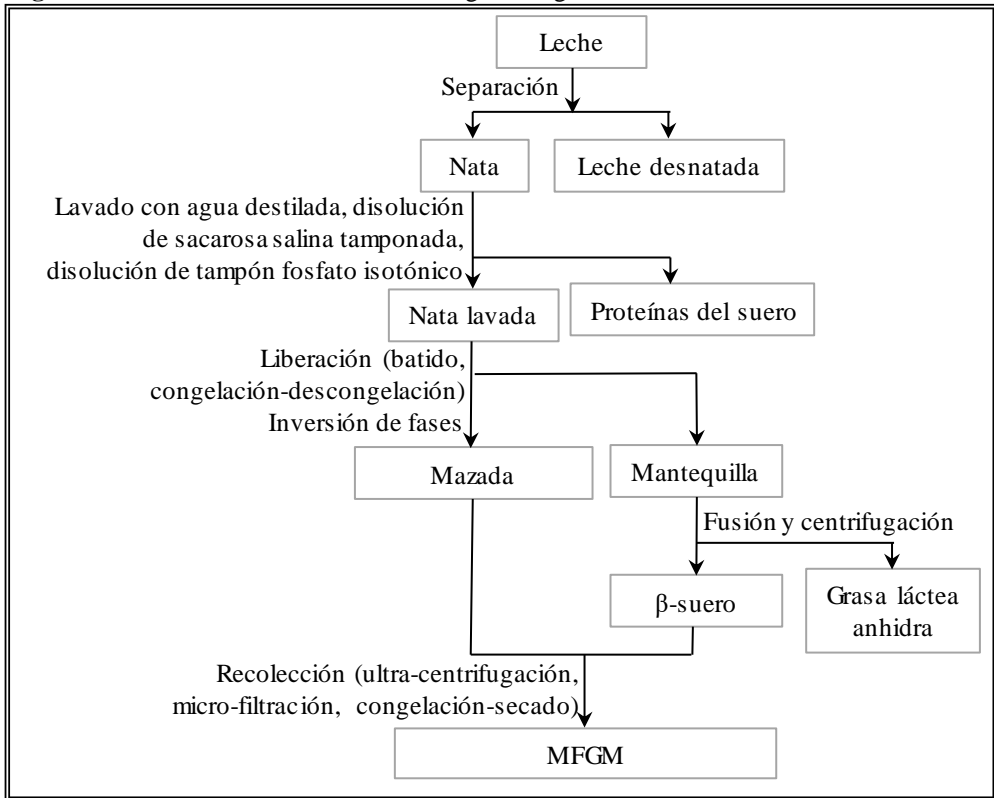
Se dispone de datos de esteroides en natas e ingredientes de MFGM que se describen a continuación.

La nata, ingrediente utilizado en la elaboración de PL, aporta distinta concentración de glóbulos de grasa en función del contenido total de grasa (Lopez *et al.*, 2015) y contenidos muy variables de colesterol. Así, natas con contenido lipídico de 10-38 g/100 g proporcionan contenidos de colesterol de 27,5-76,9 mg/100 g (Piironen *et al.*, 2002) y natas sin caracterización lipídica pueden alcanzar valores de 111,4 mg colesterol/100 mL (Oh *et al.*, 2001) y 123,4 mg colesterol/100 mL (Oles *et al.*, 1990). Además, este ingrediente puede estar sometido a procesos de pasteurización y homogenización que modifican el glóbulo graso, disminuyendo el contenido de colesterol y esteroides minoritarios presentes en la membrana (Yao *et al.*, 2015).

Si bien en el apartado 2 se ha descrito la composición del MFGM en la leche, en la Figura 16 se muestra un esquema de la obtención del ingrediente MFGM incorporado a PL. La grasa láctea, obtenida por centrifugación de la leche, se lava con 3-15 volúmenes de agua destilada seguido de una disolución de sacarosa salina

tamponada, una disolución de tampón fosfato isotónico y, en algunos casos, con algún detergente o agente disociante; este proceso se realiza al menos, por triplicado. Después de los lavados, la MFGM se libera del núcleo de TAG a la fase acuosa mediante batido a baja temperaturas, aplicando ciclos de congelación-descongelación o directamente mediante el uso de disolventes polares, sales biliares o detergentes no aniónicos; sin embargo, con este último tipo de extracción no se consigue un rendimiento tan alto como con el batido (Dewettinck *et al.*, 2008). En el proceso de extracción de la MFGM por agitación, al batir la grasa se introduce aire y los glóbulos de grasa se disponen alrededor de las burbujas de aire, aproximándose entre sí y llegando a romper su propia estructura, formándose pequeños grumos de grasa y saliendo parte de la grasa líquida del glóbulo al exterior. Seguidamente, en el proceso de inversión de la fase acuosa para obtener la mantequilla se obtiene el suero de mantequilla, mazada o en inglés *buttermilk*, que contiene fragmentos de la MFGM, proteínas, lactosa y minerales (Vanderghem *et al.*, 2010). Finalmente, la mazada o en su defecto el β -suero se someten a métodos de microfiltración, ultracentrifugación o liofilización para extraer la MFGM (Rombaut *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2015).

El contenido de colesterol representa el 95% de los esteroides, frente a cantidades trazas de precursores como desmosterol, latosterol y lanosterol, y EV como estigmasterol y β -sitosterol. Se ha constatado que la microfiltración aplicada en la obtención de la MFGM influye en los contenidos de colesterol de la misma, siendo en la MFGM no ultrafiltrada (15,20 g colesterol/100 g esteroides + LP) > MFGM ultrafiltrada de globulos de pequeño tamaño (9,50 \pm 0,6 g colesterol/100 g esteroides + LP) > MFGM ultrafiltrado de glóbulos de gran tamaño (7,6 \pm 0,3 g colesterol/100 g esteroides + LP) (Fauquant *et al.*, 2007).

Figura 16. Obtención de la membrana del glóbulo graso de la leche.

Fuente: Ross *et al.*, 2015 modificada

◆ Preparados para lactantes

Los contenidos de colesterol en los PL oscilan entre 0,3-25,8 mg/100 mL, siendo en la mayoría de los casos menores que los presentes en LH. No existen en la bibliografía datos sobre contenidos de precursores del colesterol (desmosterol, latosterol, etc.). Son pocos los estudios que analizan el perfil de EV en PL (Tabla 9).

Se han indicado contenidos de colesterol en PL seis veces menores a los presentes en LH ($2,2 \pm 1,1$ vs. $14,2 \pm 3,3$ mg/100 g) (Wong *et al.*, 1993) o incluso de 2,5 a 11 veces menores, dependiendo del tipo de PL ($1,2-4,6$ vs. $13,5-12,0$ mg/100 mL) (Huisman *et al.*, 1996). Sin embargo, Scopesi *et al.* (2002) no encuentra diferencias significativas entre la media de todos los PL y LH ($7,3 \pm 9,1$ vs. $12 \pm 4,0$ mg/100 mL), al igual que Ramalho *et al.* (2011) ($12,5$ vs. $9,5-17,4$ mg/100 mL).

Tabla 9. Contenido de esteroles en preparados infantiles (mg/100 mL).

Preparado para lactante				
Colesterol	Campesterol	Estigmasterol	Sitosterol	Referencia
1,04-3,56				Wong <i>et al.</i> , 1993 ^a
1,16-4,64	1,20-3,20	0,41-1,24	3,32-8,29	Huisman <i>et al.</i> , 1996
1,7-25,1			1,10-3,57	Zunin <i>et al.</i> , 1998 ^b
0,3-25,8				Scopesi <i>et al.</i> , 2002
9,7-9,9	2,2-4,3	2,5-5	2,5-4,5	Maduko & Park, 2007 ^a
0,93-5,45				Kamelska <i>et al.</i> , 2011
12,48-12,87				Ramalho <i>et al.</i> , 2011
3,21-8,86				Jeong <i>et al.</i> , 2012 ^a
3,04-8,42				Ahn <i>et al.</i> , 2012 ^a
	9,66-13,03 ^c			Oleynik <i>et al.</i> , 2013
4 ^d ,8 ^e				Timby <i>et al.</i> , 2014
Preparado de continuación				
0,95-7,52			1,67-2,79	Zunin <i>et al.</i> , 1998 ^b
7,51-9,59				Ramalho <i>et al.</i> , 2011
Preparado a base de soja				
0,39	4	0,8	8,2	Huisman <i>et al.</i> , 1996
	14,89 ^c			Oleynik <i>et al.</i> , 2013

^aExpresado en mg/100 g de producto reconstituido.

^bExpresado en mg/100 mL, suponiendo un factor de reconstitución medio de 12,5%.

^cEsteroles totales determinados enzimáticamente. ^dPL sin MFGM. ^ePL con MFGM.

La variabilidad en el contenido de colesterol en los PL es reflejo del amplio intervalo de contenidos presentes en la leche de vaca (1,87-44,95 mg/100 mL) (Xu *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2007; Viturro *et al.*, 2010; Ramalho *et al.*, 2011; Larsen, 2012), o en su caso, en la leche de cabra (10,5-12,8 mg/100 g) (Maduko & Park, 2007).

En un estudio, que evalúa como influye los PL suplementados con MFGM en el desarrollo cognitivo (Timby *et al.*, 2014), se observa que la suplementación de los PL con MFGM modifica la composición de la fracción grasa del preparado (incrementa el contenido de colesterol) y reduce la diferencia respecto a la LH.

Solo dos estudios han evaluado la contribución de los ingredientes al contenido de esteroles en PL. Scopesi *et al.* (2002) estudian PL elaborados con distintas fuentes lipídicas: aceite vegetal, aceite vegetal y leche, aceite vegetal y leche desnatada y aceite vegetal, leche desnatada, grasa animal y huevo. Los PL elaborados con esta

última fuente lipídica presentan contenidos de colesterol superiores al resto (22,6-25,8 vs. 0,3-6 mg/100 mL).

Maduko & Park, (2007) elaboran PL a base de leche de cabra desnatada y diferentes proporciones de aceites vegetales (cártamo, coco y soja), obteniendo contenidos de colesterol constantes en todos sus PL. Sin embargo, el perfil de EV es diferente, siendo sus contenidos mayores en los que llevan mayor proporción de aceite de cártamo o de soja (26,6-27 vs. 21,3-21,6 mg/100 g de PL reconstituido).

5.2.2. Fosfolípidos y esfingomielina

◆ Ingredientes

En la Tabla 10 se muestran los contenidos y porcentajes relativos de LP presentes en ingredientes utilizados en la elaboración de PL, que son obtenidos como subproductos de la elaboración de mantequilla, grasa láctea anhidra, etc, o como productos intermediarios en la extracción y aislamiento de la MFGM (ver Figura 16).

El ingrediente a base de LP (concentrado-LP), así como el obtenido por purificación y concentración del β -suero y mazada, es el que aporta mayor contenido de LP seguido de MFGM y β -suero, siendo natas y mazadas las que menos LP aportan (ver Tabla 10). Dado que el β -suero es un subproducto de la obtención de grasa láctea anhidra, obtenida por fusión y centrifugación de la mantequilla (ver Figura 16), con la obtención del β -suero se consigue liberar el resto de fragmentos de MFGM que habían quedado atrapadas en los gránulos de la mantequilla obteniéndose un producto rico en LP (Vanderghem *et al.*, 2010).

Tabla 10. Lípidos polares en ingredientes y leche.

Ingrediente	Porcentajes relativos					Total g/100g	Referencia
	PE	PI	PS	PC	SM		
Leche de vaca	41,99	4,83	6,72	19,15	17,93	0,03 (0,71*)	Rombaut et al., 2005
	36,58	6,18	7,28	24,6	20,25		Rodríguez-Alcalá & Fontecha, 2010
	23,4	8,9	9,1	33,1	25,4		Yao et al., 2016c
Leche de cabra	29,17	5,77	7,65	26,25	23,24		Rodríguez-Alcalá & Fontecha, 2010
	19,9	9,4	14,0	31,6	25,0		Yao et al., 2016c
MFGM*	26,8-29,5	0,38-0,97	0,00-1,04	34,0-35,0	35,5-36,2	0,76-0,92	Morin <i>et al.</i> , 2007a
MFGM	30,5	7,1	5	31	19,9		Fong <i>et al.</i> , 2007
	36,4	6,5	7,6	32,1	17,3		Fauquant <i>et al.</i> , 2007
	33,0	17,8		27,4	18,8		Sánchez-Juanes <i>et al.</i> , 2009a
Suero quesero	41,13	3,69	9,33	19,04	16,38		Rombaut et al., 2005
β-suero	29,2-31,4	9,0-11,2	8,7-10,1	24,9	23,8-26,8	0,88-0,95	Britten et al., 2008
Mazada**	24,9-29,4	0,32-0,97	1,04-1,73	33,9-34,4	34,2-41,1	4,43-4,75	Morin et al., 2007a
Mazada	33,5	2,4	10,3	35,5	18,3	4,48*	Avalli & Contarini, 2005
	42,90	8,91	8,55	19,10	12,83	0,091 (22*)	Rombaut et al., 2005
	39,0-39,4	8,9-9,0	7,8-8,3	24,4-25,8	18,1-19,3	0,09-0,13	Britten et al., 2008
	17	7,1	8,1	46,1	21,7	12,4*	Costa et al., 2010
	8,4	8,2	4,6	51,2	27,6		Gallier et al., 2010
	19,8	4,93	20,60	33,91	16,87		Rodríguez-Alcalá & Fontecha, 2010
Ingrediente base de LP	a 20,9	7,2	8,6	26,8	36,5	31,01	Gassi et al., 2016
Nata	29,9-42,7	6,8-8,6	7,2-15,2	14,6-25,9	20,4-28,6	0,53-0,86*	Avalli & Contarini, 2005
	39,97	8,16	8,23	20,72	13,93	0,14 (0,35*)	Rombaut et al., 2005
	26,7	7,5	11,7	26,5	20,8		MacKenzie et al., 2009
	17,7	15,4	11,3	33,7	21,8	5,65*	Costa et al., 2010

MFGM: membrana del glóbulo graso de la leche; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; PC: fosfatidilcolina; SM: esfingomielina. *Expresado en g/100g grasa **Matriz en estado sólido (en polvo).

La mazada o suero de mantequilla (ver Figura 16) incluye una amplia gama de subproductos de la grasa láctea, según la materia prima utilizada, las condiciones de pretratamiento y el proceso de fabricación de la mantequilla (Vanderghem *et al.*, 2010). En el caso de mazadas sometidas a secado por pulverización, el contenido de LP disminuye un 36% (Morin *et al.*, 2007a). Otro aspecto que puede influir en el contenido de LP de la mazada es la nata utilizada para su elaboración, ya que un lavado previo de ésta puede eliminar glóbulos de grasa de pequeño tamaño y material de membrana, disminuyendo el contenido de LP en este ingrediente (Morin *et al.*, 2007a, b).

El diferente perfil de LP en MFGM viene condicionado por su localización en las diferentes capas de la MFGM y el proceso de obtención de esta (Contarini & Povo, 2013). Otro factor que modifica dicho perfil es la sensibilidad a altas temperaturas de PE, PC, PI y PS (fase I_a) o bajas temperaturas de SM (fase I_o) que pueden producir pérdidas de los mismos (Yao *et al.*, 2016b). Además, el proceso de homogenización disminuye los porcentajes de SM y PC (situados en la capa externa), aumentando los correspondientes a PE y PS. La liofilización disminuye los porcentajes de SM y PS; mientras que el secado por pulverización provoca una disminución de PC y PS, manteniéndose constante la SM (Yao *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2016b).

◆ **Preparados para lactantes**

En la Tabla 11 se recogen los contenidos de LP en preparados infantiles. Los intervalos son amplios, mostrando los valores más altos en los PL destinados a prematuros (Holmes *et al.*, 2000) o elaborados a partir de calostro (Fong *et al.*, 2013). Generalmente, los contenidos totales de los LP son del orden o incluso mayores de los encontrados en LH (ver Tabla 5).

El perfil de LP es muy variable, siendo el orden de mayor a menor: PC > SM o PE > PS y PI, a diferencia de la LH, donde la SM suele presentar mayor contenido

que la PC. Este hecho puede atribuirse a que los PL se elaboran con lecitina de soja (PC) como emulsionante (Fong *et al.*, 2013). En los productos destinados a niños de corta edad (leche de crecimiento) este perfil cambia, presentando contenidos (expresados en mg/100 g producto en polvo) de PC (77) > PI (35) > SM (32) > PE (27) (Braun *et al.*, 2010).

Tabla 11. Contenidos de lípidos polares en preparados infantiles (mg/100 mL).

PE	PI	PS	PC	SM	Total	Referencia
Preparado para lactante						
			1,7-14,3	n.d-6,6		Zeisel <i>et al.</i> , 1986 ^a
3,4-7	1,5-5	-	3,7-11,7	6,7-7,4		Kynast & Schmitz, 1988 ^b
			8,45 ^c	7,51 ^c		Holmes <i>et al.</i> , 2000 ^a
			2,30-6,91	2,19-3,65		
2,2	1,4	0,6	6,2	1		Sala-Vila <i>et al.</i> , 2003 ^d
			3,76-9,83	0,37-1,73		Ilcol <i>et al.</i> , 2005 ^a
38	-	-	65	42		Braun <i>et al.</i> , 2010 ^d
61-75	26-46	13-28	63-84	31-82	228-304	Fong <i>et al.</i> , 2013 ^d
143*	60*	26*	253*	125*	607*	
Leche de crecimiento						
27	35	-	77	32		Braun <i>et al.</i> , 2010 ^d
Preparado a base de soja						
			18,14-19,05	n.d		Zeisel <i>et al.</i> , 1986 ^a
			3,84	< 0,37		Ilcol <i>et al.</i> , 2005 ^a

PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; PC: fosfatidilcolina; SM: esfingomielina.

*Preparado para lactante elaborado con calostro. ^aCalculado en mg/100 mL a partir del peso molecular (Pm). Pm de PC: 768 g/mol, Pm de SM: 751 g/mol. ^bExpresado en mg/100 g de producto reconstituido. ^cPreparado para lactante para niño pre-término. ^dExpresado en mg/100 g de producto en polvo.

Los PL elaborados a base de soja presentan mayores contenidos de colina libre que la LH (Zeisel *et al.*, 1986), mientras que contiene menos SM (Ilcol *et al.*, 2005) o está ausente (Zeisel *et al.*, 1986).

Además de la variabilidad en los resultados debida a los ingredientes utilizados, también debe considerarse la variabilidad debida a las técnicas analíticas aplicadas, dispuestas en una reciente revisión (Cilla *et al.*, 2016).

5.2.3. Ácido siálico

◆ Ingredientes

En la Tabla 12 se muestran los contenidos de Sia en ingredientes utilizados en la elaboración de PL. En estos se incluye concentrados proteicos obtenidos a partir del lactosuero tras clarificación, ultrafiltración y secado, pudiéndose incluir una etapa de desmineralización, previa al secado, en cuyo caso se obtiene concentrado proteico desmineralizado. Estos concentrados pueden enriquecerse con α -lactalbúmina, debido a su alto contenido en aminoácidos esenciales, contenido en Sia y funcionalidad biológica (Hopper & McKeinze, 1973), o con MFGM, fuente de Sia (Sánchez-Juanes *et al.*, 2009b). Dependiendo de la fuente de enriquecimiento de los concentrados proteicos (MFGM vs. α -lactalbúmina) los contenidos en Sia varían, siendo mayores los que están enriquecidos con MFGM (Lacomba *et al.*, 2011a).

Tabla 12. Contenido de siálico y gangliósidos en ingredientes proteicos y MFGM (expresados en mg/100g).

Ingrediente	Ácido siálico	Gangliósidos	Referencia
Leche en polvo desnatada	177	-	Spichtig <i>et al.</i> , 2010
α -lactalbúmina	1800	-	Hopper & McKeinze, 1973
MFGM [#]	0,892 ^{##}	0,113 [*]	Sánchez-Juanes <i>et al.</i> , 2009b
β -suero	-	314,2-420,2	Fong <i>et al.</i> , 2011
Mazada	-	64,3-84,6	
Ingrediente a base de LP	-	1544,1-1657,2	
Concentrado proteico del suero	1986	29,7 [*]	Neeser <i>et al.</i> , 1991
	938	-	Spichtig <i>et al.</i> , 2010
	-	682,2-901,4	Fong <i>et al.</i> , 2011
	-	221,14-582,82	Zhang <i>et al.</i> , 2012
Concentrado proteico de suero desmineralizado, en polvo	1396,6	25,1 [*]	Neeser <i>et al.</i> , 1991
Concentrado proteico del suero rico MFGM	2408,8	55,61 [*]	Lacomba <i>et al.</i> , 2011a
Concentrado proteico del suero rico α -lactoalbumina	1623,9	0,71 [*]	

[#]Producto en crudo. ^{##}Expresado por 100 g de peso seco. ^{*}Expresado en ASUL (Ácido siálico unido a lípidos)

◆ Preparados para lactantes

El contenido de Sia total, Neu5Ac y Neu5Gc en preparados destinados a la alimentación infantil se presenta en la Tabla 13 correspondiendo el contenido más alto a un preparado elaborado con calostro bovino (Spichtig *et al.*, 2010).

Tabla 13. Contenido de ácido siálico (mg/100 mL) en preparados destinados a la alimentación infantil.

Neu5Ac	Neu5Gc	Total ^a	Referencias
Preparado para lactante			
7-13,9			Carlson, 1985*
9,2-28,8			Neeser <i>et al.</i> , 1991*
19,7 ^b			Heine <i>et al.</i> , 1993
10-19			
23,3-26,6			Sánchez-Díaz <i>et al.</i> , 1997*
19,5 ^{b,c}			Wang <i>et al.</i> , 2001 ^{c*}
6,5-11,4 ^c			
11,5-15,7			Martín <i>et al.</i> , 2007
(89,3-120,6)			
(116-219)	(2,2-4,7)		Sørensen, 2010
(92, 250 ^d)	(3,7, 11 ^d)	(96-261)	Spichtig <i>et al.</i> , 2010
14,7-18,2	0,33-0,67	15,4-18,5	Lacomba <i>et al.</i> , 2011a
(113,5-140,2)	(2,5-5,2)	(118,7-142,7)	
14,7-15,7	0,45-0,52	15,3-16,2	Salcedo <i>et al.</i> , 2011
(47-94)	(1,5-5,9)		Hurum & Roher, 2012
(89-164,2)			Li <i>et al.</i> , 2015
Preparado de continuación			
10			Heine <i>et al.</i> , 1993
13,3 ^c			Wang <i>et al.</i> , 2001 ^{c*}
10,8-16,6			Martín <i>et al.</i> , 2007
(76,5-111,4)			
16,5-19,9	0,49-0,83	17,2-20,4	Lacomba <i>et al.</i> , 2011a
(118-153)	(3,8-5,9)	(124-157,4)	
14,6-20	0,38-0,55	15-20,4	Salcedo <i>et al.</i> , 2011
Leche de crecimiento			
(104-204)	(4,4-6,7)	(109-211)	Spichtig <i>et al.</i> , 2010
Preparado a base de soja			
0			Carlson, 1985*
3,4			Heine <i>et al.</i> , 1993
1,5 ^c			Wang <i>et al.</i> , 2001 ^{c*}

^aTotal calculado como la suma de Neu5Ac + Neu5Gc. ^bPreparado para niños pre-término

^cSe transforma a mg/100 mL con el Pm del Sia (309 g/mL). ^dElaborado con calostro bovino

*Determinación de Sia por espectrofotometría de absorción molecular. Contenidos expresados como Neu5Ac.

Entre paréntesis se expresa el valor en mg/100 g de producto en polvo.

Los PL elaborados con leche de vaca, presentan contenidos de Sia inferiores al calostro humano > LH madura, aunque pueden llegar a equipararse a esta última (ver Tabla 6) (Neeser *et al.*, 1991; Sánchez-Díaz *et al.*, 1997; Martín-Sosa *et al.*, 2003). Como se ha mencionado anteriormente, el Sia solo se encuentra presente en mamíferos y no en vegetales, por lo que no debería estar presente en PL a base de soja. Sin embargo, existen autores que encuentran Sia en los mismos (ver Tabla 13), si bien Wang *et al.* (2001) lo atribuye a interferentes como el ácido quínico.

En PL, el contenido (mg/100 mL) de Sia unido a oligosacáridos es inferior al presente en LH madura ($3,8 \pm 2,6$ vs. $36,5 \pm 13,3$), calostro ($101,8 \pm 22,9$) y similar al de leche de vaca (33 ± 8) (Martín-Sosa *et al.*, 2003).

Varios autores han demostrado que el contenido de Sia total en los PL guarda relación directa con la proporción suero:caseína. Los PL con una relación suero:caseína (60:40) contienen de 2 a 5 veces más de Sia unido a oligosacáridos que los que tienen una relación suero:caseína (20:80), sugiriendo que el suero es mejor fuente de Sia que la caseína bovina (Carlson, 1985; Wang *et al.*, 2001). En este sentido, los mayores contenidos de Sia se obtienen en PL hipoalergénicos a base de hidrolizados (suero:caseína; 100:0) (Neeser *et al.*, 1991) y aquellos a los que se les ha adicionado suero en polvo desmineralizado para aumentar la relación suero:caseína (Sánchez-Díaz *et al.*, 1997).

Hay pocos estudios que diferencien entre los contenidos de Neu5Ac y/o Neu5Gc (ver Tabla 13) en PL. Resaltar que se han obtenido contenidos de Sia distintos en PL dependiendo de la técnica de determinación: UHPL-fluorescencia (56-94 mg Neu5Ac/100 g producto en polvo y 1,5-2,7 mg Neu5Gc/100 g producto en polvo) y cromatografía de intercambio iónico con pulsos amperométricos (47-85 mg Neu5Ac/100 g producto en polvo y 4,5-5,9 mg Neu5Gc/100 g producto en polvo) (Hurum & Rohrer, 2012). En todos los casos, el Neu5Gc no supera el 8,7% del Sia total. No obstante, el incremento de Neu5Gc en PL también puede darse por el tipo

de leche usada en su formulación. Spichtig *et al.* (2010) indican que en leche de cabra el Neu5Gc es el compuesto mayoritario, representando el 56,8% a diferencia de la leche de vaca que solo representa un 2,7%.

5.2.4. Gangliósidos

◆ Ingredientes

En la Tabla 12 pueden consultarse los contenidos de GG en ingredientes. Neeser *et al.* (1991) indican que los sueros concentrados, tanto desmineralizados como proteicos presentan contenidos de GG similares. Asimismo, los concentrados proteicos enriquecidos en MFGM tienen mayores contenidos de GG que los enriquecidos en α -lactolbúmina (Lacomba *et al.*, 2011a).

El concentrado de proteínas del suero presenta un contenido de 1,4-1,7 veces más que el contenido en el β -suero (Fong *et al.*, 2011), debido a que el concentrado de proteínas del suero es derivado del β -suero mediante enriquecimiento con MFGM y compuestos lipídicos complejos (Catchpole *et al.*, 2008). El β -suero puede ser enriquecido con MFGM y lípidos complejos dando como resultado una nata. Este hecho, hace que los contenidos de GG, principalmente GD₃ sean mayores que los de la mazada (Fong *et al.*, 2011), ya que la MFGM contiene al menos el 90% de los GG de la leche (Keenan, 1974; Lopez, 2011). Otro ingrediente que presenta altos contenidos de GG es el ingrediente a base de LP (Fong *et al.*, 2011) (ver Tabla 12).

Señalar que se han comercializado ingredientes derivados de la MFGM, los cuales pueden ser añadidos a PL. Estos ingredientes patentados por empresas, presentan contenidos de LP, Sia y GG, cuya composición se recoge en la Tabla 14.

Tabla 14. Porcentaje de los compuestos que forman parte de los ingredientes comerciales Lacprodan®.

	MFGM-10 ^a	CGMP-10 ^b	PL-20 ^c
Proteína	73 ± 3 %	83-87%	49-55%
Lactoferrina (nativa)	0,15 %	-	-
Ig-G	5%	-	-
Lípidos totales	16 ± 2 %	0,5%	24-30%
Fosfolípidos	7 ± 1%	-	16%
GG	~ 0,2%	-	2%
Sia	~ 2%	4,2%	-
Lactosa	3%	2%	10%

^aIngrediente Lacprodan®, rico en membrana del glóbulo graso de la leche

^bIngrediente Lacprodan®, rico en caseína glico-macro péptidos

^cIngrediente Lacprodan®, rico en lípidos polares

◆ Preparados para lactantes

En la Tabla 15 se indican los contenidos de GG en PL, expresados en GG totales (ASUL/L) cuando se determinan por espectrometría, o en GG (mg GG/L o 100g) cuando se determinan por cromatografía líquida acoplada a masas. Los PL presentan contenidos de GG similares (Lacomba et al., 2011a) o del orden de la mitad (Laegreid et al., 1986; Nesser et al., 1991; Pan & Izumi, 2000) a los aportados por LH madura (ver Tabla 7). Este menor contenido se ha justificado por la ruptura de los glóbulos grasos (ricos en GG), durante la preparación de los ingredientes, repartiéndose los GG en las distintas fracciones (grasa, sólidos no solubles y/o suero) (Nesser et al., 1991).

El GD₃ es el compuesto mayoritario de los PL, seguido del GM₃, al igual que en la leche de vaca (Sørensen, 2006). Este perfil es similar al calostro (GD₃ > GM₃), pero diferente al de la LH madura (GM₃ > GD₃).

Existen pocos estudios que evalúan la influencia de los ingredientes en los contenidos y perfil de GG en PL. Algunos autores atribuyen las diferencias en el contenido de GG en PL a la diversidad, procedencia y forma de obtención de los de ingredientes utilizados en su formulación, sin especificar dicha contribución (Nesser et al., 1991; Sørensen, 2006; Fong et al., 2011).

Tabla 15. Gangliósidos en preparados destinados a la alimentación infantil.

GG (mg ASUL/L)	Preparados para lactantes					Referencia
	Porcentaje relativo					
	GM ₁	GM ₂	GM ₃	GD ₃	GT ₃	
6	<0,01	7	<1	82	n.d	Laegreid <i>et al.</i> , 1986
< 0,5-6,2	-	-	-	-	-	Neeser <i>et al.</i> , 1991
0,95-1,36	-	-	2,3-10,9	64,9-77	3,4-17,1	Sánchez-Díaz <i>et al.</i> , 1997
4,48-4,85	-	-	0,3-2,6	72,4-86,6	-	Pan & Izumi, 2000
4,96-11,42 ^a	-	-	-	-	-	Sørensen, 2006
15,6-20,8 ^{a*} (12-16 ^b)	-	-	-	-	-	Fong <i>et al.</i> , 2011
0,88-2,29	n.d-0,5	-	3,5-13,4	58,5-71,3	6,9-14,1	Lacomba <i>et al.</i> , 2011a
2,17	-	-	-	-	-	Lacomba <i>et al.</i> , 2011b
4,51-24,54 ^{a*} (3,47-19,4 ^b)	-	-	-	-	-	Zhang <i>et al.</i> , 2012
Preparado de continuación						
0,27-1,17	-	-	2,0-4,4	72,1-80,3	1,1-10,1	Sánchez-Díaz <i>et al.</i> , 1997
0,25-0,29	-	-	4,3-36,6	n.d-1,8	1,4-3,8	Lacomba <i>et al.</i> , 2011a
0,23	-	-	-	-	-	Lacomba <i>et al.</i> , 2011b

^a Valores expresados como mg de GG/L determinados por LC-ESI-MS/MS. *Convertido con el factor de reconstitución 13%

^b Valores expresados como mg de GG/100 g determinados por HPLC-MS (LTQ-Orbitrap)

Por último, no se observan una relación entre el origen de la grasa o el tratamiento térmico y el contenido de GG, y sí, con la adición de sueros ricos en GG como ingredientes o sueros con MFGM en su composición (Lacomba *et al.*, 2011a).

6.- Ingestas de compuestos bioactivos en leche humana vs. preparados para lactantes

Existen estudios clínicos que asocian la lactancia materna con un mejor desarrollo cognitivo respecto a lactantes alimentados con PL (Anderson *et al.*, 1999).

♦ Colesterol

No existen recomendaciones de ingestas de colesterol para lactantes. La ingesta de colesterol a partir de LH varía a lo largo del periodo de la lactancia (ver Tabla 16). Jensen *et al.* (1995) estiman una ingesta de colesterol de 94 mg/día considerando un volumen de LH madura de 542 mL. En un posterior estudio (Jensen, 1999), considerando un volumen de 794 mL obtiene unas ingestas de colesterol entre 75 y 150 mg/día. Las ingestas del lactante pueden ser de 18-25 mg colesterol/kg peso corporal por día, lo que viene a ser del orden de hasta 5 veces superior a la ingesta recomendada en los adultos (4 mg/kg/día) (Wong *et al.*, 1993; Koletzko *et al.*, 2001).

Solo dos estudios comparan las ingestas proporcionadas por LH y PL (Wong *et al.*, 1993; Kallio *et al.*, 1997). Los lactantes alimentados con PL ingieren un contenido de colesterol muy variable en función del tipo de preparado y, en comparación a los alimentados exclusivamente con LH, generalmente ingieren menos cantidad de colesterol al día (Wong *et al.*, 1993; Kallio *et al.*, 1997). Como término medio, la ingesta de colesterol a partir de los PL (24 mg/día) es 5 veces menor que la correspondiente a los lactantes alimentados con LH (116 mg/día) (Wong *et al.*, 1993).

Esta mayor ingesta de colesterol por parte de los lactantes (4 meses de edad) alimentados con LH, parece que aumenta simultáneamente los contenidos de colesterol total en plasma y lipoproteínas de baja densidad (LDL), sin influir en las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Wong *et al.*, 1993). Kallio *et al.* (1992, 1997) también observan un incremento del colesterol total y LDL en lactantes alimentados con LH durante los 2, 4 y 6 meses, no mostrando diferencias en los contenidos de HDL y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Se ha observado que lactantes alimentados con LH tienen un contenido de colesterol total y LDL significativamente

mayor que los alimentados con PL (Agostoni *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2002) o de forma mixta (LH vs. mixta) (Harit *et al.*, 2008). Además, estos últimos presentan menor colesterol ligado a HDL y no hay diferencia para VLDL entre los dos tipos de alimentación (LH vs. mixta) (Harit *et al.*, 2008). Estos estudios también concluyen que el contenido de TAG en suero no se ve afectado por el tipo de alimentación.

Tabla 16. Ingestas de compuestos bioactivos proporcionadas por la alimentación infantil (mg/día).

Referencia	Leche Humana			PL
	Calostro	Transición	Madura	
Colesterol (mg/día)				
Boersma <i>et al.</i> , 1991	20	111	150 (1 mes)	
Kallio <i>et al.</i> , 1992			131-165 (6-9 meses)	
Wong <i>et al.</i> , 1993			116 (4 meses)	11-39
Jensen <i>et al.</i> , 1995			18*	
Kallio <i>et al.</i> , 1997			94	
Jensen, 1999			15-20*	2-5*
Koletzko <i>et al.</i> , 2001			75-150	
			25*	
Lípidos polares (mg/día)				
Giuffrida <i>et al.</i> , 2013			140	
-SM (mg/día)				
García <i>et al.</i> , 2012			62	
			13**	
Ácido siálico (mg/kg/día)				
Carlson, 1985		210	72-134 (1mes)	
			55 (2 meses)	
			31 (3,5-7 meses)	
Lacomba <i>et al.</i> , 2011a			40 (4-7 meses)	16-33 (0-6 meses)
Gangliósidos (µg ASUL/kg/día)				
Lacomba <i>et al.</i> , 2011a			293(4-7 meses)	91-407 (0-6 meses)
	790***	770***	890*** (1mes)	
			1100*** (2 meses)	
			500-900*** (3-6 meses)	

*Ingesta expresadas por mg/kg/día. **Ingesta en lactantes pre-término. ***Calculado a partir de los contenidos de Takamizawa *et al.* (1986).

Los lactantes son capaces de adaptar la síntesis del colesterol en función de su ingesta. Así, la síntesis de colesterol es menor en lactantes alimentados con LH donde las ingestas de colesterol son altas (2,59-3,88 mmol/L). En cambio, al modificar la alimentación por PL a base de leche de vaca (0,28-0,85 mmol

colesterol/L) o PL a base de soja (sin colesterol), la síntesis de colesterol se incrementa de 2,6 a 3,7 veces, respectivamente (Cruz *et al.*, 1994). La adición de colesterol a los PL no modifica ni la síntesis de colesterol (Uauy *et al.*, 2000; Bayley *et al.*, 2002) ni incrementa el contenido de colesterol en suero de lactantes a término y pre-término. Un incremento de 5 a 10 mg colesterol/100 mL de PL no aumenta el colesterol total en suero, pero sí el libre durante el primer mes de vida (Van Biervliet *et al.*, 1992).

La mayor colesterolemia de lactantes alimentados con LH frente a los alimentados con PL, se relaciona con un menor contenido de colesterol total en etapas futuras y puede estar asociada con un menor riesgo de enfermedad cardiovascular en la edad adulta (Rueda, 2014). De la misma manera, Owen *et al.* (2008) postulan que contenidos altos de colesterol en LH, paradójicamente podrían disminuir la colesterolemia en etapas posteriores de la vida.

Recientemente, Timby *et al.* (2014) realizan un estudio aleatorizado de doble ciego prospectivo, donde 160 lactantes de 2 meses de edad son alimentados hasta los 6 meses con PL suplementados o no con MFGM de origen bovino. Demuestran que el incremento de la ingesta de colesterol a través de un PL suplementado con MFGM induce una mayor concentración de colesterol total en suero, sin modificaciones en la relación LDL/HDL. Esta concentración en suero es similar a la observada en los lactantes alimentados con LH.

No se han realizado estimaciones de la ingesta de EV en lactantes. Como se ha comentado anteriormente, los aportes de EV por parte de la LH son despreciables, pero deben considerarse en los PL por la utilización de aceites como ingredientes. Su presencia podría influir en la absorción del colesterol.

◆ **Lípidos polares**

Solo se ha evaluado la ingesta de LP a partir de LH (ver Tabla 16). A partir del volumen de LH ingerido por lactantes de 1 mes (600 mL/día), se ha estimado la ingesta de LP totales en 140 mg/día (Giuffrida *et al.*, 2013). Estos autores, a partir

de los contenidos en LH proporcionados por otros autores (Collins *et al.*, 1989; García *et al.*, 2012; Russo *et al.*, 2013), obtienen ingestas similares a la indicada (109, 126 y 150 mg/día).

García *et al.* (2012), teniendo en cuenta un volumen medio de LH ingerido (800 mL/día) por el lactante a término y pre-término, obtiene ingestas medias de SM (mg/día) de 62 y 13, respectivamente. Los LP y, en particular la SM, son conocidos por reducir la absorción intestinal de colesterol (Rueda, 2014). La SM, debido a su alto grado de saturación, puede formar un complejo con colesterol y llegar a la parte inferior del intestino delgado y el colon (Bourlieu *et al.*, 2015a). Este complejo reduce la incorporación del colesterol a las micelas y su posterior absorción en intestino delgado (Ohlsson *et al.*, 2010). Nilsson & Duan (2006) establecieron que la SM y sus metabolitos pueden influir en la hidrólisis de TAG, la absorción de colesterol, la formación de lipoproteínas y el crecimiento de la mucosa en el intestino.

Según Ilcol *et al.* (2005) la concentración de colina libre en suero de lactantes alimentados con PL es menor que en los alimentados con LH. Por tanto, es muy importante adecuar la alimentación de lactantes con el fin de satisfacer las demandas de colina en esta etapa (Holmes-MacNary *et al.*, 1996). La ingesta dietética de referencia (IDR) de colina es 125 mg/día para el periodo de 0 a 6 meses y 150 mg/día para el periodo de 6 a 12 meses (IOM, 2006). Estas son calculadas teniendo en cuenta el volumen medio de LH (780 mL/día) ingerido por los lactantes nacidos a término, alimentados exclusivamente con LH durante los primeros 6 meses de vida, calculado por pesada antes y después de cada toma y la concentración de colina en LH (160 mg/L), representada como colina, fosfocolina, glicerofosfocolina, PC y SM, procedente de madres con buen estado nutricional (Zeisel *et al.*, 1986; Holmes-McNary *et al.*, 1996). La colina de la PC y la SM forma parte de la MFGM y representa el 17% de la colina que ingiere el lactante (Zeisel *et al.*, 1986; Holmes-McNary *et al.*, 1996).

Los PL se deben suplementar en colina (como colina libre), PC y SM, en cantidades y proporciones semejantes a su composición en la LH con el fin de satisfacer las necesidades de colina del lactante (Cilla *et al.*, 2016).

En ratas, se ha comprobado que la cantidad de colina libre extraída en cerebro varía en función de la circulación de colina libre (Klein *et al.*, 1998), y esto puede afectar a largo plazo en la capacidad de memoria de las ratas (Brandner, 2002). Se ha demostrado que la concentración de colina libre en suero de lactantes alimentados con LH esta significativamente correlacionada con el contenido de colina libre, fosfocolina, glicerofosfocolina y colina total en la LH; por tanto, la ingesta de LH con diferente composición y contenido en colina puede afectar al desarrollo del cerebro del lactante (Iicol *et al.*, 2005). Por todo ello es de interés evaluar las ingestas diarias de colina por el lactante, para la cual es necesario conocer las ingestas de LP, principalmente PC, y SM.

♦ **Ácido siálico**

Solo dos estudios estiman la ingesta de Sia en lactantes alimentados con LH (Tabla 16). Carlson (1985) determina la ingesta de Sia en 47 lactantes alimentados con LH, asumiendo una ingesta voluntaria de 100 kcal/kg de peso corporal y un aporte calórico de 670 kcal/L. A lo largo de la lactancia observa un descenso en la ingesta de Sia. Lacomba *et al.* (2011a) estiman, a partir de los contenidos de Sia en una mezcla de LH, las ingestas correspondientes al periodo de 4 a 7 meses. Ambos autores obtienen valores similares de ingesta de Sia para LH madura.

Solo Lacomba *et al.* (2011a) calcula ingestas de Sia a partir de sus contenidos en PL, siendo similares a las obtenidas a partir de LH madura.

♦ **Gangliósidos**

La única estimación de ingesta de GG en lactantes alimentados con una mezcla de LH (4-7 meses) es la indicada por Lacomba *et al.* (2011a). Por otra parte, a partir de los contenidos de GG en LH correspondientes a distintos meses de lactancia, indicados por Takamizawa *et al.* (1986), Lacomba *et al.* (2011a) estiman las ingestas

de GG a lo largo de la lactancia (calostro a 6 meses) (Tabla 16), siendo estas últimas superiores.

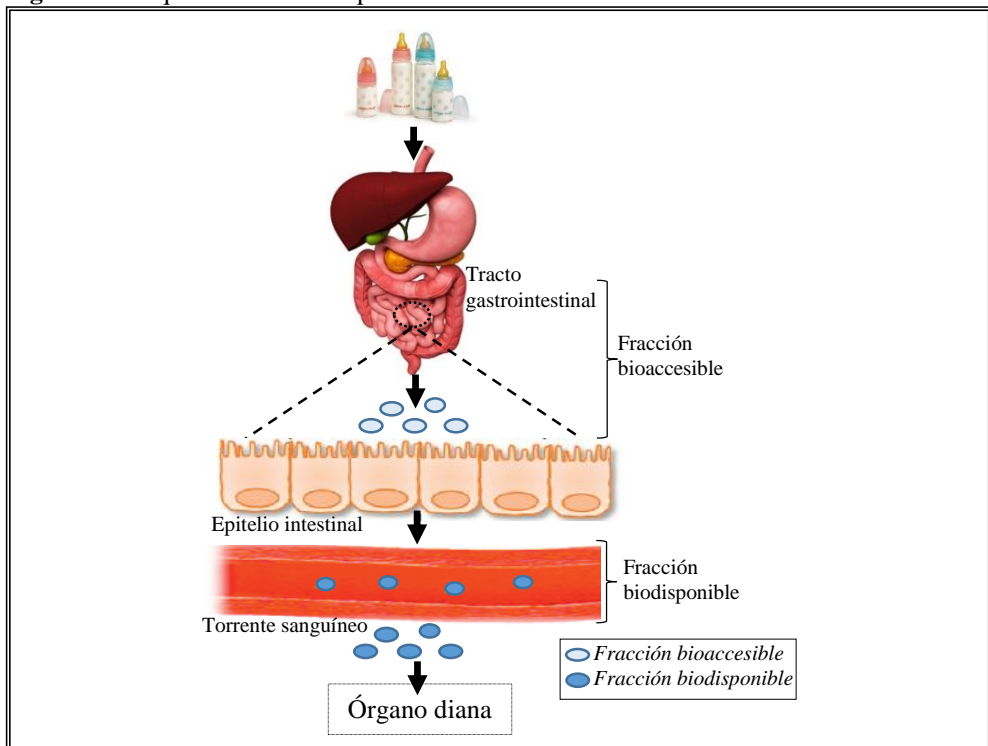
Las ingestas a partir de PL (0-6 meses) presentan un amplio intervalo (Tabla 16) y son menores que las calculadas a partir de los datos de LH obtenidos por Takamizawa et al. (1986), siendo estas diferencias mayores en los 2 primeros meses (Lacomba *et al.*, 2011a).

Del único estudio de ingestas de Sia y GG en PL, Lacomba *et al.* (2011a) destacan que solo el PL que aporta una cantidad de estos compuestos bioactivos cercana a la LH es el formulado con suero enriquecido en MFGM, aunque todavía se encuentra lejos de las ingestas aportadas por LH, sobre todo en los primeros tres meses de lactancia que es precisamente cuando más necesario son estos compuestos. Tal y como indican Pan & Izumi (2000) se podría considerar el enriquecimiento de los preparados con estos compuestos, para obtener contenidos, perfiles e ingestas similares a los de la LH.

7.- Biodisponibilidad

La BD es un concepto que evalúa la eficiencia nutricional de los alimentos con el objetivo de mejorar la salud humana independientemente del tipo de alimento considerado, ya que solo cierta cantidad de nutrientes y/o compuestos bioactivos podrán ser utilizados de forma efectiva por el organismo. La BD es el resultado de tres pasos fundamentales: la digestibilidad y la solubilidad del compuesto en el tracto gastrointestinal; la absorción del elemento a través de las células intestinales y el transporte por el torrente sanguíneo; y la incorporación desde la circulación a la entidad funcional o órgano diana (Figura 17) (Etcheverry *et al.*, 2012).

Figura 17. Esquema de la biodisponibilidad.



Fuente: Guerra et al. (2012) modificado

El término BD incluye la bioaccesibilidad (BA) y la bioactividad del compuesto previamente absorbido. La BA se define como la fracción de un compuesto que se libera de la matriz en la que se encuentra presente en el tracto gastrointestinal y se

encuentra disponible para su absorción, incorporándose al torrente sanguíneo. Esta definición incluye todos los procesos que tienen lugar durante la digestión del alimento, absorción/asimilación de las células epiteliales y el metabolismo pre-sistémico. Por su parte, el concepto de bioactividad incluye todos los procesos por los que el compuesto-analito bioactivo es transportado y alcanza el tejido diana, como interacciona con otras moléculas, el metabolismo o biotransformación que puede sufrir, la generación de un marcador biológico y la respuesta fisiológica que causa. Aunque el término BD y BA se utiliza a menudo indistintamente, es importante recalcar que BD incluye también el concepto de bioactividad (Férrandez-García et al., 2009).

En la BD pueden influir factores fisiológicos (intrínsecos al organismo) y dietéticos (extrínsecos), pudiendo modificarse la BD dependiendo de las interacciones (sinérgicas o antagónicas) que se produzcan entre ambos factores. Entre los factores fisiológicos se debe destacar la edad (recién nacido, joven, adulto, anciano), estados fisiológicos como lactancia o embarazo o patológicos, la microbiota intestinal y, de una forma muy especial, la capacidad individual de aportar diferentes nutrientes; mientras que entre los factores extrínsecos se encuentran el aporte total de componentes por la dieta, la forma química en la que se encuentre el analito así como la solubilidad e interacción con otros componentes del alimento o la dieta (Férrandez-García et al., 2009; Guerra et al., 2012)

◆ Métodos para evaluar la biodisponibilidad

Los métodos para estudiar la BD de los alimentos se pueden dividir en dos grandes grupos: métodos *in vivo* y métodos *in vitro*. Los ensayos clínicos en humanos son el mejor método para el estudio de la BD, ya que existen factores fisiológicos difícilmente reproducibles en el laboratorio (Wienk et al., 1999; Deglaire et al., 2009). Sin embargo, llegar a un acuerdo ético para llevar a cabo tales experimentos es difícil, especialmente cuando para obtener datos son necesarios estudios invasivos. Además, es casi imposible poder trabajar, por razones éticas, en poblaciones específicas sanas como los recién nacidos.

Entre los métodos *in vivo* cabe destacar el balance químico, la concentración tisular, el empleo de isotopos, así como los ensayos con animales. Estos últimos son más prácticos que los ensayos con humanos, pero las diferencias entre el modelo animal y el metabolismo humano hacen que los resultados no siempre sean extrapolables. Los estudios con animales suelen realizarse para dilucidar los mecanismos de acción. Existen modelos animales (lechón) que imitan muy bien la parte inferior de tracto gastrointestinal (estomago e intestino delgado) en el caso de lactantes, pero que presentan limitaciones técnicas (Moughan *et al.*, 1992).

Para omitir inconvenientes como razones éticas, limitaciones técnicas, coste y la alta variabilidad interindividual, una alternativa es utilizar los sistemas *in vitro* que simulan parte de las condiciones fisiológicas y pueden resultar predictivos de la digestión *in vivo*. Los más utilizados hasta el momento son sistemas estáticos *in vitro* (Hur *et al.*, 2011). Los métodos *in vitro* consisten en un tratamiento secuencial enzimático en dos o tres etapas, salivar con α -amilasa a pH 6,5, gástrica con pepsina a pH 1,8-2,5 e intestinal con pancreatina o enzimas individuales y sales biliares a pH 5-6,5, en la que se puede tener en cuenta la formación e incorporación de algunos componentes lipófilos en forma de micelas para que puedan ser absorbidos (Minekus *et al.*, 2014; Alegría *et al.*, 2015a). Posteriormente se realiza una estimación de la fracción soluble o FB o dializable del componente estudiado. Las digestiones pueden modificarse atendiendo al grupo de edad que se pretende estudiar.

En el caso del lactante, el pH gástrico oscila entre 3,2 y 3,5 antes de ingerir el alimento e incrementa a 6,0-6,5 inmediatamente después (Bourlieu *et al.*, 2014), permaneciendo el pH alto incluso una hora después de la ingesta (3,8-5,5) en función del grupo de edad (2-12 meses) (Nguyen *et al.*, 2015). Estas fluctuaciones han sido explicadas por el impacto que tiene el alimento en la acidez gástrica, más específicamente la LH o los PL, debido a su alta capacidad tampón (Bourlieu *et al.*, 2014). Diferentes estudios *in vitro* han propuesto pH entre 3,0 y 5,5 para la etapa gástrica (Dupont *et al.*, 2010; Lacombe *et al.*, 2011b; Amara *et al.*, 2014; Dall'Asta *et al.*, 2015; Wada & Lönnerdal, 2015; Liu *et al.*, 2016), al cual la pepsina sigue

teniendo actividad (Piper & Fenton, 1965); aunque es conocido que el pH óptimo de la pepsina es entre 1,5-2,2 (Schlamowitz & Petersen, 1959) y a pH superiores (4,0) se reduce significativamente la digestión de proteínas por pepsina (Sakai *et al.*, 2000). Para sistemas dinámicos de digestión *in vitro*, también se ha sugerido ajustar el pH gástrico del lactante mediante una regresión lineal ($\text{pH} = -0,011 \cdot t + 5,4$; donde t es el tiempo) (Ménard *et al.*, 2014). No obstante, no se trata de un valor de pH estandarizado; si bien, existen parámetros estandarizados para simular un modelo de digestión *in vitro* en adultos (Minekus *et al.*, 2014). Recientemente se ha publicado una revisión (Levi *et al.*, 2016) que recopila las condiciones utilizadas en ensayos de digestión *in vitro* para el lactante.

La FB se estima como la fracción máxima de componente ingerido disponible para ser absorbido (Versantvoort *et al.*, 2005). Esto puede realizarse analizando la cantidad de compuesto soluble presente en el sobrenadante obtenido por centrifugación (Crews *et al.*, 1983) o filtración (Narasinga & Prabhavathi, 1978). Por otro lado, están los métodos basados en la dializabilidad, que utilizan una membrana de diálisis de determinado tamaño de poro durante el proceso de digestión intestinal para simular una difusión pasiva a través del epitelio intestinal. Este proceso puede llevarse a cabo en equilibrio (Miller *et al.*, 1981) o en continuo (Wolters *et al.*, 1993). Estos métodos solo proporcionan información relativa de la fracción del componente soluble con un tamaño inferior al de poro de la membrana de diálisis utilizada, que se halla potencialmente disponible para su absorción. Por ello, los métodos de solubilidad y diálisis únicamente miden la primera etapa del proceso de BD, es decir, la solubilidad del compuesto objeto de estudio, requisito previo y necesario para su posterior absorción. A pesar de esta limitación, los estudios de BA proporcionan datos útiles que permiten establecer comparaciones entre los distintos alimentos y determinar el efecto causado por diferentes factores.

Estos modelos estáticos simulan las condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura, tiempo de incubación, concentración de enzimas) del tracto gastrointestinal y evalúan las posibles transformaciones de los compuestos presentes

en el alimento, así como las interacciones entre los distintos componentes. Se caracterizan por su sencillez, bajo coste, rapidez y mejor control de las variables experimentales. Sin embargo, estos métodos proporcionan estimaciones relativas y no absolutas de la BD, puesto que no tienen en cuenta determinados factores fisiológicos intrínsecos del organismo (estado nutricional, secreción gastrointestinal y endocrina, microbiota intestinal, transporte activo, interacciones con la mucosa, cinética del tránsito intestinal, etc.) (Van Campen & Glahn, 1999; Wienk *et al.*, 1999).

Con el fin de aproximarse a la realidad fisiológica del tracto gastrointestinal se han desarrollado diferentes sistemas dinámicos de digestión *in vitro* (Guerra *et al.*, 2012). Estos modelos son mucho más sofisticados que los estáticos e incluyen la regulación de pH, los flujos dinámicos de la alimentación, la tasas de vaciamiento gastrointestinal y la concentración de enzimas digestivas en los diferentes compartimentos, ya que tienen en cuenta los procesos físicos que se dan *in vivo* como el cizallamiento, hidratación de la mezcla, o el peristaltismo, que pueden influir en la viscosidad del digerido, en el cambio del tamaño de partícula o en la difusión o partición de los nutrientes. Uno de los sistemas más conocidos en el mercado es el modelo gastrointestinal desarrollado por el equipo holandés TNO (The Netherlands Organization), llamado TIM (Minekus *et al.*, 1995). Este modelo se compone de dos sistemas (TIM-1 y TIM-2) controlados por ordenador. El TIM-1 consta de 4 fases compartimentadas en serie que simulan el estómago y los 3 segmentos del intestino delgado, es decir, duodeno, yeyuno y íleon. El sistema ha permitido avances significativos en la comprensión del mecanismo de desintegración de alimentos durante la digestión y se ha aplicado a una amplia gama de muestras de alimentos (Blanquet-Diot *et al.*, 2009; Martin & De Jong, 2012). El TIM-2 representa el intestino grueso del humano, donde tienen lugar los experimentos de fermentación colónica. Otro sistema que integra el tracto gastrointestinal desde el estómago hasta el colon es el SHIME (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem). Estos dos últimos sistemas suelen ser utilizados para estudiar las interacciones del alimento con la microbiota (Guerra *et al.*, 2012).

Para evaluar la BD se han desarrollado sistemas combinados donde a los métodos de digestión simulada se les añade una fase posterior de cultivos celulares. Una de las líneas celulares más utilizadas son las células Caco-2 (modelo validado de epitelio intestinal), procedentes de adenocarcinoma de colon humano. Estas células cuando se cultivan se diferencian de forma espontánea, estructural y funcionalmente, en células semejantes a los enterocitos humanos formando monocapa polarizada, uniones intracelulares estrechas, formación de domas y con actividad enzimática (sacarasa, maltasa, lactasa o enteroquinasa entre otras enzimas) propia de la membrana de borde de cepillo. Estos sistemas permiten evaluar procesos de captación y transporte, ya que no siempre toda la fracción solubilizada o dializada es absorbida (Alegria *et al.*, 2015b). Otras líneas celulares menos comunes son las HT-29, HCT-EB y HCT-GEO, entre otras, donde la diferenciación es inducida en ausencia de glucosa (Chantret *et al.*, 1988).

7.1.-Biodisponibilidad de ácido siálico

En roedores (Nöhel & Schauer, 1981; Nöhel & Schauer, 1984) y cerdos (Wang *et al.*, 2007a) se han realizado estudios de absorción y transporte de Sia marcado con isótopos radiactivos y administrados por vía oral y/o intravenosa. De estos estudios se deduce que el Sia se metaboliza más rápido (1,5 horas antes) en forma libre que unido a otras estructuras (glúcidos y proteínas) y más rápidamente unido a oligosacáridos que a proteínas. Además, las ratas lactantes metabolizan en mayor proporción Sia unido a oligosacáridos que las adultas (Nöhel & Schauer, 1984). En el caso de Sia unido, la excreción por orina es dependiente de la naturaleza de la molécula a la que está unida y del tiempo de retención en el intestino. El 40% del Sia unido a proteínas (MUC porcina) es excretado en forma libre a la orina después de 48 horas de la administración por vía oral. En cambio, el Sia unido a los azúcares se excreta en un 80% (tanto libre como conjugado) por orina, en las 24 horas posteriores a su ingesta. La incorporación de Sia a órganos como el cerebro, depende de factores como la especie, vía de administración (oral o intravenosa), dosis, así como si el Sia se encuentra en forma libre, o unido a distintos componentes (Wang, 2009).

En este sentido se ha observado que la incorporación de Neu5Ac al cerebro es mayor en ratas lactantes que adultas (Nöhel & Schauer, 1981). Además, se han detectado diferencias en el metabolismo del Sia asociadas a la especie: se ha observado una incorporación de Sia más baja en cerebro de cerdos recién nacidos que en ratas lactantes (Wang *et al.*, 2007a).

Se ha constatado que tras suplementar con distinta cantidad de glicomacropéptido de caseína (60 mg Sia/g), se produce un incremento (10%) de Sia unido a GG y proteínas en el córtex cerebral en cerdos recién nacidos. Solo la fracción de Sia unido a proteínas incorporado al córtex cerebral presenta una relación con la dosis administrada (Wang *et al.*, 2007b). La actividad sialidasa en el intestino delgado es alta en mamíferos lactantes y decrece con la edad, existiendo una relación directa entre la actividad y el contenido de Sia presente en la leche de cada mamífero (Dickson & Messer, 1978).

Entre los recién nacidos, fallecidos por muerte súbita, se han detectado en cerebro mayores concentraciones de glicoproteínas con Sia (22%) y GG (32%) en aquellos alimentados con LH respecto a los que fueron alimentados con PL (Wang *et al.*, 2003). Estos autores atribuyen las diferencias al mayor contenido de Sia y GG de la LH vs. PL, si bien en ningún caso indican datos precisos de la cantidad de Sia y GG que ingieren los lactantes.

Tram *et al.* (1997) evalúan la concentración de Sia en saliva de recién nacidos (5 ± 2 meses postparto) alimentados con LH o PL y observan que los recién nacidos alimentados con LH contienen, aproximadamente, el doble de Sia libre (16 vs. 8,2 mg/L), un 50% más de Sia total (47,3 vs. 32,2 mg/L) y un 30% más de Sia ligado a otros componentes como oligosacáridos, glicoproteínas y GG (31,5 vs. 24,3 mg/L), en comparación a los alimentados con PL.

La resistencia de Sia a la digestión gastrointestinal unido a oligosacáridos es controvertida. Si bien en lactantes sanos se ha determinado que los oligosacáridos

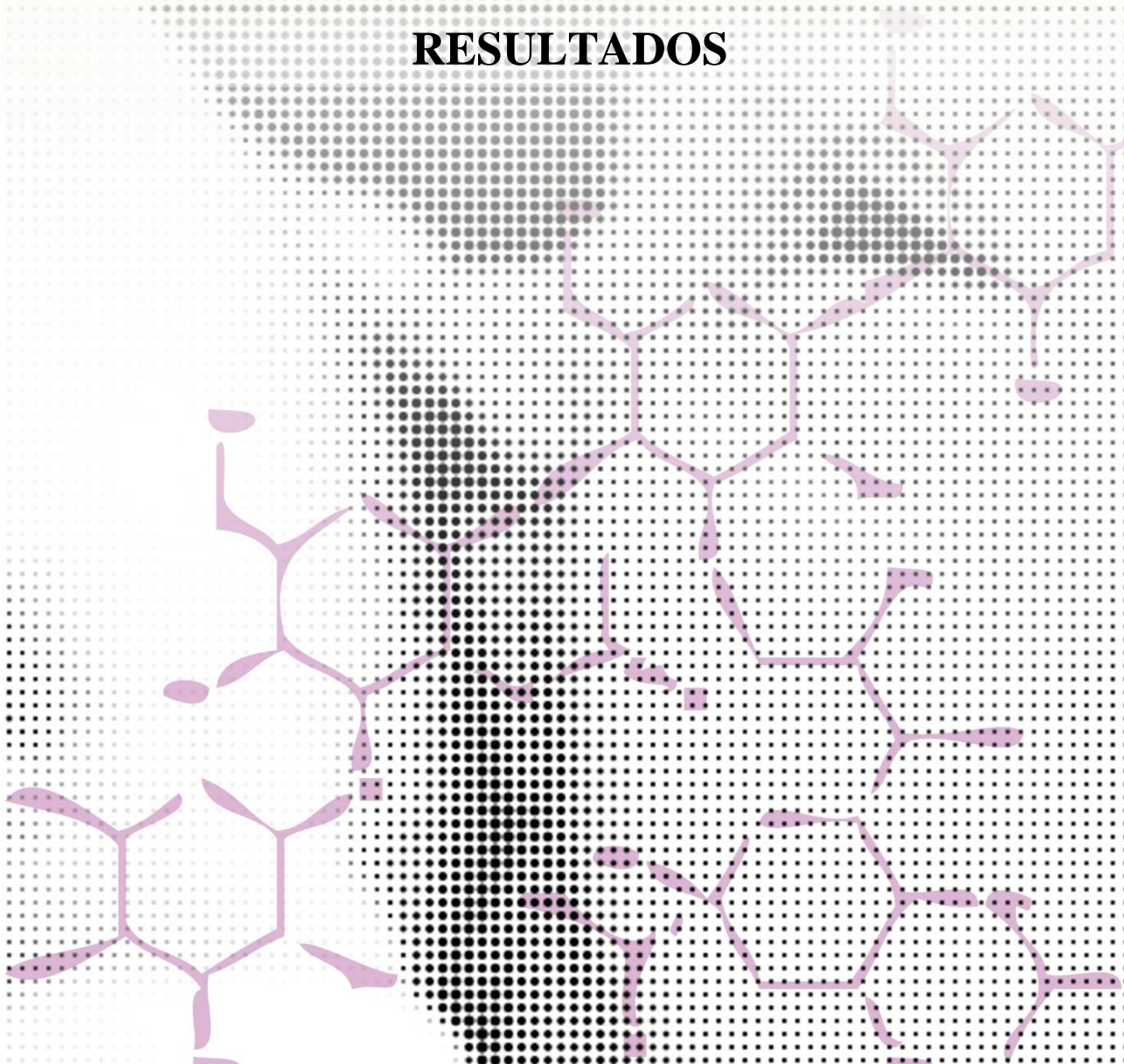
resisten la digestión gastrointestinal y llegan a colon donde son fermentados (Brand-Miller *et al.*, 1998), algunos autores detectan Sia libre procedente de oligosacáridos en heces y orina de lactantes. McVeagh & Miller (1997) observan, en heces de lactantes, que el Sia es liberado de los oligosacáridos a los que está unido conforme avanza la maduración del intestino, aumentando el Sia libre. Newburg (1999) observa, en lactantes alimentados con LH, que los oligosacáridos (conteniendo la mayoría Sia) llegan a heces en alta cantidad (32000 nmol/mL) (incluso 10 veces más que el contenido de la LH) pero también pueden ser absorbidos intestinalmente, siendo detectados en orina en baja cantidad (36 nmol/mL). Al comparar lo que llega a orina (absorbido intestinalmente) entre los lactantes alimentados con LH y PL, observan que los lactantes alimentados con LH absorberán mayor cantidad que los alimentados con PL (36 vs. 4 nmol/g).

Son escasos los estudios que evalúan la influencia de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre el Sia. Engfer *et al.* (2000) aplican una digestión a oligosacáridos ácidos y neutros extraídos de LH, utilizando preparados enzimáticos (tras aspirado a nivel duodenal) de pancreas humano (con actividad maltasa) y porcino (con actividad α -amilasa) y membrana intestinal del borde en cepillo de procedencia humana y porcina. Concluyen que el Sia no llega a liberarse de los oligosacáridos de la LH, incluso tras 10 horas de tratamiento, ya que solo se hidroliza un 3%. Por lo tanto, la mayoría de oligosacáridos unidos a Sia llegarán al intestino grueso donde son metabolizados por la microbiota.

Solo se conoce un estudio de aplicación de una digestión gastrointestinal simulada en dos etapas (gástrica e intestinal) a LH y preparados destinados a la alimentación infantil (PL y preparado de continuación). Se observa una disminución del Sia soluble mayoritariamente en la etapa gástrica, sin diferencias estadísticamente significativas con el contenido de Sia presente en la FB (fase intestinal) (valor medio, 144 vs. 148 mg/L). La mayor BA corresponde a la LH (87%), seguida por los PL (78%) y preparados de continuación (16%). No detectan ninguna forma de Sia (Neu5Ac y Neu5Gc) en la fracción no soluble, por tanto,

concluyen que el descenso debe estar relacionado con la degradación de este compuesto (Lacomba *et al.*, 2011b). Los autores atribuyen esta pérdida a la inestabilidad del Sia que en medio ácido podría formar un hemiacetal. Es conocido que un tratamiento con ácidos produce las pérdidas de Sia, siendo mayores con HCl que con H₂SO₄ (Svennerholm, 1958).

RESULTADOS



En la Figura 18 se muestra un esquema del diseño experimental y en la Figura 19 el desarrollo del mismo relacionado con la difusión los resultados.

Figura 18. Esquema del diseño experimental.

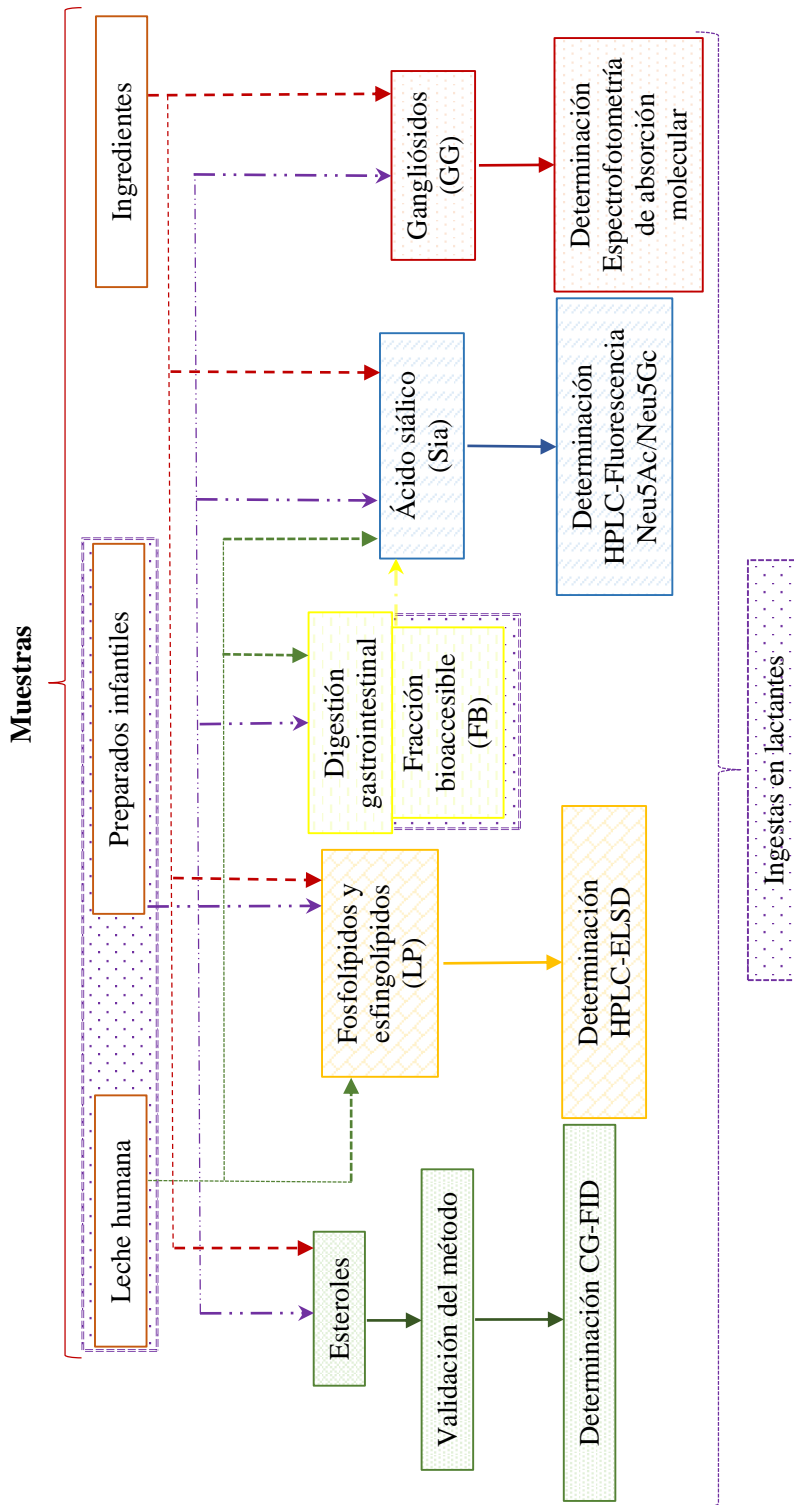
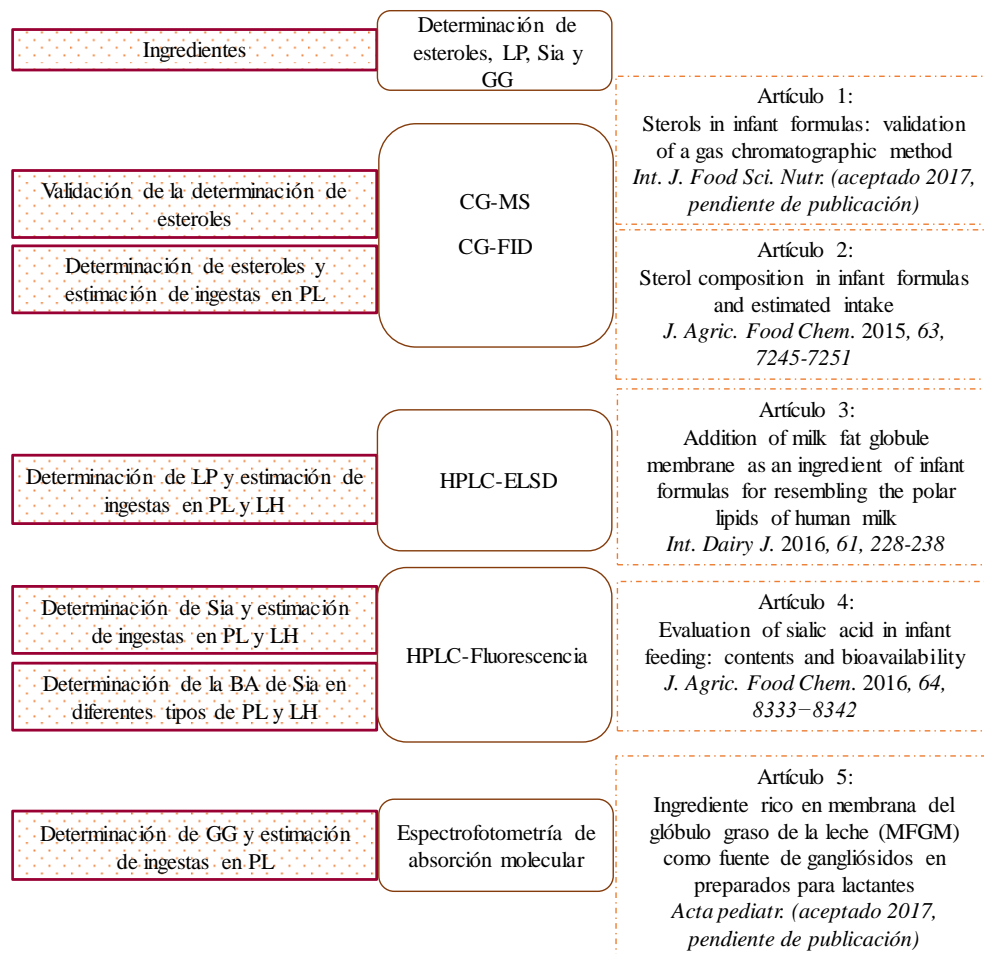


Figura 19. Desarrollo del diseño experimental. Relación con resultados.



1.- Ingredientes de posible utilización en la elaboración de preparados para lactantes

Se analizan los compuestos bioactivos objeto de estudio (colesterol, EV, LP, Sia y GG) en varios ingredientes de origen proteico y lipídico (mazada, concentrado de proteína sérica enriquecida en MFGM (MFGM-1 y MFGM-2), concentrado de LP, nata, β -suero), algunos de ellos utilizados en la elaboración de los PL evaluados en esta tesis. Para ello, se aplican las correspondientes metodologías indicada en el Anexo II (A-D). Se evalúan las diferencias entre los contenidos de los compuestos estudiados mediante un ANOVA ($p < 0,05$) y test Tukey HSD.

Descripción de los ingredientes:

Destacar que la mayoría de los PL analizados incorporan en su composición estos ingredientes, en cantidades que la empresa elaboradora no ha proporcionado. Este hecho se refleja en las publicaciones sobre los compuestos bioactivos que ha generado esta tesis. Por decisión de la empresa, la composición de los preparados debe permanecer confidencial.

En la Tabla 17 se muestra, el estado físico (sólido o líquido) y la composición de los diferentes ingredientes estudiados, proporcionada por el fabricante.

Tabla 17. Composición de posibles ingredientes a utilizar en preparados para lactantes (g/100g).

	Agua	Proteínas	Grasa
Ingredientes sólidos (en polvo)			
Mazada ^a	-	-	8,8
MFGM-1 ^b	5,73	69,13	14,28
MFGM-2 ^b	5	72	18
Concentrado de LP	4,33	50,82	26,47
Ingredientes líquidos			
Nata-1 ^c	53,02	2,23	42
Nata-2 ^d	58	1,85	36
β -suero	91,12	2,59	0,89

^aConcentrado de suero de mantequilla. ^bConcentrado de proteína sérica enriquecida en MFGM. ^cNata de procedencia sueca. ^dNata de procedencia española. LP: lípidos polares; MFGM: membrana del glóbulo graso de la leche.

Los ingredientes líquidos se liofilizan, para poder comparar los contenidos de estos compuestos bioactivos en los diferentes ingredientes.

◆ **Esteroles**

En la Tabla 18 se muestra el contenido total e individual de esteroles animales: colesterol y uno de sus precursores (latosterol), así como el de EV (campesterol, β -sitosterol) presentes en los diferentes ingredientes. El contenido de esteroles animales oscila de 46,25 a 293,27 mg/100 g, siendo el colesterol el mayor esteroide de origen animal. Este esteroide representa del 96 al 98% del total de los esteroles. Existen diferencias significativas en el contenido de colesterol entre los diferentes ingredientes ($p < 0,05$) y el orden de contenidos de mayor a menor es MFGM-1 > MFGM-2 > nata-2 > nata-1 > concentrado de LP \approx β -suero > mazada.

Los datos de colesterol indicados en bibliografía para este tipo de ingredientes son escasos. En los ingredientes de MFGM estudiados, los contenidos de colesterol (263,56-288,77 mg/100 g o 1816-1934 mg/100 g grasa) difieren de los pocos datos proporcionados en bibliografía (411 mg/100 g grasa) (Bracco *et al.*, 1972), (2000 mg/100 g de materia seca) (Dewettinck *et al.*, 2008). El colesterol representa del 94 al 96% de los esteroles totales (Bracco *et al.*, 1972; Fauquant *et al.*, 2007), porcentaje similar al observado en nuestro estudio. En relación a las natas, los contenidos de colesterol de este trabajo (47,60-55,72 mg/100 mL o 56,67-58,04 mg/100 g nata líquida) son menores (111,4-123,4 mg/100 mL) (Oles *et al.*, 1990; Oh *et al.*, 2001) o del orden (12,2-76,9 mg/100 g) (Elling *et al.*, 1996; Piironen *et al.*, 2002) de lo indicado en otros estudios. En las natas analizadas, se observa una relación directa entre el contenido del colesterol y de grasa, hecho mencionado previamente en la bibliografía (Piironen *et al.*, 2002).

La mazada y β -suero son los ingredientes con menores contenidos de colesterol y estas cantidades (ver Tabla 18) son mayores que las proporcionadas por Elling *et al.* (1996) (14 y 31 mg/100 g para mazada y β -suero, respectivamente).

Tabla 18. Contenidos y porcentajes relativos de esteroides en ingredientes.

	Colesterol	Latosterol	Esteroides animales	Campesterol	β-Sitosterol	Esteroides vegetales	Esteroides totales
Ingredientes en polvo (mg/100g)							
Mazada	45,46 \pm 1,13 ^a (94,79 \pm 1,38)	0,79 \pm 0,03 ^a (1,65 \pm 0,09)	46,25 \pm 1,13 ^a (95,77 \pm 1,43)	0,12 \pm 0,07 ^a (0,24 \pm 0,19)	1,61 \pm 0,72 ^{a,b} (3,33 \pm 1,36)	1,73 \pm 0,76 ^a (4,23 \pm 1,43)	47,98 \pm 1,86 ^a
MFGM-1	288,77 \pm 2,25 ^b (97,86 \pm 0,06)	4,49 \pm 0,20 ^b (1,52 \pm 0,07)	293,27 \pm 2,15 ^b (99,39 \pm 0,01)	1,10 \pm 0,04 ^b (0,37 \pm 0,01)	0,71 \pm 0,02 ^{a,b,c} (0,24 \pm 0,01)	1,81 \pm 0,04 ^a (0,61 \pm 0,01)	295,08 \pm 2,19 ^b
MFGM-2	263,56 \pm 3,26 ^c (97,60 \pm 0,07)	4,97 \pm 0,15 ^c (1,84 \pm 0,03)	268,53 \pm 3,41 ^c (99,39 \pm 0,09)	1,26 \pm 0,03 ^b (0,47 \pm 0,02)	0,37 \pm 0,04 ^{b,c} (0,14 \pm 0,01)	1,51 \pm 0,22 ^a (0,61 \pm 0,09)	270,03 \pm 3,35 ^c
Concentrado LP	84,96 \pm 2,09 ^d (95,78 \pm 1,52)	1,95 \pm 0,08 ^d (2,20 \pm 0,01)	86,90 \pm 2,16 ^d (97,12 \pm 1,52)	0,38 \pm 0,12 ^c (0,43 \pm 0,12)	2,15 \pm 0,22 ^a (2,39 \pm 0,30)	1,82 \pm 1,37 ^a (2,88 \pm 1,52)	88,72 \pm 3,13 ^d
Ingredientes líquidos (mg/100 mL)							
Nata-1	55,72 \pm 0,91 *122,46 \pm 2,00 ^e (97,89 \pm 0,18)	1,03 \pm 0,04 *2,26 \pm 0,09 ^{d,e} (1,81 \pm 0,10)	56,74 \pm 0,88 *124,72 \pm 1,93 ^e (99,55 \pm 0,26)	0,17 \pm 0,00 *0,37 \pm 0,00 ^{c,d} (0,30 \pm 0,00)	0,09 \pm 0,01 *0,20 \pm 0,02 ^c (0,13 \pm 0,05)	2,60 \pm 0,07 *0,57 \pm 0,01 ^a (0,45 \pm 0,22)	56,92 \pm 1,03 *125,10 \pm 2,26 ^e
Nata-2	47,60 \pm 2,46 *133,16 \pm 6,89 ^f (97,91 \pm 0,08)	0,83 \pm 0,03 *2,32 \pm 0,08 ^e (1,71 \pm 0,07)	48,43 \pm 2,48 *135,48 \pm 6,94 ^f (99,57 \pm 0,15)	0,09 \pm 0,04 *0,26 \pm 0,10 ^{a,c,d} (0,20 \pm 0,09)	0,14 \pm 0,10 *0,39 \pm 0,28 ^{b,c} (0,28 \pm 0,20)	1,88 \pm 0,77 *0,53 \pm 0,22 ^a (0,43 \pm 0,15)	48,61 \pm 2,52 *136,01 \pm 7,05 ^f
β -suero	6,91 \pm 0,08 *78,65 \pm 0,87 ^d (96,72 \pm 1,55)	0,12 \pm 0,01 *1,42 \pm 0,10 ^f (1,74 \pm 0,10)	7,03 \pm 0,08 *80,07 \pm 0,97 ^d (97,69 \pm 1,59)	0,01 \pm 0,00 *0,14 \pm 0,03 ^{a,d} (0,17 \pm 0,04)	0,15 \pm 0,08 *1,76 \pm 0,95 ^{a,b} (2,15 \pm 1,17)	1,67 \pm 0,86 *1,90 \pm 0,98 ^a (2,31 \pm 1,59)	7,14 \pm 0,12 *81,34 \pm 1,33 ^d

Resultados expresados como media \pm desviación estándar (n = 3). LP: lípidos polares; MFGM: membrana del glóbulo graso de la leche. *mg/100g de liofilizado. En paréntesis se indican los porcentajes relativos. Diferente letra en la misma columna, indica diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los ingredientes.

El resto de esteroides determinados en estos ingredientes se encuentran en cantidades trazas. La cantidad de latosterol (0,79-4,97 mg/100 g) es directamente proporcional al contenido de colesterol, algo que es coherente ya que se trata de uno de sus precursores. No existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los contenidos de EV de los ingredientes estudiados, si bien no todas presentan igual relación de EV. En la mazada, el concentrado de LP y el β -suero predomina el β -sitosterol, mientras que en la MFGM-1, MFGM-2 y la nata-1 el EV predominante es el campesterol, siendo sus contenidos semejantes en la nata-2. Además, el β -sitosterol presenta mayores contenidos cuando la cantidad de colesterol es menor. Se desconoce el origen de esta variabilidad, si bien, puede ser debida a la procedencia de la leche. Los EV (campesterol y β -sitosterol) representan menos del 4,5% del total de esteroides, una cantidad despreciable en relación a lo que aporta el colesterol. Los porcentajes relativos de EV más bajos corresponden a natas (0,4%) y MFGM (0,6%), valores inferiores a los indicados por Fauquant *et al.* (2007) para MFGM (4,4-5,9%).

♦ Lípidos polares

En la Tabla 19 se muestra el contenido graso y perfil de lípidos neutros y polares de los diferentes ingredientes analizados. El perfil lipídico se ha realizado durante una estancia breve en el grupo de lípidos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-CSIC/UAM) de Madrid, dirigido por el Dr. F. Javier Fontecha Alonso. El objetivo de esta estancia fue la determinación cuantitativa de lípidos polares en ingredientes, pero una vez allí, se decidió también determinar porcentualmente el perfil lipídico de dichas muestras, el cual por falta de tiempo no pudo ser completado en todos los ingredientes. Este hecho queda reflejado en las natas, al determinar solamente el perfil lipídico de una de ellas (ver Tabla 19). En la Tabla 20 se muestran los contenidos de fosfolípidos (PE, PS, PI y PC) y SM de los diferentes ingredientes estudiados, así como los porcentajes que representan cada uno en la fracción de LP totales.

Tabla 19. Contenido graso (g/100g) y porcentaje relativo de los lípidos en los ingredientes.

	Ingredientes sólidos				Ingredientes líquidos		
	Mazada	MFGM-1	MFGM-2	Concentrado de LP	Nata-1	Nata-2	β-suero
Grasa	g grasa/100 g				g grasa/100 mL		
	7,95 ± 0,32	14,14 ± 0,08	14,54 ± 1,32	25,68 ± 0,49	42,09 ± 0,97 *92,51 ± 2,13	34,37 ± 3,78 *96,15 ± 10,56	1,27 ± 0 *14,42 ± 0
Lípidos neutros (% de los lípidos totales)							
Esteres de colesterol	n.d	0,19 ± 0,00	0,24 ± 0,01	n.d	n.d	-	n.d
TAG	63,30 ± 2,18	56,02 ± 8,74	61,51 ± 5,02	57,97 ± 5,25	98,18 ± 0,00	-	40,98 ± 3,21
DAG	2,76 ± 0,03	1,94 ± 0,07	3,44 ± 0,06	0,53 ± 0,04	0,89 ± 0,00	-	0,98 ± 0,02
AG libres + colesterol	0,30 ± 0,02	1,59 ± 0,19	1,70 ± 0,12	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00	-	0,13 ± 0,01
MA	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,00	n.d	-	0,04 ± 0,00
Total	66,39 ± 2,12	59,77 ± 8,49	66,93 ± 4,87	58,56 ± 5,29	99,10 ± 0,00	-	42,13 ± 3,24
Lípidos polares (% de los lípidos totales)							
GluCer	0,08 ± 0,00	0,14 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,01	n.d	-	0,10 ± 0,00
LacCer	0,20 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,55 ± 0,04	0,78 ± 0,00	n.d	-	0,51 ± 0,01
Fosfolípidos + SM	33,34 ± 2,13	39,72 ± 8,44	32,35 ± 4,88	40,46 ± 5,29	0,90 ± 0,02	0,89 ± 0,08	56,92 ± 3,82
Total	33,61 ± 2,12	40,23 ± 8,49	33,07 ± 4,87	41,44 ± 5,29	0,90 ± 0,02	0,89 ± 0,08	57,53 ± 3,83

Resultado expresado como media ± desviación estándar (n = 3). AG: ácidos grasos; DAG: diacilgliceridos; Glucer: glucosilceramida; Lacer: lactosilceramida; LP: lípidos polares; MA: monoacilgliceridos; MFGM: membrana del glóbulo graso de la leche; n.d: no detectado; SM: esfingomielina; TAG: triacilgliceridos. *g grasa/100g de liofilizado.

Tabla 20. Contenido de lípidos polares (fosfolípidos y esfingolípidos) y porcentajes relativos en ingredientes.

	PE	PI	PS	PC	SM	Total
Ingredientes en polvo (mg/100 g)						
Mazada	1116,74 ± 94,75 ^a _w (45,14 ± 1,15)	112,36 ± 4,81 ^a _x (4,55 ± 0,13)	200,40 ± 12,08 ^a _{x,y} (8,11 ± 0,10)	284,97 ± 21,39 ^a _{b,y} (11,52 ± 0,17)	758,45 ± 56,83 ^a _z (30,68 ± 1,21)	2472,93 ± 178,45 ^{a,b}
MFGM-1	2175,81 ± 514,7 ^b _w (48,73 ± 0,49)	126,58 ± 12,82 ^a _x (2,91 ± 0,46)	155,96 ± 17,49 ^a _x (3,57 ± 0,52)	397,74 ± 75,87 ^b _{c,x} (8,98 ± 0,51)	1612,12 ± 459,31 ^b _w (35,81 ± 1,78)	4468,20 ± 1077,03 ^{b,c}
MFGM-2	2370,78 ± 297,31 ^b _w (49,27 ± 1,24)	145,24 ± 13,30 ^a _x (3,03 ± 0,30)	162,06 ± 16,21 ^a _x (3,38 ± 0,31)	466,15 ± 49,15 ^c _x (9,70 ± 0,11)	1660,55 ± 136,52 ^b _y (34,61 ± 0,71)	4804,78 ± 494,77 ^c
Concentrado de LP	5940,10 ± 636,13 ^c _w (48,15 ± 1,24)	396,66 ± 20,65 ^b _x (3,23 ± 0,21)	790,07 ± 67,74 ^b _x (6,41 ± 0,17)	1230,39 ± 104,07 ^d _x (9,99 ± 0,27)	3986,97 ± 567,83 ^c _y (32,22 ± 1,53)	12344,20 ± 1357,91 ^d
Ingredientes líquidos (mg/100 mL)						
Nata-1	125,18 ± 10,87 *275,18 ± 23,72 ^a _w (32,11 ± 1,43)	54,43 ± 1,32 *119,66 ± 2,82 ^a _x (13,99 ± 0,33)	57,18 ± 1,47 *125,69 ± 3,16 ^a _x (14,69 ± 0,33)	62,94 ± 1,76 *138,36 ± 3,80 ^a _x (16,17 ± 0,29)	89,60 ± 4,66 *196,97 ± 10,26 ^a _y (23,02 ± 0,96)	389,34 ± 17,78 *855,86 ± 38,64 ^a
Nata-2	92,79 ± 6,59 *259,42 ± 18,32 ^a _w (30,47 ± 0,63)	44,21 ± 4,74 *123,61 ± 13,21 ^a _x (14,48 ± 0,35)	46,72 ± 4,89 *130,63 ± 13,6 ^a _x (15,31 ± 0,33)	50,49 ± 4,92 *141,18 ± 13,70 ^a _x (16,55 ± 0,21)	70,66 ± 5,59 *197,56 ± 15,56 ^a _y (23,19 ± 0,27)	304,87 ± 26,56 *852,39 ± 73,95 ^a
β-suero	403,05 ± 29,32 *4408,94 ± 319,91 ^d _w (50,01 ± 0,43)	59,48 ± 1,16 *650,70 ± 12,46 ^c _x (7,40 ± 0,35)	68,60 ± 1,93 *750,45 ± 21,10 ^b _x (8,53 ± 0,32)	91,50 ± 4,24 *1000,92 ± 46,32 ^c _x (11,37 ± 0,21)	183,08 ± 15,41 *2076,08 ± 174,722 ^b _y (22,70 ± 0,46)	805,72 ± 52,05 *8887,09 ± 573,89 ^e

Resultado expresado como media ± desviación estándar (n = 3). LP: lípidos polares; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; PC: fosfatidilcolina; SM: esfingomielina; MFGM: membrana del glóbulo graso de la leche; n.d: no detectado. *mg/100g de liofilizado. En paréntesis se indican los porcentajes relativos.

Para un mismo lípido polar, diferente letra superíndice (a-d) en la misma columna indica diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los ingredientes. Test Tukey HSD.

Para un mismo ingrediente, diferente letra subíndice (w-z) en la misma fila indica diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre cada lípido polar. Test Tukey HSD.

Los ingredientes con mayores contenidos de grasa (ver Tabla 19) son las natas, seguidos del concentrado de LP > MFGM-1 \approx MFGM-2 \approx β -suero > mazada. Este mayor contenido de grasa en las natas (g/100 g) respecto a la mazada, también es indicado por otros autores (39,3-42,5 vs. 0,45-0,54) (Gassi *et al.*, 2008), (18-22 vs. 0,2) (Avalli & Contarini, 2005). El proceso de obtención (calentamiento, homogenización, aireación, purificación, agitación, etc.) influye en el contenido de grasa de los diferentes ingredientes, así como para un mismo ingrediente. La mazada obtenida a partir de una nata pasteurizada puede contener el doble de lípidos que la obtenida a partir de una nata cruda (7,86-8,29 vs. 19,4-20,2 g/100g) (Morin *et al.*, 2007a).

El perfil lipídico (neutros vs. polares) de estos ingredientes muestra, generalmente, que los lípidos neutros (42-99%) son los mayoritarios (ver Tabla 19), representando los TAG los mayores contenidos (41-98%), seguidos de DAG > AG libres + colesterol > ésteres de colesterol \geq MAG. La nata es el ingrediente con mayor contenido de lípidos neutro y a su vez, de TAG (99%) representando el resto de lípidos neutros (DAG y AG libres) un porcentaje < 1%. Los LP (0,9-57,5%) están representados básicamente por fosfolípidos y SM, correspondiendo cantidades trazas a la GluCer y LacCer (ver Tabla 19). El β -suero es el ingrediente con mayor porcentaje de LP, en proporción incluso superior a la de los lípidos neutros (57,5 vs. 42,1%). Este hecho se observa solo en este ingrediente, ya que el resto presentan contenidos de lípidos neutros > LP, lo cual puede atribuirse al procesado del β -suero que produce eliminación de TAG y liberación de altas porciones de la MFGM a dicho ingrediente.

Fosfolípidos y esfingolípidos

Los LP están comprendidos entre 852,39-12344,20 mg/100 g (ver Tabla 20) y se observa que el ingrediente que mayor cantidad de LP presenta es el concentrado de LP, seguido del β -suero > MFGM-2 \approx MFGM-1 \geq mazada \geq nata-2 \approx nata-1. El concentrado de LP presenta contenidos de LP menores al indicado por Gassi *et al.* (2016) (31000 mg/100g) o al presente en uno de los ingredientes de Lacprodan[®]

conocido y patentado (PL-20: 16000 mg/100 g). En el β -suero, los contenidos de LP son del orden de lo observado en bibliografía (880-13670 mg/100 g) (Rombaut *et al.*, 2006; Britten *et al.*, 2008; Dewettinck *et al.*, 2008; Guan *et al.*, 2015) y mayores que los proporcionados por la mazada, al igual que observan otros autores (β -suero vs. mazada: 880-1250 vs. 92-160) (Rombaut *et al.*, 2006; Britten *et al.*, 2008). Estos mayores contenidos (3,6 veces más), podrían ser justificados por su proceso de fabricación en el cual, todos los compuestos de la MFGM, que contienen LP, en su mayoría son liberados en esta fase acuosa (Britten *et al.*, 2008). La mazada presenta contenidos (2472,93 mg/100 g o 33335,14 mg/100 g grasa) superiores a los observados en la literatura (90-2030 mg/100 g) (Rombaut *et al.*, 2006; Morin *et al.*, 2007a; Britten *et al.*, 2008; Dewettinck *et al.*, 2008; Gassi *et al.*, 2008), (4485-12400 mg/100 g grasa) (Avalli & Contarini, 2005; Costa *et al.*, 2010).

El contenido de LP en los dos ingredientes de MFGM no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (ver Tabla 20), hecho que también ocurre en las dos natas analizadas, pese a ser de diferente procedencia. Sin embargo, diferentes condiciones en su procesado pueden proporcionar contenidos variables de LP. El hecho de comenzar el proceso de elaboración de la MFGM a partir de una nata pasteurizada, en lugar de una nata en polvo reconstituida, hace que los LP de la MFGM sean un 50% menores. Otro aspecto que puede influir en el contenido de LP es la temperatura utilizada en el proceso de microfiltración para aislar la MFGM (Morin *et al.*, 2007a). En relación a las natas, los contenidos de LP pueden variar en función de si son elaborados mediante un cremado natural o por centrifugación (8,60 vs. 5,32 mg/g grasa, respectivamente). Esto puede ser explicado por la incorporación, durante el cremado natural, de un mayor número de glóbulos de pequeño tamaño que proporcionan mayor cantidad de MFGM y, como consecuencia, una mayor concentración de LP (Avalli & Contarini, 2005). Además, si la nata se pasteuriza su contenido puede disminuir de 0,19 a 0,14 g/100 g (Dewettinck *et al.*, 2008). Los contenidos de LP en los ingredientes de MFGM (ver Tabla 20) son del orden de lo indicado en bibliografía (4430-4750 mg/100 g) (Morin *et al.*, 2007a), al igual que ocurre en las natas (852,39-855,86 mg/100 g o 888,17-924,94 mg/100 g de grasa) al

comparar con otros autores (190-1200 mg/100 g) (Dewettinck *et al.*, 2008; Gassi *et al.*, 2008), (860-5650 mg/100 g de grasa) (Avalli & Contarini, 2005; Costa *et al.*, 2010).

El perfil de LP en los ingredientes, de mayor a menor, es PE (31-50%) > SM (23-36%) > PC (9-17%) > PS (3-15%) > PI (3-15%), no existiendo, generalmente, diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los tres LP minoritarios (PC, PS y PI) (Tabla 20). No existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los contenidos de los lípidos mayoritarios (PE y SM) en el ingrediente MFGM-1. Señalar que los ingredientes con mayor contenido de SM y PC (LP con colina) son: el concentrado de LP, β -suero y las MFGM.

Se observan discrepancias entre estos resultados y los de la bibliografía (ver Tabla 10 de antecedentes bibliográficos). Algunos autores muestran que la PE es el LP mayoritario seguido de la PC en la MFGM (Fong *et al.*, 2007; Fauquant *et al.*, 2007; Sánchez-Juanes *et al.*, 2009a), al igual que ocurre en algunas natas (Rombaut *et al.*, 2005; Avalli & Contarini, 2005; Britten *et al.*, 2008; MacKenzie *et al.*, 2009); mientras que en MFGM y mazadas en polvo los LP mayoritarios son la PC y SM, seguido de la PE (Morin *et al.*, 2007a). Un perfil obtenido también para concentrado de LP ($SM \geq PC > PE > PS > PI$) (Gassi *et al.*, 2016) o natas y mazadas (Costa *et al.*, 2010; Gallier *et al.*, 2010). Sin embargo, hay autores que observan un perfil de LP similar al del presente trabajo en natas (Avalli & Contarini, 2005) y β -suero (Britten *et al.*, 2008).

◆ **Ácido siálico**

En la Tabla 21 se muestran los contenidos de Neu5Ac, Neu5Gc y Sia total (Neu5Ac + Neu5Gc) en los ingredientes estudiados, los cuales oscilan entre 53,56-1782,03; 2,21-63,02; 55,86-1845,05 mg/100 g, respectivamente. Se observa que el ingrediente que mayores contenidos de Sia total presenta es el MFGM-2, seguido del MFGM-1 > concentrado de LP > β -suero > mazada > nata-1 \approx nata-2, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre todos ellos, con excepción de las natas. Las MFGM contienen alrededor de 3 veces más de Sia que el

concentrado de LP y entre 28-33 veces más de Sia que las natas. Los bajos contenidos de Sia en las natas pueden ser debidos a que este compuesto está unido en su mayoría a proteínas y oligosacáridos, quedando una proporción muy pequeña unida a lípidos (< 3%) (Wang, 2009), fracción que pasa a formar parte de la nata en su proceso de fabricación.

Tabla 21. Contenido y porcentaje relativo de ácido siálico en ingredientes.

	Neu5Gc	Neu5Ac	Total
Ingredientes en polvo (mg/100g)			
Mazada	7,05 ± 1,30 ^a (2,40 ± 0,61)	289,47 ± 21,24 ^a (97,60 ± 0,61)	296,53 ± 20,05 ^a
MFGM-1	45,07 ± 0,42 ^b (2,58 ± 0,01)	1704,47 ± 19,37 ^b (97,42 ± 0,01)	1749,54 ± 19,78 ^b
MFGM-2	63,02 ± 1,29 ^c (3,42 ± 0,01)	1782,03 ± 33,68 ^c (96,58 ± 0,01)	1845,05 ± 34,96 ^c
Concentrado-LP	10,33 ± 0,52 ^d (1,66 ± 0,02)	610,50 ± 32,45 ^d (98,34 ± 0,02)	620,83 ± 32,96 ^d
Ingredientes líquidos (mg/100 mL)			
Nata-1	1,00 ± 0,01 *2,21 ± 0,03 ^e (3,59 ± 0,15)	27,02 ± 0,84 *59,39 ± 1,84 ^e (96,41 ± 0,15)	28,02 ± 0,83 *61,60 ± 1,82 ^e
Nata-2	0,82 ± 0,01 *2,30 ± 0,02 ^e (4,12 ± 0,19)	19,15 ± 1,10 *53,56 ± 3,06 ^e (95,88 ± 0,19)	19,97 ± 1,10 *55,86 ± 3,08 ^e
β-suero	0,71 ± 0,05 *8,02 ± 0,54 ^a (1,93 ± 0,01)	35,84 ± 2,43 *408,01 ± 27,63 ^f (98,07±0,01)	36,54 ± 2,48 *416,04 ± 28,18 ^f

Resultado expresado como media ± desviación estándar (n = 3). LP: lípidos polares; MFGM: membrana del glóbulo graso de la leche *mg/100 g liofilizado. En paréntesis se indican los porcentajes relativos. Total: Neu5Ac+Neu5Gc.

Diferente letra superíndice indica diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los ingredientes. Test Tukey HSD.

El Neu5Ac es el Sia mayoritario en todos los ingredientes, representando más del 95% del Sia total (ver Tabla 21) y su abundancia en los ingredientes sigue el mismo orden que en el Sia total, al igual que el Neu5Gc que está presente en pequeñas cantidades. Este mayor contenido de Neu5Ac respecto al Neu5Gc puede ser debido al tipo de leche utilizada en la elaboración, ya que la leche de vaca proporciona mayores contenidos de Neu5Ac que la leche de cabra (97,3 vs. 43,2%) (Spichtig *et al.*, 2010)

Son escasos los datos de Sia en la bibliografía para este tipo de ingredientes. Se trata de un compuesto que predomina más en ingredientes de base proteica, como son los concentrados del suero (ver Tabla 12 de antecedentes bibliográficos). Los contenidos de Sia en los ingredientes de MFGM con respecto al Lacprodan[®] MFGM-10 (patentado y comercializado por Arla Foods Ingredients) son semejantes (1749,54-1845,05 vs. ~2000 mg/100 g).

◆ Gangliósidos

En la Tabla 22 se muestran los contenidos totales de GG analizados en este trabajo, expresados como ASUL y como mg de GG. Este cambio se realiza con el propósito de poder comparar estos resultados con otros autores que determinan directamente los GG, mediante técnicas de masas.

Table 22. Contenido de gangliósidos totales (ASUL) en ingredientes.

	mg ASUL/100g	mg GG/100g [#]
Ingredientes sólidos		
Mazada	2,88 ± 0,18 ^a	7,35 ± 0,45
MFGM-1	56,76 ± 2,41 ^b	144,85 ± 6,15
MFGM-2	31,61 ± 7,16 ^c	80,66 ± 18,26
Concentrado-LP	34,02 ± 11,37 ^c	86,82 ± 29,02
Ingredientes líquidos		
Nata-1	0,93 ± 0,06	5,21 ± 0,31
	*2,04 ± 0,12 ^a	
Nata-2	0,68 ± 0,36	4,89 ± 2,58
	*1,92 ± 1,01 ^a	
β-suero	2,04 ± 0,36	58,21 ± 10,43
	*22,81 ± 4,09 ^c	

Resultados expresados como la media ± desviación estándar (n = 4). *mg/100 g de liofilizado. [#]Convertido a mg de GG utilizando el peso molecular del Sia (309 g/mol) y del GG mayoritario en los PL: GD₃ (1577 g/mol).

Diferente letra en la misma columna indica diferencia estadísticamente significativa (p < 0,05) entre estos ingredientes. Tukey's HSD test.

El contenido total de GG oscila de 1,92 a 56,76 mg ASUL/100 g y se observa que el MFGM-1 presenta contenidos de GG significativamente mayores (p < 0,05) que el MFGM-2 ≈ concentrado de LP ≈ β-suero > mazada ≈ nata-1 ≈ nata-2. A pesar de presentar cantidades similares de grasa (ver Tabla 19), la MFGM-1 tiene 1,8 veces más contenido de GG que la MFGM-2. Este hecho puede ser debido al proceso de

extracción, separación y aislamiento de la MFGM, en su elaboración (Ross *et al.*, 2015).

Los ingredientes de MFGM contienen entre 1,4-2,4 y 11-20 veces más cantidad de GG totales que el β -suero y la mazada, respectivamente. Estos mayores contenidos de GG en el β -suero pueden ser debidos a que este ingrediente es enriquecido, en muchas ocasiones, con MFGM (Fong *et al.*, 2011) y la MFGM contiene el 90% de los GG de la leche (Keenan, 1974).

En general, los contenidos de GG en los ingredientes son inferiores a los indicados en bibliografía (ver Tabla 12 de antecedentes bibliográficos), excepto los presentes en la MFGM que son superiores a los de Sánchez-Juanes *et al.* (2009b) (0,113 mg ASUL/100g). Estas diferencias pueden ser atribuidas a la diferente composición y/o al tipo de enriquecimiento que pueden presentar los diversos ingredientes. Otro factor que puede influir, principalmente en la MFGM es el proceso de aislamiento y separación, mostrando bajos contenidos los extractos aislados directamente del glóbulo graso (Sánchez-Juanes *et al.*, 2009b) con respecto a los que son aislados y posteriormente purificados (~200 mg GG/100g, ingrediente Lacprodan[®] MFGM-10).

2.- Sterols in infant formulas: validation of a gas chromatographic method

Islam J.A. Hamdan¹, Lorena Claumarchirant¹, Guadalupe Garcia-Llatas,
Amparo Alegría, Maria Jesus Lagarda*

Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andres Estelles s/n, 46100 – Burjassot (Valencia), Spain.

¹Both authors have contributed equally and may be considered as first authors.

*To whom correspondence should be addressed (Telephone +34-963544909; Fax +34-963544954; E-mail: m.j.lagarda@uv.es)

International Journal of Food Science & Nutrition, 2017
(aceptado, pendiente de publicación)

Abstract

Sterols are components present in the fat fraction of infant formulas (IFs). Their characterization is therefore of interest, though there are no official reference methods for their analysis in these matrixes.

Aim: to validate a gas chromatographic method with flame ionization detection for the determination of animal (cholesterol and desmosterol) and plant sterols (brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and sitostanol) found in IFs.

All correlation coefficients obtained for the calibration curves of sterols studied were >0.99 . Limits of detection ($<1 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$) and quantification ($<4 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$) are suitable for sterols determination in IFs. The within-assay precision ranged from 1.6% to 8.8%, while the between-assay precision was $<10\%$ for most of sterols. Accuracy was satisfactory and was calculated by recovery assays (ranging 93-108%). The analytical parameters obtained showed the suitability of the proposed method for the determination of sterols in IFs.

Keywords: cholesterol, infant formula, plant sterols, method validation, gas chromatography.

Introduction

Infants preferably should be fed exclusively with human milk (HM) during the first 6 months of life, since it adapts to their needs and constitutes the ideal food for them. From the functional point of view, the influences of breastfeeding upon neuronal and cognitive development, and its effects in terms of the prevention of infectious and immunological diseases, are well known (WHO 2009).

At present, when breastfeeding is not possible, infant formulas (IFs) are used - the nutrient levels of which are generally modeled on the composition of HM, in an attempt to make them as similar as possible to HM.

Lipids in HM are found in the form of fat globules enveloped by a membrane containing different components such as cholesterol, phospholipids, glycolipids, other sterols and minor components – the composition of which is too complex to reproduce (Heid & Keenan 2005; Keenan & Patton 1995). In the formulation of bovine milk-based IFs, vegetable oils (coconut, soy, canola, high oleic safflower, high oleic sunflower and palm olein oils) replace partly fat from bovine milk in order to resembling the fatty acid pattern of HM (Long et al. 2013). However, other bioactive components such as sterols, phospholipids, and sialic acids differ in type and concentration with respect to HM. In this sense, the contents of plant sterols in IFs provided by the vegetable oils used in their manufacture are higher than in HM (which contains β -sitosterol: 0.02-0.20 mg/L, campesterol: 0.51 mg/L, stigmasterol: 0.03 mg/L, and avenasterol: 0.50 mg/L (Benoit et al., 2010; Laitinen et al., 2009)) - the mother's diet contributing only negligible amounts of such sterols. In the case of animal sterols, cholesterol is the most abundant sterol in mature HM (cholesterol: 46.30-283.00 mg/L, desmosterol: 4.90-33.30 mg/L, lathosterol: 0.42-8.90 mg/L, lanosterol: 0.20-0.98 mg/L, and squalene: 3.90-4.90 mg/L (Álvarez-Sala et al., 2015; Clark et al., 1983; Huisman et al. 1996; Kallio et al., 1989; Kamelska et al., 2013; Laitinen et al., 2009; Mellies *et al.*, 1979; Ramalho et al., 2011; Scopesi et al. 2002)), and is more abundant than in IFs.

In the few studies available on the profile of sterols in IF, the most abundant were found to be β -sitosterol (11-83 mg/L) and cholesterol (3-258 mg/L), followed by campesterol (7-32 mg/L), stigmasterol (3-12 mg/L), desmosterol (2.4-4.3 mg/L), brassicasterol (1-3 mg/L) and sitostanol (0.3-1.4 mg/L) (Claumarchirant et al. 2015; Huisman et al. 1996; Kamelska et al. 2011; Maduko & Park 2007; Ramalho et al. 2011; Scopesi et al. 2002; Zunin et al. 1998).

Although there are some international reference methods for analysis of the sterol fraction of animal and vegetable fats and oils using chromatography (ISO 12078:2006; ISO 12228-1:2014; IUPAC Method 2.401; IUPAC Method 2.403), so far no official reference methods have been developed particularly for the analysis of sterols present in IFs. To our knowledge, only two studies (Ahn et al. 2012; Jeong et al. 2012) (Table 1) have validated the determination of cholesterol in IFs by high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detector and gas chromatography (GC) with flame ionization detector (FID), respectively, with no reference to other sterols present in samples of this kind.

The present paper proposes the validation of a GC-FID method for the determination of animal and plant sterols present in bovine milk-based IFs. The developed methodology allows reliable quantification of sterols and can be used to assess more accurately the amounts and types of sterols present in IFs in comparison with HM. This is of interest, in view of the scarce information found in the literature in this respect. After validation, the sterol concentrations in seven IFs found on the European market have been determined applying this method.

Materials and methods

Reagents

Epicoprostanol (5β -cholestan- 3α -ol, $\geq 95\%$ purity) as internal standard (IS), β -sitosterol (5 -stigmasterol- 3β -ol, 98% purity), desmosterol ($5,24$ -cholestadien- 3β -ol, 84% purity), stigmasterol (stigmasta- $5,22$ -dien- 3β -ol, 95% purity), stigmastanol (β -sitostanol, 97.4% purity), cholesterol (5 -cholesten- 3β -ol, 99% purity), potassium hydroxide (KOH), butylated hydroxytoluene (BHT) (99% purity), and N,O-bis-

(trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane (BSTFA+1%TMCS) were purchased from Sigma–Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA). Campesterol (24 α -methyl-5-cholesten-3 β -ol, 98.6% purity), and brassicasterol (5,22-cholestadien-24 β -methyl-3 β -ol, 98.6% purity) were obtained from Steraloids Inc. (Newport, RI, USA).

Hexane was purchased from Scharlau Chemie, S.A. (Barcelona, Spain), and acetone, absolute ethanol, 2-propanol, chloroform, diethyl ether, methanol, sodium chloride, anhydrous sodium sulfate and potassium chloride (KCl) from Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, USA). Pyridine extra-dry was from Fluka (Buchs, Switzerland).

All standards used were of GC grade, and all reagents were of analytical grade. Millipore MilliQ deionized water (Millipore Ibérica S.A., Barcelona, Spain) was used.

The IS (epicoprostanol) was prepared with ethanol, and sterol standards were prepared with hexane:2-propanol (3:2, v/v).

Derivatizing reagent (BSTFA + 1% TMCS / pyridine) was prepared weekly at a ratio of 10:3 (v/v).

Samples

Seven powdered cow milk-based IFs marketed in the European Union: six starter IFs (IF-1 - IF-6) and one follow-up IF (IF-7) with different fat content and composition (Table 2), were used in this study. The IF-5 and IF-6 included whey enriched in milk fat globule membrane (MFGM) in its formulation. The samples were maintained in their original containers at 4°C until analysis. IFs were reconstituted according to the instructions of the manufacturer (see Table 2): in Milli-Q deionized water, thoroughly mixed and homogenized, and immediately analyzed.

Determination of sterols

Fat extraction was performed following to the procedure of Alemany-Costa et al. (2012). Briefly, 40 mL of chloroform:methanol (1:1, v/v) mixture containing 0.05% of BHT were added to 2 mL of reconstituted IF and homogenized with a Polytron homogenizer (PT 2000, Kinematica AC, Switzerland) for 3 min at 10800 rpm, and then taken to 60 °C in an oven during 20 min. After adding 20 mL of chloroform and mixing again with the Polytron, the sample was filtered through Whatman no. 2V, 125 mm (Buckinghamshire, UK). To the filtrate, 20 mL of KCl 1 M solution was added and refrigerated (4 °C) overnight. Then, after phase separation, the chloroform phase was concentrated in a rotary evaporator at 40°C and dried with nitrogen. Next, IS (20 µg of epicoprostanol) was added to the lipid fraction, and hot saponification (2.5 mL of KOH 2 N in ethanol (90%)) at 65 °C during 1 h) was performed. The unsaponifiable material was then extracted with diethyl ether and subjected to derivatization with BSTFA + 1% TMCS:pyridine (10:3, v/v) (García-Llatas et al. 2012). After dissolution in hexane of the trimethylsilyl ether (TMSE) derivatives, the sample was filtrated (syringe-driven Millex-FH filter unit, 1 mL, 0.45 µm Millipore, Milford, MA, USA) to remove residues of the derivatization, evaporated with nitrogen and dissolved again in 100 µL of hexane. One microliter was injected into a GC–tandem mass spectrometry system (GC-MS/MS, Trace GC-Ultra ITQ ion trap 900, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for identification purposes, and into a GC–FID (AutoSystem XL, Perkin-Elmer, Nortwalk, CT, USA) for quantification purposes. Both instruments were equipped with CP-Sil 8 low bleed/MS (50 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness) capillary columns (Chrompack-Varian, Middelburg, The Netherlands).

The chromatographic conditions employed were based on a previous work on serum sterol determination (García-Llatas et al. 2012). In GC-MS/MS, the carrier gas was hydrogen operating at a constant flow of 1 mL/min. The temperature of the injector port was 280 °C, and a split ratio of 1:10 was applied. The oven was initially programmed at 150 °C maintained during 3 min, heated to 280 °C at a rate of 30 °C/min, and kept during 28 min. It was then raised to 295 °C at a rate of 10 °C/min.

Finally, this temperature was maintained for 10 min. The transfer line temperature was 310 °C, the ion source temperature was 250 °C, the electron impact was -70 eV, and the scan range was 50-650 m/z. Identification of sterols was carried out by comparing their spectra with those of standards and the mass spectra library (NIST v.2). In GC-FID, hydrogen was also the carrier gas at a flow rate of 1.5 mL/min, the detector port was set at 300°C, and the rest of the conditions were similar to those of GC-MS/MS.

Sterols were quantified using calibration curves with commercialized sterol standards, which were derivatized and analyzed by GC-FID under the conditions previously described.

Method validation

The validation of the method was performed by studying the analytical parameters of selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision and accuracy, according to the guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH) (ICH, 2005). The sample IF-1 was used for this purpose.

Selectivity

The selectivity of method was evaluated qualitatively and quantitatively. The sterols in IF were identified (qualitative analysis) by comparing their spectra obtained by GC-MS with those of commercial standards and the mass spectra library (NIST v.2). Furthermore, the relative retention times of standards were compared with those obtained in IF by GC-FID. Moreover, an effect matrix study (quantitative analysis) was carried out to evaluate any interference from other compounds present in the matrix by the standard addition method applied to the reconstituted IF-1. One calibration curve for each sterol quantified with or without the addition of matrix was analyzed. The slopes of the regression equations were compared by a t-test ($p < 0.05$).

Linearity

The linearity was tested by the analysis of four standard concentration levels for brassicasterol, six standard concentration levels for stigmasterol, and sitostanol and seven standard concentration levels for cholesterol, desmosterol, campesterol, β -sitosterol, with addition of 20 μg of epicoprostanol as IS. The assayed concentrations (μg in each assay) included the corresponding contents in 2 mL of reconstituted IF. For the evaluation of the linearity of the calibration curves, a statistical analysis (two-tailed t-student test with $n-2$ degrees of freedom, where α is 0.05) was carried out. The concentration ranges for all analyzed sterols are shown in Table 3.

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

According with the American Chemical Society guidelines (MacDougall & Crummett 1980), LOD and LOQ (in μg /reconstituted sample) were calculated from three and ten times the standard deviation (SD) of the signal corresponding to six reagent blanks. Moreover, LOQ was also determined by diluting the sterol standards working solutions to obtain a signal-to-noise approach ratio (ICH 2005) of 10:1 for each sterol.

Precision

Within-assay and between-assay precisions were evaluated by calculating the relative standard deviation (RSD) of the analysis of the sample. Four aliquots of the sample were analyzed on the same day (within-assay) and nine aliquots in three days (between-assay).

Accuracy

The accuracy of the method for all sterols was established from recovery assays. Eight aliquots of the IF-1 were analyzed, four of these spiked with sterol amounts expected in the sample. Besides, the added sterol amounts were checked (by triplicate). The percentage recovery was calculated as:

Recovery (%) = [(mg sterol/L of reconstituted IF in spiked aliquots - mg sterol/L of reconstituted IF in non-spiked aliquots) x 100] / [mg/L of spiked sterol].

Results and discussion

Method validation

Selectivity

The relative retention times of standards and their spectrum obtained by GC-MS were used to identify the sterols present in the samples. The cholesterol (animal sterol) and campesterol (plant sterol) mass spectrum can be observed at the Figure 1. Moreover, the absolute and relative retention times and characteristic ions of all sterols are shown in Table 4. All sterols of IF-1 eluted as separate peaks in the 50-m long capillary column, showing good resolution under the GC conditions employed, thus allowing their identification and quantification. The total time of analysis was 32 minutes as it can observe in the chromatogram of IF-1 (Figure 1).

The confidence intervals of the slopes with or without matrix are shown in Table 3. The absence of interferences was observed for all sterols.

Linearity

In Table 3, the adjusted linear equations, concentration ranges tested and t-student test (t calculated and critical) were shown. The assayed concentration ranges showed good linearity, since all correlation coefficients obtained were >0.99 . Moreover, all the calculated t for all studied sterols were highest than the critical t (see Table 3) and these indicate a significant linear correlation with a probability of 95%. On the other hand, the residuals indicate that the model fits well the data and these data are heteroskedastic. Besides cholesterol, in this study the linearity values of other sterols (desmosterol, brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and sitostanol) were reported for their quantification in IFs for the first time. As regards the sensitivity of the method, defined as the signal-concentration relationship given by the slope, the sterols with the greatest sensitivity were found to be brassicasterol (plant sterol) and cholesterol (animal sterol), while the sterol with the lowest sensitivity was sitostanol. The analytical parameters obtained in this study were compared with those of other studies on sterol quantification in IFs found in the literature (Table 1). In this respect, the linearity of the response for cholesterol in

our study (198-3168 mg/L assay) was larger than in the studies published by Ahn et al., (2012) and Jeong et al., (2012) using HPLC-UV and GC-FID, respectively (see Table 1), because the IFs containing MFGM (like in IF-5 and 6) can have up to two times more cholesterol than IFs without this ingredient (Claumarchirant et al. 2015; Timby et al. 2014), since in the MFGM the cholesterol can represent 95% of total sterols (Fauquant et al. 2007).

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

Table 5 shows the LOD and LOQ (in μg in assay and mg/L of reconstituted IF) obtained. The LOD obtained with the reagent blanks method allowed the detection of all sterols at concentrations below 1 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ of reconstituted IF (values ranging from 0.14-0.99 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$), and their quantification below 4 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ (values ranging from 0.45-3.3 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$). The lower LOD corresponded to brassicasterol, and the greatest to cholesterol. The method signal-to-noise approach provided higher LOQ values (from 6- to 17-fold) than the other method. The LOD and LOQ values corresponding to cholesterol in our study were much lower than those reported by Ahn et al. (2012) and Jeong et al. (2012) in IFs, and LOQ calculated by the signal-to-noise in our study (2.54 mg/kg) were lower than the values reported by Ahn et al. (2012) by HPLC-UV and Jeong et al. (2012) by GC-FID (from 3- to 4.4-fold, respectively).

Precision

Values obtained for within-assay and between-assay precisions are reported in Table 5. The within-assay precision was lower than 10% for all the sterols analyzed, and ranged from 1.6% (desmosterol) to 8.8% (β -sitosterol), while the between-assay precision was lower than 21% for all the sterols analyzed, and ranged from 1.5% (desmosterol) to 20.4% (sitostanol). The studies by Ahn et al., (2012) and Jeong et al., (2012) obtained similar within-assay values (ranging from 3.2-12.2% and 2.6-8.9%) using HPLC-UV and GC-FID, respectively (Table 1). However, they did not report between-assay precision.

On comparing our precision values with those proposed by the AOAC guidelines (2012) for a single laboratory, we observe that the within-assay precision values were of the same order as the those indicated by the AOAC (<8% for cholesterol, desmosterol, campesterol, stigmasterol and β -sitosterol, at a concentration of 100 mg/L analyte present in assay and <12% for brassicasterol and sitostanol, at a concentration of 10 mg/L analyte present in assay). However, it should be noted that our within-assay precision values obtained for stigmasterol and β -sitosterol are borderline.

Accuracy

The percentage recovery values were satisfactory for all assayed sterols, and ranged from 92.9% (campesterol) to 108.0% (sitostanol) (see Table 5). In the literature, the recovery values for cholesterol in IFs (99.5-99.6%) (Ahn et al. 2012; Jeong et al. 2012) are within this range (Table 1).

On comparing with the acceptable percentage recovery range proposed by the AOAC (2012), we found the sterol concentrations in the assays to be in the order of 100 mg/L for cholesterol, desmosterol, campesterol, stigmasterol and β -sitosterol, versus 10 mg/L for brassicasterol and sitostanol. Therefore, the percentage recovery values obtained were compliant with the guidelines (85-110% and 80-115%, respectively), though the percentage recovery of campesterol was in the lower range of the AOAC guidelines.

Application

Sterols in seven IFs were determined. The analyses were carried out in triplicate (Table 6). As it can be observed, the minimum contents of each sterol analyzed in these samples are greater to the LOD and LOQ of our method, indicating that it is suitable for the determination of sterols in IFs.

In reconstituted IFs, cholesterol ranged from 16.41-51 mg/L (corresponding to 1.56-4.81 mg/100 g), while desmosterol (a precursor of cholesterol) ranged between 2.12-4.36 mg/L (0.20-0.43 mg/100 g).

The cholesterol concentrations found in our study were comparable to those reported by other authors (3-258 mg/L; 3.0-8.9 mg/100 g reconstituted IF) in bovine milk-based IFs (Ahn et al. 2012; Claumarchirant et al. 2015; Huisman et al. 1996; Jeong et al. 2012; Kamelska et al. 2011; Ramalho et al. 2011; Scopesi et al. 2002; Zunin et al. 1998), and lower than those found in caprine milk-based IFs (9.7-9.9 mg/100 g reconstituted IF) (Maduko & Park 2007) and in mature HM (46-283 mg/L) (Álvarez-Sala et al. 2015; Clark et al. 1983; Huisman et al. 1996; Kallio et al. 1989; Kamelska et al. 2013; Laitinen et al. 2009; Mellies *et al.* 1979; Ramalho et al. 2011; Scopesi et al. 2002). In this regard, breastfed infants have significant higher total cholesterol and LDL-cholesterol than infants fed with infant formulas (Kallio et al. 1992; Wong et al. 1993) or mixed fed (HM and IFs) (Harit et al. 2008). Different studies explain the relationship between cholesterol intake and the possible prevention of cardiovascular diseases in adulthood. In this sense, Owen et al., (2002) in a systematic review, concluded that exclusive breastfeeding may be associated with increased blood cholesterol level in infancy but lower levels in adult life. Moreover, Harit et al., (2008) argue that higher serum total cholesterol and LDL-cholesterol in the first six month of life may be physiological and useful for cognitive development and programming for lipid metabolism in later life. The variability in the cholesterol content in IFs may be due to the dairy ingredient used in the formulation (cow *vs.* caprine milk). Regarding desmosterol, its contents were in the order of those obtained by Claumarchirant et al. (2015), in different IFs.

Total plant sterol contents ranged from 24.50-50.68 mg/L (2.32-4.93 mg/100g), being β -sitosterol (14.97-30.28 mg/L) the main phytosterol, followed by campesterol (4.29-13.80 mg/L), stigmasterol (3.09-5.04 mg/L), and brassicasterol (1.19-2.81 mg/L). Sitostanol was the least abundant in all samples, with concentrations between 0.16-0.98 mg/L.

Regarding plant sterols, few studies have evaluated their contents in IFs. Our values (total and individual) were similar to those found by Claumarhcirant et al. (2015) (31.10-50.00 mg/L for total plant sterol, comprising brassicasterol,

campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, sitostanol). However, Huisman et al. (1996) and Maduko & Park (2007) reported total plant sterol (53.45-119.36 mg/L and 11.4-17.2 mg/100 g, respectively) and individual plant sterol (campesterol, stigmasterol and β -sitosterol) contents higher than those determined in our study. As in our study, these three papers reported the highest contents corresponding to β -sitosterol, although Maduko & Park (2007) detected also stigmasterol at a similar amount (2.5-4.5 and 2.5-5.0 mg/100 g, respectively). The found variability in plant sterols contents in IFs may be due to the type and quantity of vegetable oils used in their manufacture. In this sense, Maduko & Park (2007) studied five IFs based on skimmed goat's milk and a mixture of three vegetable oils (coconut, safflower and soybean) in different proportions. The IFs with the highest proportion of oil of safflower or soybean are those that provide greater content of plant sterols. However, the addition of coconut oil does not influence the contents of plant sterols. These contents of plant sterols are much higher than those found in HM as indicated above (Benoit et al., 2010; Laitinen et al., 2009).

The total sterol contents obtained in our study (50.35-104.66 mg/L or 4.77-9.87 mg/100 g) can be compared with those reported by Huisman et al. (1996) (76.9-133.7 mg/L) but are lower than those provided by Maduko & Park (2007) (21.3-27 mg/100 g).

In IF-1, 3 and 4, the β -sitosterol content was higher than that of cholesterol. However, IF-2, 5, 6 and 7 presented cholesterol contents higher than those of β -sitosterol, and in IF-5 and 6 (with MFGM) the animal sterol content was higher than the total plant sterols. This tendency was found also in IFs analyzed by Zunin et al. (1998) which had higher cholesterol content than β -sitosterol. Furthermore, the sterol profile in IFs with MFGM (IF-5 and 6) may be closer to that of HM (animal sterols > plant sterols), though cholesterol contents in HM are generally higher than in IFs. From a compositional point of view, this variability in the sterol profile of IFs can be dependent upon the ingredients used in their formulation. In this sense, the addition of an ingredient rich in MFGM reduces the differences of cholesterol found with respect to HM and the animal/plant sterol ratio is similar to HM (>1).

Cholesterol intake is very important for infants because it is involved in tissue formation, mainly in the growth and development of the brain (Dewettinck et al., 2008). This observation is also supported by the work of Scopesi et al. (2002), in which cholesterol content was related to the source of fat, and of Claumarchirant et al. (2015), in which the sterol profile was related to the type and quantity of oils and fats used and/or the addition of whey protein rich in MFGM.

Conclusions

The present study proposes a validated GC-FID method for determination of animal and plant sterols with good accuracy, precision and sensibility, not only for determining cholesterol in IFs, as proposed by other authors, but also for determining other sterols (desmosterol, brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and sitostanol) in cow milk based IFs.

The method can be used to determine the sterol contents in IFs, which it can be applied to studies whose purpose are adjust their profile and contents to that of HM, thereby ensuring a similar contribution for breast-fed and formula-fed infants.

Geolocation information

Address: Avenida Vicente Andres Estelles (without number)

Postal Code: 46100

City: Burjassot (Valencia)

Country: Spain

Acknowledgements

Thanks are due to Hero Spain, S.A. for providing the samples.

Disclosure statement

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work belongs to a CDTI (*Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial*) project granted to Hero Spain, S.A. Lorena Claumarchirant is the holder of a fellowship from this company.

References

- Alemaný-Costa L, González-Larena M, García-Llatas G, Alegría A, Barberá R, Sánchez-Siles LM, Lagarda MJ. 2012. Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources. *Food Res Int.* 48:265-270.
- Álvarez-Sala A, Garcia-Llatas G, Barberá R, Lagarda MJ. 2015. Determination of cholesterol in human milk: an alternative to chromatographic methods. *Nutr Hosp.* 32:1535-1540.
- Ahn JH, Jeong IS, Kwak BM, Leem D, Yoon T, Yoon C, Jeong J, Park JM, Kim JM. 2012. Rapid determination of cholesterol in milk containing emulsified foods. *Food Chem.* 135:2411-2417.
- AOAC. 2012. Guidelines for single-laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Official methods of analysis of AOAC International (19th ed.). Appendix K, Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- Benoit B, Fauquant C, Daira P, Peretti N, Guichardant M, Michalski MC. 2010. Phospholipid species and minor sterols in French human milks. *Food Chem.* 120:684-691.
- Claumarchirant L, Matencio E, Sanchez-Siles LM, Alegría A, Lagarda MJ. 2015. Sterol composition in infant formulas and estimated intake. *J Agric Food Chem.* 63:7245-7151
- Clark RM, Fey MB, Jensen RG, Hill DW. 1983. Desmosterol in human milk. *Lipids.* 18:264-266.
- Dewettinck K, Rombaut R, Thienpont N, Le TT, Messens K, Van Camp J. 2008. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int Dairy J* 18:436-457.
- Fauquant C, Briard-Bion V, Leconte N, Guichardant M, Michalski MC. 2007. Membrane phospholipids and sterols in microfiltered milk fat globules. *Eur J Lipid Sci Technol.* 109:1167-1173.
- García-Llatas G, Vidal C, Cilla A, Barberá R, Lagarda MJ. 2012. Simultaneous quantification of serum phytosterols and cholesterol precursors using a simple gas chromatographic method. *Eur J Lipid Sci Technol.* 114:520-526.
- Harit D, Faridi MMA, Aggarwal A, Sharma SB. 2008. Lipid profile of term infants on exclusive breastfeeding and mixed feeding: a comparative study. *Eur J Clin Nutr* 62:203-209.
- Heid HW, Keenan TW. 2005. Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *Eur J Cell Biol.* 84:245-258

- Huisman M, Van Beusekom CM, Lanting CI, Nijeboer HJ, Muskiet FAJ, Boersma ER. 1996. Triglycerides, fatty acids, sterols, mono- and disaccharides and sugar alcohols in human milk and current types of infant formula milk. *Eur J Clin Nutr.* 50:255-260.
- International Conference on Harmonization (2005) Validation of analytical procedures: Text and methodology. ICH Harmonised Tripartite Guideline. <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>. Accessed: 26.09.16
- ISO 12078:2006 Anhydrous milk fat — Determination of sterol composition by gas liquid chromatography (Reference method). http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=38038 (Consulted: 19-12-2016).
- ISO 12228-1:2014 Determination of individual and total sterols contents — Gas chromatographic method — Part 1: Animal and vegetable fats and oils. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=60248 (Consulted: 19-12-2016).
- IUPAC Method 2.401.1987. Determination of unsaponifiable matter. http://old.iupac.org/publications/books/ISBN0632033371_compress.pdf (Consulted: 19-12-2016).
- IUPAC Method 2.403.1987. Identification and determination of sterols by gas-liquid chromatography. http://old.iupac.org/publications/books/ISBN0632033371_compress.pdf (Consulted: 19-12-2016).
- Jeong IS, Kwak BM, Ahn JH, Leem D, Yoon T, Yoon C, Jeong J, Park JM, Kim JM. 2012. A novel sample preparation method using rapid non heated saponification method for the determination of cholesterol in emulsified foods. *J Food Sci.* 77:C1042-C1046.
- Kallio MJT, Siimes MA, Perheentupa J, Salmenpera L, Miettinen TA. 1989. Cholesterol and its precursors in human-milk during prolonged exclusive breast-feeding. *Am J Clin Nutr.* 50:782-785.
- Kallio MJ, Salmenperä L, Siimes MA, Perheentupa J, Miettinen TA. 1992. Exclusive breast-feeding and weaning: effect on serum cholesterol and lipoprotein concentrations in infants during the first year of life. *Pediatrics*, 89:663-666.
- Kamelska AM, Pietrzak-Fiećko R, Bryl K. 2011. Cholesterol content as an infant formulas quality determinant. *Poznań Univ Econ Rev.* 196:38-45.
- Kamelska AM, Pietrzak-Fiećko R, Bryl, K. 2013. Determination of cholesterol concentration in human milk samples using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *J Appl Spectrosc.* 80:148-152.

- Keenan TW, Patton S. 1995. The structure of milk: implications for sampling and storage. A. The milk lipid globule membrane. In: Jensen RG. (Ed.) Handbook of milk composition (pp. 5-50). San Diego. Academic Press, Inc.
- Laitinen K, Isolauri E, Kaipiainen L, Gylling H, Miettinen TA. 2009. Plant stanol ester spreads as components of a balanced diet for pregnant and breast-feeding women: evaluation of clinical safety. *Br J Nutr*, 101:1797-1804.
- Long AC, Kaiser JL, Katz GE. 2013. Lipids in infant formulas: Current and future innovations. *Lipid Technol*. 25:127-129.
- MacDougall D, Crummett WB. 1980. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal Chem*. 52:2242-2249.
- Maduko CO, Park YW. 2007. Modification of fatty acid and sterol composition of caprine milk for use as infant formula. *Int Dairy J*. 17:1434-1440.
- Mellies MJ, Burton K, Larsen R, Fixler D, Glueck CJ. 1979. Cholesterol, phytosterols, and polyunsaturated/saturated fatty acid ratios during the first 12 months of lactation. *Am J Clin Nutr*, 32:2383-2389.
- Owen CG, Whincup PH, Odoki K, Gilg JA, Cook DG. 2002. Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics*, 110:597-608.
- Ramalho HMM, Casal S, Oliveira MBPP. 2011. Total cholesterol and desmosterol contents in raw, UHT, infant formula power and human milks determined by a new fast micro-HPLC method. *Food Anal Method*. 4:424-430.
- Scopesi F, Zunin P, Mazzella M, Testa M, Boggia R, Evangelisti F, Serra G. 2002. 7-Ketocholesterol in human and adapted milk formulas. *Clin Nutr*. 21:379-384.
- Timby N, Domellöf E, Hernell O, Lönnerdal B, Domellöf M. 2014. Neurodevelopment, nutrition, and growth until 12 mo of age in infants fed a low-energy, low-protein formula supplemented with bovine milk fat globule membranes: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 99:860-868.
- Wong WW, Hachey DL, Insull W, Opekun AR, Klein PD. 1993. Effect of dietary cholesterol on cholesterol synthesis in breast-fed and formula-fed infants. *J Lipid Res*, 34:1403-1411.
- World Health Organization. 2009. Infant and Young child feeding. World Health Organization. Geneva. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44117/1/9789241597494_eng.pdf. Accessed 07.09.16
- Zunin P, Calcagno C, Evangelisti F. 1998. Sterol oxidation in infant formulas and milk cereals. *J Dairy Res*. 65:591-598.

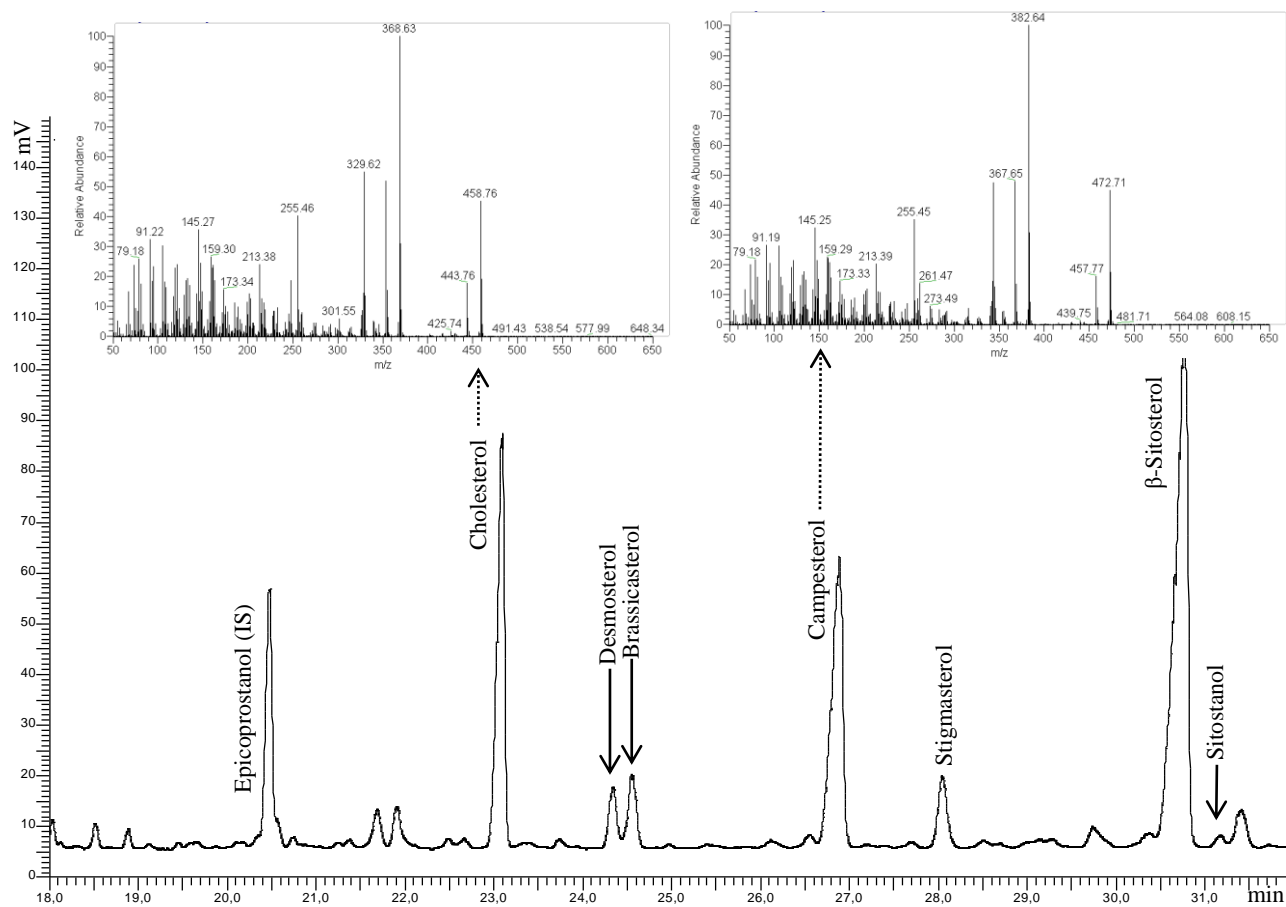


Fig. 1 Chromatogram obtained by GC-FID showing the sterols of the IF-1 sample and mass spectrum of some of them. Epicoprostanol (IS), cholesterol, desmosterol, brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and sitosterol are identified.

Table 1. Analytical parameters for cholesterol determined in bovine milk-based infant formulas samples found in literature

		Ahn et al. 2012	Jeong et al. 2012
Linearity	r	>0.9998	>0.9999
	Range (mg/L)	10-200	5-200
LOD (mg/kg)^a		2.27	3.38
LOQ (mg/kg)^a		7.56	11.27
Recovery (%)		99.6	99.5
Precision	Within (RSD%)	3.2 – 12.2	2.6 – 8.9
Method		HPLC-UV	GC-FID

r=linear correlation coefficient; LOD=limit of detection; LOQ=limit of quantification; RSD=relative standard deviation; HPLC-UV=high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection; GC-FID=gas chromatography-flame ionization detector; ^acalculated from signal-to-noise.

Table 2. Main ingredients relative to protein and fat fractions of infant formulas (IFs) indicated by the manufactures. Fat content determined and reconstitution factors (RF)

IFs	Main ingredients	Vegetable oils	Others	Fat (% w/w)	RF (% w/v)
1	skimmed milk, demineralised whey powder	palm, rapeseed, sunflower	fish oils	23.2 ± 0.6	13.0
2	skimmed milk, milk lipids, whey protein	rapeseed, sunflower, oleic sunflower	fish (source of DHA) and fungi oils (source of ARA), soya lecithin (emulsifier)	22.0 ± 2.1	13.5
3	skimmed milk, demineralised whey protein, milk proteins	palm, rapeseed, coconut, sunflower	fish and fungi oils, soya lecithin	25.5 ± 1.0	12.9
4	dried skim milk, demineralised whey, concentrated whey milk	palm, rape, coconut, sunflower	oils from microbial resource (source of ARA), soya lecithin	21.4 ± 0.5	13.8
5	skimmed milk, milk fat, whey enriched in MFGM	sunflower, rapeseed, palm, coconut	fish and single cell oils, soya lecithin	27.2 ± 0.6	13.0
6	skimmed milk, milk fat, whey protein rich in MFGM	sunflower, rapeseed, palm, coconut	single cell oil, whey protein rich in α -lactalbumin, milk protein, fish oil, soya lecithin (emulsifier)	34.8 ± 0.7	11.4
7	skimmed milk, milk fat, whey protein concentrate	sunflower, rapeseed, palm and coconut	fish and fungi oil, soya lecithin (emulsifier), GOS, choline chloride	19.2 ± 1.2	13.0

DHA: docosahexaenoic acid, ARA: arachidonic acid, GOS: galacto-oligosaccharides, MFGM: milk fat globule membrane.

Table 3. Linearity, statistical analysis of calibration curves (t-student) and matrix effect assay (confidence interval of slope) of sterols

Sterols	Linearity (without matrix)					With matrix			t-student	
	Range		r	Calibration curve	Confidence interval of slope	Confidence interval of slope	Calibration curve	r	Calculated t	Critic t
	μg (in assay)	mg/L*								
Cholesterol	19.8-316.8	9.9-158.4	0.9973	$y=0.0884x-1.3484$	0.081-0.095	0.058-0.097	$y=0.078x+0.878$	0.997	30.60	2.57
Desmosterol	1.68-226.8	0.84-113.4	0.9999	$y=0.0735x+0.0333$	0.073-0.074	0.073-0.111	$y=0.092x+0.193$	0.999	158.10	2.57
Brassicasterol	0.99-5.92	0.49-2.96	0.9970	$y=0.095x+0.0116$	0.073-0.117	0.110-0.151	$y=0.131x+0.205$	0.998	18.31	4.30
Campesterol	0.49-39.44	0.24-19.72	0.9993	$y=0.0768x+0.0412$	0.074-0.080	0.071-0.078	$y=0.075x+1.016$	0.999	61.52	2.57
Stigmasterol	1.9-15.2	0.95-7.6	0.9983	$y=0.0684x+0.0261$	0.020-0.095	0.079-0.090	$y=0.084x+0.146$	0.999	34.75	2.78
β-sitosterol	4.9-78.4	2.45-39.2	0.9956	$y=0.0677x+0.0736$	0.060-0.075	0.072-0.087	$y=0.079x+1.191$	0.996	23.75	2.57
Sitostanol	0.24-5.84	0.12-2.92	0.9984	$y=0.0606x+0.0006$	0.055-0.065	0.015-0.064	$y=0.039x+0.045$	0.979	36.01	2.78

r=linear correlation coefficient; y=sterol area/ IS area; x= μg sterol; *reconstitution factor: 13% (w/v).

Table 4. Retention times obtained by GC-FID and characteristic ions obtained by GC-MS of sterols

Sterols	Retention time		Characteristic ions
	Absolut (min)	Relative	
Epicoprostanol	20.5	-	215, 355, 370, 445
Cholesterol	23.1	1.13	255, 368, 353, 443
Desmosterol	24.3	1.19	253, 351, 366, 441
Brassicasterol	24.5	1.20	255, 365, 380, 455
Campesterol	26.9	1.32	255, 367, 382, 457
Stigmasterol	28.0	1.37	255, 379, 394, 469
β-Sitosterol	30.8	1.50	255, 381, 396, 471
Sitostanol	31.2	1.52	215, 383, 398, 473

Table 5. Limits of detection and quantification, precision and accuracy of sterols

Sterols	LOD		LOQ				Precision (%RSD)		Recovery assays (n=4) ^e			
	μg^{a} (in assay)	mg/L ^{*a}	μg^{a} (in assay)	mg/L ^{*a}	μg^{b} (in assay)	mg/L ^{*b}	Within (n=4)	Between (n=9 ^d)	Original content (mg/L*)	Spiked (mg/L*)	Found (mg/L*)	Recovery (%)
Cholesterol	0.0198 (0.076 ^c)	0.0099	0.0659 (0.253 ^c)	0.0330	0.6600 (2.54 ^c)	0.3300	2.10	2.51	17.69±0.44	27.11±0.57	44.48±0.79	98.83±2.93
Desmosterol	0.0061	0.0031	0.0202	0.0101	0.3444	0.1722	1.56	1.47	7.00±0.10	14.16±0.69	21.62±0.91	103.26±6.40
Brassicasterol	0.0027	0.0014	0.0091	0.0045	0.0887	0.0444	5.72	6.26	1.96±0.12	4.00±0.23	6.12±0.25	104.19±6.28
Campesterol	0.0056	0.0028	0.0186	0.0093	0.1052	0.0526	5.67	5.72	12.07±0.69	8.75±2.72	20.20±1.29	92.95±14.77
Stigmasterol	0.0082	0.0041	0.0273	0.0137	0.1520	0.0760	8.65	9.05	3.79±0.34	5.71±0.57	9.91±0.56	107.18±9.77
β-sitosterol	0.0060	0.0030	0.0200	0.0100	0.1274	0.0637	8.76	7.49	28.31±2.12	35.99±1.62	64.64±2.42	100.95±6.73
Sitostanol	0.0066	0.0033	0.0221	0.0111	0.1461	0.0731	7.20	20.40	0.40±0.08	4.23±0.17	4.97±0.38	108.03±9.00

LOD=limit of detection; LOQ=limit of quantification; RSD=relative standard deviation; *reconstitution factor: 13% (w/v); ^acalculated from blanks; ^bcalculated from signal-to-noise ratio of 10:1; ^cvalues expressed in mg/kg ^danalysis performed by triplicate in three different days; ^evalues expressed as mean ± standard deviation.

Table 6. Sterol concentrations (mg/L) from infant formulas (values are expressed as mean \pm SD of three replicates)

Sample	Cholesterol	Desmosterol	Plant sterols					Total plant sterols
			Brassicasterol	Campesterol	Stigmasterol	β -sitosterol	Sitostanol	
IF1	16.41 \pm 0.33	3.71 \pm 0.11	1.74 \pm 0.13	9.60 \pm 0.61	4.02 \pm 0.35	24.49 \pm 2.81	0.69 \pm 0.37	40.53 \pm 3.78
IF2	30.76 \pm 0.61	3.67 \pm 0.03	2.13 \pm 0.16	9.64 \pm 0.20	3.59 \pm 0.39	21.65 \pm 0.69	0.48 \pm 0.04	37.49 \pm 0.74
IF3	21.40 \pm 0.07	3.15 \pm 0.02	2.81 \pm 0.08	13.80 \pm 0.17	3.62 \pm 0.03	30.28 \pm 0.23	0.16 \pm 0.04	50.68 \pm 0.02
IF4	24.24 \pm 1.55	3.81 \pm 0.11	2.80 \pm 0.19	10.98 \pm 0.87	3.56 \pm 0.82	27.06 \pm 4.04	0.39 \pm 0.07	40.65 \pm 3.79
IF5	51.00 \pm 2.19	3.64 \pm 0.10	2.49 \pm 0.10	11.49 \pm 0.69	5.04 \pm 0.36	30.10 \pm 1.95	0.90 \pm 0.06	50.02 \pm 2.93
IF6	50.38 \pm 2.32	4.36 \pm 0.19	2.06 \pm 0.17	10.28 \pm 0.47	4.76 \pm 0.79	29.15 \pm 1.67	0.41 \pm 0.12	46.66 \pm 2.37
IF7	23.77 \pm 0.14	2.12 \pm 0.03	1.19 \pm 0.06	4.29 \pm 0.06	3.09 \pm 0.27	14.97 \pm 1.07	0.98 \pm 0.12	24.50 \pm 1.42

3.- Sterol composition in infant formulas and estimated intake

Lorena Claumarchirant[†], Esther Matencio[‡], Luis Manuel Sanchez-Siles[‡], Amparo

Alegría[†], María Jesús Lagarda^{†*}

[†]Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avenida Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

[‡]R+D Department, Hero Group, Avenida Murcia 1, 30820 Alcantarilla, Murcia, Spain

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2015**, *63*, 7245-7251

ABSTRACT

Sterol contents in infant formulas (IFs) from the European market were determined and their intakes by infants between 0-6 months were evaluated. Total animal sterols (mg/100mL) ranged from 1.71-5.46, cholesterol being the main animal sterol (1.46-5.1). In general, cholesterol and desmosterol were lower than the human milk (HM) values indicated by other authors. Total plant sterol (mg/100mL) ranged from 3.1-5.0. β -sitosterol, the most abundant phytosterol, ranged from 1.82-3.01, followed by campesterol (0.72-1.15), stigmasterol (0.27-0.53) and brassicasterol (0.14-0.28). Cholesterol intake (mg/day) ranged from 9 to 51 and plant sterol intake (mg/day) from 19 to 50. The sterol profile of IFs is highly dependent on the type and quantity of fats used in their formula. The use of bovine milk fat and milk fat globule membrane in the IFs can approximate the profile of animal sterols to those found in HM, though cholesterol intakes in breastfed infants are still higher than in formula-fed infants.

KEYWORDS: *cholesterol, plant sterols, infant formula, intake, milk fat globule membrane, bovine milk fat*

■ INTRODUCTION

Breast milk is considered the gold standard of infant nutrition. Human milk (HM) contains an abundance of bioactive components that are highly likely to contribute to the short and long-term benefits of breastfeeding.¹

Many factors condition variability in human milk, including the lactation period during the course of the day and within each feeding, the diet and nutritional status of the mother, genetics factors, and possibly also infant factors such as sex.² This variability has benefits for infant health and at the same time makes it almost impossible to copy its unique composition.

In HM, the milk fat globule membrane (MFGM) contains many constituents typical of biological membranes such as phospholipids, cholesterol, and glycolipids, among others. Cholesterol is the major sterol in HM, and other animal and plant sterols are also described in the literature.³ The functional benefits of these sterols in infant nutrition are not fully understood. Cholesterol is an essential component of cell membranes, and is the main component of nerve cell membrane lipids. Apart from its role as a structural component, cholesterol is a precursor of bile acids and steroid hormones.⁴ During the past decades, there have been a growing number of papers published in relevant scientific journals attempting to explain the relationship between cholesterol intake from HM and the possible prevention of cardiovascular diseases in adulthood. In this sense, Owen et al.,⁵ in a systematic review of 17 observational studies, concluded that breastfeeding (particularly exclusive breastfeeding) may be associated with lower blood cholesterol in later life. In this regard, the authors considered that higher levels of cholesterol in human milk could explain lower cholesterol concentrations in blood in later life. Similarly, Harit et al.⁶ argued that, in early infancy, the higher serum total cholesterol and LDL-cholesterol contents in exclusively breastfed infants may be physiological and useful for cognitive development and the programming of lipid metabolism in later life. However, Koletzko et al.⁷ observed discrepancies between the results of different

studies regarding the long-term cardiovascular benefits of breastfeeding. These discrepancies have been attributed to the designs of the studies, or to unknown biases introduced in observational studies, as well as to difficulties in assessing exclusive breastfeeding and its duration. The authors therefore concluded that the implications of breastfeeding in relation to cholesterol intake upon cardiovascular health over the long-term remain uncertain.

On the other hand, plant sterols inhibit cholesterol absorption in the gut by competing for space in micelles.⁸ Thus, the tendency to reduce the cholesterol content of IFs should be undertaken with caution, because it could interfere with possible beneficial effects in terms of nutritional programming.⁵

When breastfeeding is not possible, infant milk formulas serve as an adequate substitute for HM. As far as we know, there are few data about the sterol composition of IFs.⁹⁻¹⁴ Considering the above, the present study was carried out to determine the sterol contents (of both animal and plant origin) in several infant formulas found on the European market, and to evaluate the influence of MFGM-rich ingredients in affording the sterol contents present in human milk (gold standard). In addition, the sterol intake by infants fed with these formulas was estimated.

■ MATERIALS AND METHODS

Reagents. Standards. For sterol determination, the standards used were 5 β -cholestan-3 α -ol (epicoprostanol) (purity \geq 95%) as internal standard (IS), 5-cholesten-3 β -ol (cholesterol) (purity 99%), 5,24-cholestadien-3 β -ol, (desmosterol) (purity 84%), stigmasta-5,22-dien-3 β -ol (stigmasterol) (purity 95%), stigmast-5-en-3-ol (β -sitosterol) (purity 98%), and 24 α -ethyl-5 α -cholestan-3 β -ol (stigmastanol) (purity 97.4%) from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and 5,22-cholestadien-24 β -methyl-3 β -ol (brassicasterol) (purity 98.6%) and 5-cholesten-24 α -methyl-3 β -ol (campesterol) (purity 98.6%) purchased from Steraloids (Newport, RI, USA).

Reagents. Chloroform, diethyl ether, ethanol, methanol, potassium chloride, sodium chloride, anhydrous sodium sulfate, acetone, and 2-propanol were purchased from Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, USA). Potassium hydroxide, butylated hydroxytoluene (BHT), and N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane (silylating reagent) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Anhydrous pyridine (silylating reagent) was from Fluka (Buchs, Switzerland), and n-hexane (purity 96%, HPLC grade) was from Scharlau Chemie, S.A. (Sentmenat, Barcelona, Spain). All reagents were of analytical grade. Ultrapure water was obtained by means of a Millipore Q water purification system (Milford, MA, USA).

Preparation of Solutions. Internal standard (IS) solution of epicoprostanol in ethanol was prepared at a concentration of 1 mg/mL. Standard solutions of sterols were prepared by dissolving the standards in an n-hexane:2-propanol (3:2, v/v) mixture at the following concentrations: 1 mg/mL (β -sitosterol), 100 μ g/mL (brassicasterol), 1 mg/mL (campesterol), 1 mg/mL (cholesterol), 100 μ g/mL (desmosterol), 2.5 μ g/mL and 100 μ g/mL (stigmastanol), and 100 μ g/mL (stigmasterol). All solutions were aliquoted (1 mL) and stored at -20 °C under a nitrogen atmosphere (purity >99%, nitrogen generator Zefiro 40 F-DBS, Courtaboeuf-Cedex, France). To prevent falsely elevated values of IS and standard solutions, immediately prior to analysis the solvents of the stock solutions were completely evaporated with a stream of nitrogen and dissolved with 1 mL of solvent.

A mixture of pyridine:N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (with 1% trimethylchlorosilane) (3:10, v/v) was prepared weekly and stored at 4 °C in an amber glass flask for derivatization. Glass material used for this preparation was rinsed with acetone immediately before use to remove moisture.

Samples. Thirteen powdered IFs marketed in three European countries (Sweden, the Czech Republic, and Spain), for infants between 0 and 6 months of age, were selected for sterol analysis. The label-stated compositions referring to

compounds of the protein and fat fractions as a source of sterols are summarized in Table 1. It should be mentioned that, in addition to vegetable oils and fish oils commonly added to these products, some formulas (1, 5, and 9) contain milk fat and whey enriched with MFGM.

Determination of Plant Sterols. Samples were reconstituted as indicated on the labeling (reconstitution factor between 11.4 and 13.8% w/v), and a volume of sample (2 mL) providing approximately 70 mg of fat. Three independent assays of the same batch were analyzed. Lipids were extracted applying the method described by Alemany-Costa et al.,¹⁵ though filtration was made with Whatman no. 2V, 125 mm, (Buckinghamshire, U.K.), and 20 mL of 1 M KCl solution was added to the filtrate instead of 10 mL. The lipid fraction obtained (approximately 70 mg) was processed using the method described by González-Larena et al.,¹⁶ with minor modifications. Briefly, IS (20 µg of epicoprostanol) was added to the lipid fraction, and hot saponification (2.5 mL of 2 N KOH in 90% ethanol at 65 °C during 1 h) was performed. The unsaponifiable material was then extracted with diethyl ether and subjected to derivatization with BSTFA-1%TMCS:pyridine (10:3). The trimethylsilyl ether (TMSE) derivatives obtained were dissolved in n-hexane, filtered (syringedriven Millex-FH filter unit, 1 mL, 0.45 µm Millipore, Milford, MA, USA), and evaporated with nitrogen. The TMSE derivatives were dissolved in 100 µL of n-hexane, and 1 µL was injected into a gas chromatograph with flame ionization detector (GC-FID) (AutoSystem XL, PerkinElmer, Norwalk, CT, USA) equipped with a CP-Sil 8 low bleed/MS (50 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness) capillary column (Chromopack-Varian, Middelburg, The Netherlands), with application of the chromatographic conditions previously proposed for serum sterol determination,¹¹ with a split ratio of 1:10.

All glassware (tubes and vials) was scrupulously cleaned, rinsed with distilled water, and introduced in a Heraeus Thermicon K1253A oven at 450 °C during 8 h to remove contamination according to García-Llatas et al.¹⁷ The Pyrex glass tubes

with a conical bottom, employed for derivatization, were previously silanized with derivatization solution in order to avoid the adsorption of TMSE derivatives.¹⁸

Sterols were identified by comparing standards derivatized by the same procedure as the samples. For quantification, sterol calibration curves of brassicasterol (1–6 µg), β-sitosterol (25–78 µg), campesterol (10–39 µg), cholesterol (20–317 µg), desmosterol (1.7–227 µg), stigmasterol (2–15 µg), and sitostanol (stigmastanol) (0.24–6 µg) containing 20 µg of IS (epicoprostanol) were performed. The correlation coefficients (*r*) obtained for the different sterols were >0.99.

Estimation of Intake. To calculate intake during the first months of life, the average intake (mL/day) obtained from the literature and corresponding to a total of 1113 healthy infants born at term was used.^{19–26} The mean volumes of the IFs (mL/day) ingested by these newborn infants were evaluated at 7 concrete moments of lactation: 0.5 months, 607 ± 31 (*n* = 307); 1 month, 754 ± 112 (*n* = 1093); 2 months, 877 ± 158 (*n* = 937); 3 months, 895 ± 160 (*n* = 937); 4 months, 933 ± 157 (*n* = 875); 5 months, 990 ± 31 (*n* = 645); and 6 months 873 ± 125 (*n* = 665).

Statistical Analysis. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's HSD test (*p* < 0.001) were applied to total sterols and individual sterol contents to evaluate possible differences according to the type of sample involved.

In estimating intake, two-tailed (sample and lactation stage) ANOVA was applied to the mean values, followed by Tukey's HSD test. A significance level of *p* < 0.001 was adopted for all comparisons.

The Statgraphics Plus version 5.1 statistical package (Rockville, MD, USA) was used throughout.

■ RESULTS AND DISCUSSION

Animal Sterols. The total and individual contents of the main animal sterols (cholesterol and desmosterol) are summarized in Table 2. Total animal sterols ranged

from 1.71 to 5.46 mg/100 mL sample, cholesterol being the main animal sterol (1.46–5.1 mg/100 mL). The cholesterol concentrations found in our study were comparable to those reported by other authors (Table 3). It has been shown that the amount of cholesterol in IFs is lower than the levels found in HM (4.3–29.2 mg/100 mL) (Table 3).

In our study, IFs 5 and 6 (marketed in Spain) and 9 (marketed in Sweden) showed the highest cholesterol contents (≥ 4.0 mg/100 mL). It should be underscored that whey protein enriched with MFGM and milk fat is included in these formulations, and MFGM is a good source of cholesterol.³⁰ The small differences in cholesterol content between IFs 5 and 9 (involving the same formula manufactured in different countries) could be due to different origins of the milk fat used, and even to the different technological treatments applied during the cream separation process.³¹

Infant formula 1 (marketed in Spain) presented an intermediate cholesterol content (2.6 mg/100 mL) that may be related to the use of milk fat. The lowest IF cholesterol content ranged from 1.46 to 2.22 mg/100 mL. All these formulas contain vegetable oils as the main source of fat. From a compositional point of view, the amount of cholesterol in IFs seems to be positively related to the dairy ingredient used in the formulation (whole milk/milk fat and MFGM). This observation is also supported by the study published by Scopesi et al.,¹³ in which the cholesterol content was also related to the source of fat: lower cholesterol contents corresponding to formulas in which the fat source was vegetable oil, intermediate contents corresponding to formulas containing milk fat with the addition of vegetable oil, and the highest contents (approximately 22–26 mg/100 mL) corresponding to samples containing animal fat and eggs, in addition to vegetable oils.¹³

On the other hand, Maduko and Park¹⁰ determined cholesterol in 5 formulations based on skimmed goat milk with different blends of coconut, safflower, and soybean oils. Cholesterol contents of these caprine IFs ranged from 9.7 to 9.9 mg/100

g of formula and were higher than in the formulas analyzed in our study (1.41–4.81 mg/100 g of reconstituted formula or 1.46–5.10 mg/100 mL). This may be due to the greater quantity of whole goat milk added to infant milk formulas analyzed by Maduko and Park.¹⁰

The cholesterol contents in our study are in line with those reported by Wong et al.¹¹ (2.2 ± 1.1 mg/100 g of reconstituted formula). Only our formulas with dairy fats showed higher cholesterol contents than those indicated by these authors.

The cholesterol concentrations in IF analyzed by Huisman et al.¹² were 3–35 times lower compared with the levels in HM. In our study, the cholesterol concentration in IFs was 2.7–10 times lower compared with the mean HM data described by Huisman¹² (14 mg/100 mL). Interestingly, only the formulas with dairy lipid ingredients (IFs 5, 6, and 9) showed a concentration between 2.7 and 3.5 times lower versus HM. The dairy lipid enriched formulas come closer to the lowest cholesterol contents found in HM in previous studies (6.5 mg/100 mL described by Scopesi et al.¹³).

Albeit to a lesser degree, desmosterol was quantified in all the formulas (0.25–0.43 mg/100 mL) except IF 10 (showing only detectable traces) (Table 2). This is the first time that desmosterol is quantified in IFs. In the study conducted by Ramalho et al.,¹⁴ desmosterol was not detected in IF. Desmosterol is a precursor of cholesterol that is present both in human milk fat globule and in cow's milk.³

In IFs, desmosterol expressed as a percentage of total animal sterols is higher than in HM. A significant correlation ($y = 0.0152x + 0.053$; $R^2 = 0.8449$) was observed between desmosterol content and the label stated values of docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA). Fish, fungi, and algae oils are frequently used as DHA and AA sources (see Table 1), which could explain these results.

Lathosterol was not detected in the IFs analyzed in our study, and has not been detected in IFs in other studies to date. However, in human milk, Kallio et al.²⁸ found lathosterol values ranging from 2.7 to 4.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ cholesterol. Benoit et al.³ in turn found lathosterol in HM to range from nondetectable levels to 4.40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ cholesterol (with a mean value of 0.44 $\mu\text{g}/\text{mg}$ cholesterol).

Cholesterol/Desmosterol Ratio: Infant Formulas vs Human Milk. In general, cholesterol and desmosterol contents in the analyzed IFs were lower than the HM values indicated by other authors (Table 3). Although a significant correlation to total cholesterol in HM has not always been observed, most authors report desmosterol contents below or close to 10% of the cholesterol content. The desmosterol content in the analyzed IFs was less variable than the cholesterol content, and represented $\leq 10\%$ of the total sterols in the formulas with the highest cholesterol content (IFs 1, 5, 6, and 9). The IFs with the highest desmosterol percentages ($>10\%$) with respect to the animal sterol contents contained algae and/or fungi and/or fish oils (see ingredients, Table 1). It is now well-known that cholesterol and desmosterol (two C27 sterols) are the major sterols in crabs, mussels, and crustaceans in general. In snow crab hepatopancreas, desmosterol was found to be the second most predominant sterol ($>15\%$), after cholesterol (67–76%). Furthermore, desmosterol is abundant in many red algae,³² and may be absorbed in large quantities from the crab diet, though it may also have an endogenous origin.³³

Some Zygomycetes synthesize primarily C28 sterols (ergosterol), while others synthesize primarily C27 sterol. These fungi include members of the family Mortierellaceae, in which desmosterol (approximately 86% of total sterol) has been reported as the most abundant sterol.³⁴ *Mortierella alpine* is an oleaginous fungus which can produce lipids accounting for up to 50% of its dry weight in the form of triacylglycerols. It is commercially used for the production of arachidonic acid employed in the formulation of IFs. This fungus produces only two major sterol lipids, desmosterol and 24(28)-methylenecholesterol.³⁵

Plant Sterols. In the IFs studied we identified plant sterols such as brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, and sitostanol. Total plant sterol contents ranged from 3.1 to 5.0 mg/100 mL sample, and β -sitosterol (ranging from 1.82 to 3.01 mg/100 mL) was found to be the most abundant phytosterol, followed by campesterol (0.72–1.15 mg/100 mL), stigmasterol (0.27–0.53 mg/100 mL), and brassicasterol (0.14–0.28 mg/100 mL) (Table 4). Sitostanol was detected in amounts (0.031–0.142 mg/100 mL) always lower than those of the respective plant sterols (Table 4).

Few studies have evaluated the plant sterol contents in IFs. Huisman et al.¹² analyzed the sterols in 10 types of cow's milk-based IFs, and reported total plant sterol contents ranging from 5.345 to 11.936 mg/100 mL. These total plant sterols and individual plant sterol (β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, and fucosterol) contents were higher than those determined in our study, and β -sitosterol showed the highest content in both studies.

Maduko and Park¹⁰ found higher plant sterol levels (7.2–13.5 mg/100 g) in ready to drink milk blends (goat milk and vegetal oils) than in our study (2.98–4.72 mg/100 g of reconstituted formula or 3.11–5.0 mg/100 mL). Regarding the content of plant sterols, the 13 IFs had quantities markedly higher (Table 4) than human milk, as reported Laitinen et al.³⁶ (0.108 mg/100 mL) and Benoit et al.³ (0.16 μ g/mg cholesterol). This could be because the IFs were formulated with a combination of vegetable oils (coconut, soy, canola, high oleic safflower, high oleic sunflower, and palm oleic oils), in order to more closely simulate the fatty acid profile of HM.³⁷

The total plant sterol contents in the analyzed IFs were higher than in HM. From a functional point of view, no data are available in the literature describing a possible beneficial role of plant sterols in infants. In this sense, in hypercholesterolemic children and adolescents, an emulsified combination of plant sterols, fish oil (with EPA + DHA), and B vitamins decreased LDL-cholesterol, and thus exerts beneficial effects upon cardiovascular risk factors.³⁸

Total Sterol Content and Sterol Ratio. As far as we know, the total sterol contents obtained in our study (5.20–10.47 mg/100 mL or 5.01–9.87 mg/100 g of reconstituted IF) can only be compared with those reported by Huisman et al.¹² (7.69–13.37 mg/100 mL) and Maduko and Park¹⁰ (21.3–27.00 mg/100 g of reconstituted IF). These latter data are very surprising, because the authors indicated that the IFs were prepared using skimmed goat milk (0.17 g residual fat/100 g) with very high cholesterol contents.

Except in the formulas with dairy lipids (IFs 5, 6, and 9), the total vegetable sterol levels were higher than those of the animal sterols (see Figure 1a). Although the physiological meaning of this has not been studied, the higher proportion of plant sterols in IFs is one more difference to add to the list when IFs and HM are compared.

The same tendency can be observed in relation to the cholesterol/ β -sitosterol ratio (see Figure 1b). The four formulas that included dairy lipids (IFs 1, 5, 6, and 9) were the only ones with significantly higher levels of cholesterol than β -sitosterol. Surprisingly, only Maduko and Park¹⁰ found plant sterol and total sterol contents closely simulating those of HM, despite their use of skimmed caprine milk and vegetable oils (coconut, sunflower, and soybean).

Estimation of Intake. Cholesterol intake (mg/day) ranged from a minimum of 9 mg/day (0.5 month old infant IF 4) to 51 mg/day (5 month old infant IF 5). Cholesterol is the sterol contributing most to animal sterol intake. Variability in cholesterol in animal sterol intake was attributable to the high cholesterol variability seen in the IFs (Figure 1a, b). Independently of the IF for the calculation, the average cholesterol and total animal sterol intake ranged from 15 to 25 mg/day and from 17 to 28 mg/day, respectively, at 0.5 and 6 months (Figure 2a, b). Wong et al.¹¹ determined cholesterol intakes at 5 months (24.14 mg/day) for formula-fed infants, and the values were in line with our own results. Daily cholesterol intake in breastfed infants has been estimated to range from 75 to 150 mg/day³⁹ or 131 ± 38 mg/day⁴⁰ or 116 mg/day.¹¹ These values are twice the intake in formula-fed infants. Therefore,

the cholesterol intakes in formula-fed infants are still too far from the cholesterol intakes corresponding to HM. Although there is still controversy about the effects of early cholesterol intake upon long-term cardiovascular health,⁷ the addition of dairy lipids, and therefore an increase in the cholesterol content, may be a good approach to close the gap in intake between breastfed and formula-fed infants.

Plant sterol intake (mg/day) ranged from a minimum of 19 mg/day (0.5 month old infant IF 3) to 50 mg/day (5 months old infant IF 5) contributing significantly to total sterol intake (see Figure 2d). Independently of the IF, average plant sterol intake ranged from 24 to 39 mg/day at 0.5 and 6 months (see Figure 2c). To the best of our knowledge, no data on plant sterol intake in infant have been published to date.

In summary, mean total sterol intake estimated was 41–66 mg/day (see Figure 2d). Taking into account the formula milk volume intake from the literature, sterol intake increased during first 5 months (see Figure 2), when the values were highest ($p < 0.001$). The introduction of complementary food, and therefore less infant formula, in the sixth month could explain the significant decrease ($p < 0.001$) in animal sterol intake in this month.

The sterol profile of IFs is highly dependent upon the type and quantity of oils and fats used in their formulation. The use of bovine milk fat and whey protein rich in MFGM in the IF formulations can approximate the profile of animal sterols to those found in HM, though cholesterol intakes in breastfed infants are still higher than in formula-fed infants. Furthermore, in order for the sterol composition of IFs to resemble that of HM, it would be necessary to decrease the desmosterol content to less than 10% and reduce plant sterols in order to obtain an animal/plant sterol ratio closer to that of HM. Further research is needed to characterize the sterol contents of ingredients to improve the formulations of IFs, that allow mimicking the composition and functionality of HM. Such requires technological advances in different areas such as analytical research, food and ingredient technology, and nutritional and clinical science. The main starting point for innovation in IFs is

research on the nutritional and functional properties of HM and to assess whether the differences in sterol contents between IFs and human milk are related to health outcomes.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +34-963544909. Fax: +34-963544954. E-mail: m.j.lagarda@uv.es.

Funding

This work belongs to a CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) project granted to Hero Spain S.A., and L. Claumarchirant is holder of a fellowship from this company.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ABBREVIATIONS USED

IFs, infant formulas; AA, arachidonic acid; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, icosapentaenoic acid; HM, human milk; IS, internal standard; MFGM, milk fat globule membrane; TMSE, trimethylsilyl ether.

■ REFERENCES

- (1) Lönnerdal, B. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *99*, 712S–717S.
- (2) Stam, J.; Sauer, P. J.; Boehm, G. Can we define an infant's need from the composition of human milk? *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *98*, 521S–528S.
- (3) Benoit, B.; Fauquant, C.; Daira, P.; Peretti, N.; Guichardant, M.; Michalski, M. C. Phospholipid species and minor sterols in French human milks. *Food Chem.* **2010**, *120*, 684–691.
- (4) Cortes, V. A.; Busso, D.; Mardones, P.; Maiz, A.; Arteaga, A.; Nervi, F.; Rigotti, A. Advances in the physiological and pathological implications of cholesterol. *Biol. Rev.* **2013**, *88*, 825–843.

- (5) Owen, C. G.; Whincup, P. H.; Kaye, S. J.; Martin, R. M.; Smith, G. D.; Cook, D. G.; Bergstrom, E.; Black, S.; Wadsworth, M. E.; Fall, C. H.; Freudenheim, J. L.; Nie, J.; Huxley, R. R.; Kolacek, S.; Leeson, C. P.; Pearce, M. S.; Raitakari, O. T.; Lisinen, I.; Viikari, J. S.; Ravelli, A. C.; Rudnicka, A. R.; Strachan, D. P.; Williams, S.M. Does initial breastfeeding lead to lower blood cholesterol in adult life? A quantitative review of the evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 305–14.
- (6) Harit, D.; Faridi, M. M. A.; Aggarwal, A.; Sharma, S. B. Lipid profile of term infants on exclusive breastfeeding and mixed feeding: a comparative study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2008**, *62*, 203–209.
- (7) Koletzko, B.; Agostoni, C.; Bergmann, R.; Ritzenthaler, K.; Shamir, R. Physiological aspects of human milk lipids and implications for infant feeding: a workshop report. *Acta Paediatr.* **2011**, *100*, 1405–1415.
- (8) Ostlund, R. E. Phytosterols, cholesterol absorption and healthy diets. *Lipids* **2007**, *42*, 41–45.
- (9) Kamelska, A. M.; Pietrzak-Fiecko, R.; Bryl, K. Determination of cholesterol concentration in human milk samples using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Appl. Spectrosc.* **2013**, *80*, 148–152.
- (10) Maduko, C. O.; Park, Y. W. Modification of fatty acid and sterol composition of caprine milk for use as infant formula. *Int. Dairy J.* **2007**, *17*, 1434–1440.
- (11) Wong, W. W.; Hachey, D. L.; Insull, W.; Opekun, A. R.; Klein, P. D. Effect of dietary cholesterol on cholesterol synthesis in breast-fed and formula-fed infants. *J. Lipid Res.* **1993**, *34*, 1403–1411.
- (12) Huisman, M.; van Beusekom, C. M.; Lanting, C. I.; Nijeboer, H. J.; Muskiet, F. A. J.; Boersma, E. R. Triglycerides, fatty acids, sterols, mono- and disaccharides and sugar alcohols in human milk and current types of infant formula milk. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1996**, *50*, 255–260.
- (13) Scopesi, F.; Zunin, P.; Mazzella, M.; Testa, M.; Boggia, R.; Evangelisti, F.; Serra, G. 7-Ketocholesterol in human and adapted milk formulas. *Clin. Nutr.* **2002**, *21*, 379–384.
- (14) Ramalho, H. M. M.; Casal, S.; Oliveira, M. B. P. P. Total Cholesterol and Desmosterol Contents in Raw, UHT, IF Powder and Human Milks Determined by a New Fast Micro-HPLC Method. *Food Anal. Meth.* **2011**, *4*, 424–430.

(15) Alemany-Costa, L.; González-Larena, M.; García-Llatas, G.; Alegría, A.; Barberá, R.; Sánchez-Siles, L. M.; Lagarda, M. J. Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources. *Food Res. Int.* **2012**, *48*, 265–270.

(16) González-Larena, M.; Cilla, A.; García-Llatas, G.; Barberá, R.; Lagarda, M. J. Plant sterols and antioxidant parameters in enriched beverages: storage stability. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 4725–4734.

(17) García-Llatas, G.; Vidal, C.; Cilla, A.; Barberá, R.; Lagarda, M. J. Simultaneous quantification of serum phytosterols and cholesterol precursors using a simple gas chromatographic method. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2012**, *114*, 520–526.

(18) Guardiola, F.; Codony, R.; Rafecas, M.; Boatella, J. Adsorption of oxysterols on different microtube materials during silanylation prior to gas-chromatographic determination. *J. Chromatogr. A* **1995**, *705*, 396–399.

(19) Ben, X. M.; Li, J.; Feng, Z. T.; Shi, S. Y.; Lu, Y. D.; Chen, R.; Zhou, X. Y. Low level of galacto-oligosaccharide in IF stimulates growth of intestinal *Bifidobacteria* and *Lactobacilli*. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 6564–6568.

(20) Chouraqui, J. P.; Grathwohl, D.; Labaune, J. M.; Hascoet, J. M.; de Montgolfier, I.; Leclaire, M.; Giarre, M.; Steenhout, P. Assessment of the safety, tolerance, and protective effect against diarrhea of IFs containing mixtures of probiotics or probiotics and prebiotics in a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *87*, 1365–1367.

(21) Lasekan, J. B.; Jacobs, J.; Reisinger, K. S.; Montalto, M. B.; Frantz, M. P.; Blatter, M. M. Lactose-free milk protein-based IF: impact on growth and gastrointestinal tolerance in infants. *Clin. Pediatr.* **2011**, *50*, 330–337.

(22) Luque, V. Nutrición temprana: efecto de la ingesta de proteínas durante los primeros meses de vida sobre el tamaño y función renales. Thesis. 2010. Universitat Rovira i Virgili. Reus, Spain.

(23) Mennella, J. A.; Ventura, A. K.; Beauchamp, G. K. Differential growth patterns among healthy infants fed protein hydrolysate or cow-milk formulas. *Pediatrics* **2011**, *127*, 110–118.

(24) Salvini, F.; Riva, E.; Salvatici, E.; Boehm, G.; Jelinek, J.; Banderali, G.; Giovannini, M. A specific prebiotic mixture added to starting IF has long-lasting bifidogenic effects. *J. Nutr.* **2011**, *141*, 1335–1339.

- (25) Sandstrom, O.; Lönnerdal, B.; Graverholt, G.; Hernell, O. Effects of α -lactalbumin-enriched formula containing different concentrations of glycomacropeptide on infant nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *87*, 921–928.
- (26) Weizman, Z.; Alsheikh, A. Safety and tolerance of a probiotic formula in early infancy comparing two probiotic agents: a pilot study. *J. Am. Coll. Nutr.* **2006**, *25*, 415–419.
- (27) Clark, R. M.; Fey, M. B.; Jensen, R. G.; Hill, D. W. Desmosterol in human milk. *Lipids* **1983**, *18*, 264–266.
- (28) Kallio, M. J. T.; Siimes, M. A.; Perheentupa, J.; Salmenpera, L.; Miettinen, T. A. Cholesterol and its precursors in human milk during prolonged exclusive breast-feeding. *Am. J. Clin. Nutr.* **1989**, *50*, 782–785.
- (29) Jensen, R. G. The lipids in human milk. *Prog. Lipid Res.* **1996**, *35*, 53–92.
- (30) Fauquant, C.; Briard-Bion, V.; Leconte, N.; Guichardant, M.; Michalski, M. C. Membrane phospholipids and sterols in microfiltered milk fat globules. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, *109*, 1167–1173.
- (31) Morin, P.; Jiménez-Flores, R.; Pouliot, Y. Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globule membranes. *Int. Dairy J.* **2007**, *17*, 1179–1187.
- (32) Lopes, G.; Sousa, C.; Bernardo, J.; Andrade, P. B.; Valentao, P.; Ferreres, F.; Mouga, T. Sterol profiles in 18 macroalgae of the portuguese coast. *J. Phycol.* **2011**, *47*, 1210–1218.
- (33) Souchet, N.; Laplante, S. Seasonal and geographical variations of sterol composition in snow crab hepatopáncreas and pelagic fish viscera from Eastern Quebec. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *147*, 378–386.
- (34) Nes, W. D.; Nichols, S. D. Phytosterol biosynthesis pathway in *Mortierella alpina*. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1716–1721.
- (35) Wang, L.; Chen, W.; Feng, Y.; Ren, Y.; Gu, Z.; Chen, H.; Wang, H.; Thomas, M. J.; Zhang, B.; Berquin, I. M.; Li, Y.; Wu, J.; Zhang, H.; Song, Y.; Liu, X.; Norris, J. S.; Wang, S.; Du, P.; Shen, J.; Wang, N.; Yang, Y.; Wang, W.; Feng, L.; Ratledge, C.; Zhang, H.; Chen, Y. Q. Genome characterization of the oleaginous Fungus *Mortierella alpina*. *PLoS One* **2011**, *6*, e28319.
- (36) Laitinen, K.; Isolauri, E.; Kaipiainen, L.; Gylling, H.; Miettinen, T. A. Plant stanol ester spreads as components of a balanced diet for pregnant and breast-feeding women: evaluation of clinical safety. *Br. J. Nutr.* **2009**, *101*, 1797–1804.

(37) Long, A. C.; Kaiser, J. L.; Katz, G. E. Lipids in infant formulas: Current and future innovations. *Lipid Technol.* **2013**, *25*, 127–129.

(38) Garaiova, I.; Muchová, J.; Najjová, Z.; Mislanová, C.; Oravec, S.; Dukát, A.; Wang, D.; Plummer, S. F.; Duracková, Z. Effect of a plant sterol, fish oil and B vitamin combination on cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic children and adolescents: a pilot study. *Nutr. J.* **2013**, *12*, 7.

(39) Jensen, R. G.; Lammi-Keefe, C. J.; Ferris, A. M.; Jackson, M. B.; Couch, S. C.; Capacchione, C. M.; Ahn, H. S.; Murtaugh, M. Human milk total lipid cholesterol are dependent on interval of sampling during 24 h. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1995**, *20*, 91–94.

(40) Kallio, M. J. T.; Salmenpera, L.; Siimes, M. A.; Perheentupa, J.; Miettinen, T. A. Exclusive breast-feeding and weaning: effect on serum cholesterol and lipoprotein concentrations in infants during the first year of life. *Pediatrics* **1992**, *89*, 663–666.

Table 1. Main Ingredients Relative to Protein and Fat Fractions of Infant Formulas (IFs) Analyzed, Fat Content Determined, and Reconstitution Factors (RF)^a.

IFs	country	ingredients	fat (% w/w)	RF (% w/v)
1	Spain	milk lipids, skimmed milk, vegetable oils (rapeseed, sunflower, oleic sunflower), whey protein, fish oil (DHA), mortierella alpina oil (ARA), emulsifier (soya lecithin)	22.0 ± 2.1	13.5
2		demineralised whey protein, skimmed milk, vegetable oils (palm, rapeseed, coconut, sunflower and mortierella alpine oil (ARA), fish oil, soya lecithin, milk proteins	25.5 ± 1.0	12.9
3		skimmed milk, vegetable oils (palm, palm kernel, rapeseed, sunflower, sunflower high oleic, arachidonic acid), whey protein enriched with α -lactoalbumin, emulsifier (soya lecithin), fish oil (source of DHA)	23.7 ± 0.3	13.5
4		vegetable oils (palm, coconut, rapeseed, high oleic sunflower and sunflower), skimmed milk, whey protein concentrate, fungi and seedweed oils	25.3 ± 0.8	12.9
5		skimmed milk, milk fat, whey enriched in MFGM, whey enriched in α -lactoalbumin, soya lecithin, fish oil, vegetable oils (sunflower, rapeseed, palm, coconut, single cell oil)	27.2 ± 0.6	13.0
6		vegetable oils (sunflower, rapeseed, palm, coconut, single cell oil), skimmed milk, milk fat, whey protein rich in MFGM, whey protein rich in α -lactoalbumin, milk protein, fish oil, emulsifier (soya lecithin)	34.8 ± 0.7	11.4
7	Sweden	whey powder, vegetable oil (palm, canola, coconut, sunflower), skimmed milk powder, fish oil, oil from Mortierella alpina, emulsifier (soy lecithin)	25.8 ± 0.1	12.9
8		organic skimmed milk, organic demineralised whey powder, organic vegetable oils (palm, rapeseed, sunflower), polyunsaturated oils (fish, vegetable)	23.2 ± 0.6	13.0
9		skimmed milk, milk fat, whey enriched in MFGM, whey enriched in α -lactoalbumin, soya lecithin, fish oil, vegetable oils (sunflower, rapeseed, palm, coconut, single cell oil)	27.7 ± 2.2	13.0
10	Czech Rep	demineralised whey powder, vegetable oils, whole milk powder, skimmed milk powder, emulsifier (lecithin)	22.4 ± 2.0	12.9
11		demineralised whey, skimmed milk powder, vegetable oils (palm, rapeseed, sunflower, coconut, microbiologic (ARA)), soya lecithin, fish oil	22.3 ± 2.6	13.5
12		demineralized whey (from milk), vegetable oil, dried skimmed milk, whey protein concentrate (from milk), fish oil, soya lecithin	24.3 ± 0.4	13.5
13		demineralised whey, vegetable oils (palm, rape, coconut, sunflower, oils from microbial resource (ARA)), dried skim milk, concentrated whey milk, soya lecithin	21.4 ± 0.5	13.8

^aDHA: Docosahexaenoic acid. ARA: arachidonic acid. MFGM: Milk fat globule membrane.

Table 2. Animal Sterol Contents (mg/100 mL)^a

IFs	cholesterol	desmosterol	desmosterol (% total animal sterol)	total animal sterol
1	2.63±0.04 ^a	0.308±0.003 ^{a,b}	10.50 ± 0.10	2.93±0.04 ^a
2	1.93±0.04 ^{b,c,d}	0.286±0.003 ^{a,c,d}	12.91 ± 0.14	2.22±0.04 ^{b,c}
3	1.71±0.05 ^{c,d,e}	0.428±0.015 ^e	20.03 ± 0.70	2.14±0.06 ^{b,c,d}
4	1.46±0.06 ^e	0.251±0.009 ^{d,f}	14.64 ± 0.53	1.71±0.06 ^d
5	5.10±0.22 ^f	0.364±0.010 ^g	6.66 ± 0.18	5.46±0.23 ^e
6	4.73±0.13 ^f	0.425±0.013 ^e	8.24±0.25	5.16±0.14 ^e
7	1.72±0.02 ^{c,d,e}	0.27±0.004 ^{c,d,f}	13.37 ± 0.28	1.98±0.01 ^{c,d}
8	1.64±0.03 ^{c,d,e}	0.371±0.011 ^g	18.44 ± 0.55	2.01±0.04 ^{c,d}
9	3.95±0.30 ^g	0.311±0.014 ^{a,b}	7.30 ± 0.33	4.26±0.31 ^f
10	2.03±0.03 ^{b,c}	nd ^b	nd ^b	2.03±0.03 ^{c,d}
11	1.56±0.07 ^{d,e}	0.293±0.002 ^{a,c}	15.82 ± 0.11	1.85±0.07 ^{c,d}
12	1.59±0.04 ^{d,e}	0.248±0.005 ^f	13.53 ± 0.27	1.83±0.043 ^{c,d}
13	2.22±0.09 ^{a,b}	0.340±0.012 ^{b,g}	13.28 ± 0.47	2.56±0.10 ^{a,b}
p ^c	*d	*d		*d

^aValues are Expressed as mean ± standard deviation of three replicates. Different letters in the same column indicate significant differences between infant formulas (IFs). Tukey's HSD Test. ^bNot detectable. ^cANOVA results for each sterols and total animal sterols among IFs. ^d*p < 0.001.

Table 3. Cholesterol and Desmosterol Content in Infant Formulas (IFs) and Human Milk Indicated in Bibliography.

IFs	cholesterol (mg/100 mL)		desmosterol (mg/100 mL)	
	IFs	human milk	human milk	ref
		9.7 – 11.0	0.6 – 1.3	Clark et al. ²⁷
		15.6 – 18.9	1.2 – 1.5	Kallio et al. ²⁸
		10.0 – 20.0		Jensen ²⁹
1.16 – 4.64		12.0 – 16.6		Huisman et al. ¹²
0.3 – 25.8		6.5 – 18.4		Scopesi et al. ¹³
		9.0 – 15.0		Koletzko et al. ⁷
7.5 – 12.8		9.5 – 29.2	0.5 – 3.1	Ramalho et al. ¹⁴
0.93 – 5.45		4.3 – 21.8 ^a		Kamelska et al. ⁹

^aDetermined by ATR-FTIR (attenuated total reflectance Fourier transform infrared) spectroscopy.

Table 4. Phytosterol and Phytostanol Contents (mg/100 mL)^a

IFs	brassicasterol	campesterol	stigmasterol	β -sitosterol	sitostanol	total plant sterol
1	0.21±0.02 ^{a,b,c} (6.01±5.68)	0.96±0.02 ^{a,b,c} (25.73±0.76)	0.36±0.04 ^{a,b,c} (9.57±0.95)	2.17±0.07 ^{a,b} (57.73±0.72)	0.05±0.004 ^a (1.28±0.11)	3.75±0.07 ^{a,b}
2	0.25±0.01 ^{c,d} (5.62±0.03)	1.13±0.05 ^{c,d} (25.41±0.08)	0.43±0.02 ^{a,b,c} (9.65±0.09)	2.61±0.11 ^{a,b,c} (58.55±0.12)	0.03±0.003 ^a (1.09±0.04)	4.46±0.19 ^{b,c}
3	0.14±0.01 ^e (4.65±0.11)	0.72±0.04 ^e (23.29±0.23)	0.39±0.05 ^{a,b,c} (12.43±0.75)	1.82±0.12 ^a (58.55±0.42)	0.03±0.002 ^a (1.09±0.04)	3.11±0.22 ^a
4	0.16±0.01 ^{e,f} (4.53±0.12)	0.81±0.05 ^{a,e} (23.12±0.16)	0.39±0.02 ^{a,b,c} (11.16±0.06)	2.09±0.11 ^{a,b} (59.88±0.14)	0.05±0.001 ^a (1.31±0.09)	3.49±0.19 ^{a,b}
5	0.25±0.01 ^{c,d} (4.98±0.32)	1.15±0.07 ^d (22.97±0.51)	0.50±0.04 ^{b,c} (10.08±0.14)	3.01±0.12 ^c (60.17±0.73)	0.09±0.006 ^{a,b} (1.80±0.20)	5.0±0.29 ^c
6	0.19±0.01 ^{a,b,f} (4.60±0.09)	0.83±0.03 ^{a,e} (19.84±0.67)	0.53±0.05 ^c (12.56±0.42)	2.61±0.16 ^{a,b,c} (62.03±0.13)	0.04±0.01 ^a (0.98±0.21)	4.21±0.25 ^{a,b,c}
7	0.20±0.01 ^{a,b} (5.52±0.20)	0.90±0.01 ^{a,b,e} (24.70±1.21)	0.38±0.04 ^{a,b,c} (10.50±0.51)	2.14±0.16 ^{a,b} (58.42±1.08)	0.03±0.02 ^a (0.86±0.45)	3.66±0.21 ^{a,b}
8	0.17±0.01 ^{a,e,f} (4.32±0.35)	0.96±0.06 ^{a,b,c} (23.73±1.08)	0.40±0.04 ^{a,b,c} (9.95±0.95)	2.45±0.28 ^{a,b,c} (60.34±1.60)	0.07±0.04 ^{a,b} (1.66±0.77)	4.05±0.38 ^{a,b,c}
9	0.21±0.01 ^{a,b} (5.73±0.09)	0.82±0.04 ^{a,e} (22.50±0.53)	0.35±0.01 ^{a,b,c} (9.64±0.09)	2.12±0.09 ^{a,b} (58.23±0.23)	0.14±0.03 ^b (3.89±0.71)	3.65±0.14 ^{a,b}
10	0.18±0.01 ^{a,e,f} (5.49±0.28)	0.78±0.01 ^{a,e} (24.48±0.73)	0.27±0.01 ^a (8.43±0.50)	1.89±0.05 ^{a,b} (59.24±0.79)	0.08±0.06 ^{a,b} (2.36±1.73)	3.20±0.08 ^a
11	0.22±0.01 ^{b,c} (5.41±0.60)	1.02±0.02 ^{b,c,d} (24.89±2.41)	0.35±0.11 ^{a,b} (8.31±1.74)	2.48±0.31 ^{a,b,c} (60.18±1.54)	0.05±0.02 ^a (1.21±0.53)	4.12±0.41 ^{a,b,c}
12	0.23±0.01 ^{b,c} (5.84±0.37)	1.06±0.07 ^{b,c,d} (26.85±1.48)	0.29±0.01 ^a (7.41±0.74)	2.34±0.33 ^{a,b,c} (58.67±1.72)	0.05±0.04 ^{a,b} (1.24±0.85)	3.98±0.45 ^{a,b,c}
13	0.28±0.02 ^d (6.32±0.64)	1.08±0.09 ^{b,c,d} (23.64±1.82)	0.35±0.08 ^{a,b} (7.87±0.98)	2.65±0.40 ^{b,c} (60.29±1.44)	0.04±0.01 ^a (0.89±0.04)	4.39±0.57 ^{b,c}
p ^b	*c	*c	*c	*c	*c	*c

^aValues are expressed as mean ± standard deviation of three replicates. Relative percentage to total plant sterols content is indicated in parentheses. Different letters in the same column indicate significant differences between infant formulas (IFs). Tukey's HSD test. ^bANOVA results for each sterol and total plant sterols among IFs. ^c*p < 0.001.

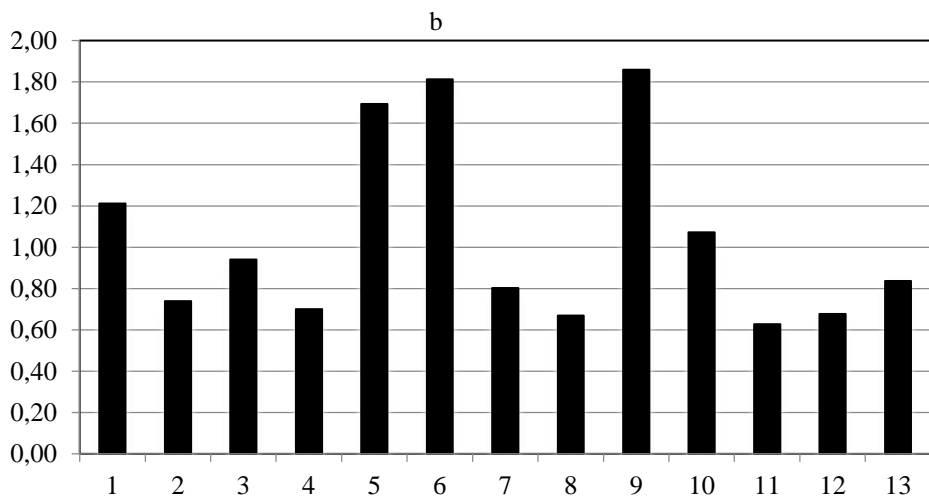
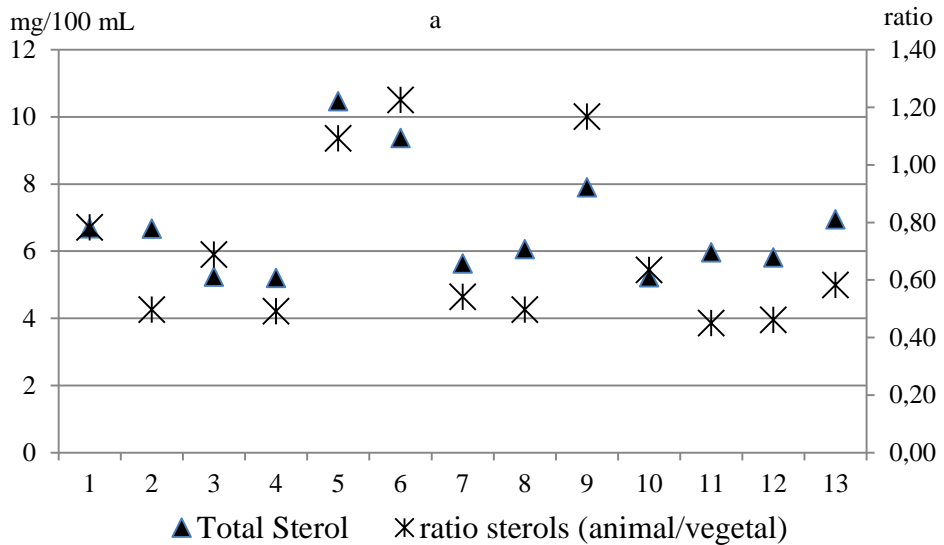


Figure 1. Sterol contents: (a) total sterol contents and ratio of animal and vegetal sterols; (b) ratio cholesterol and β -sitosterol.

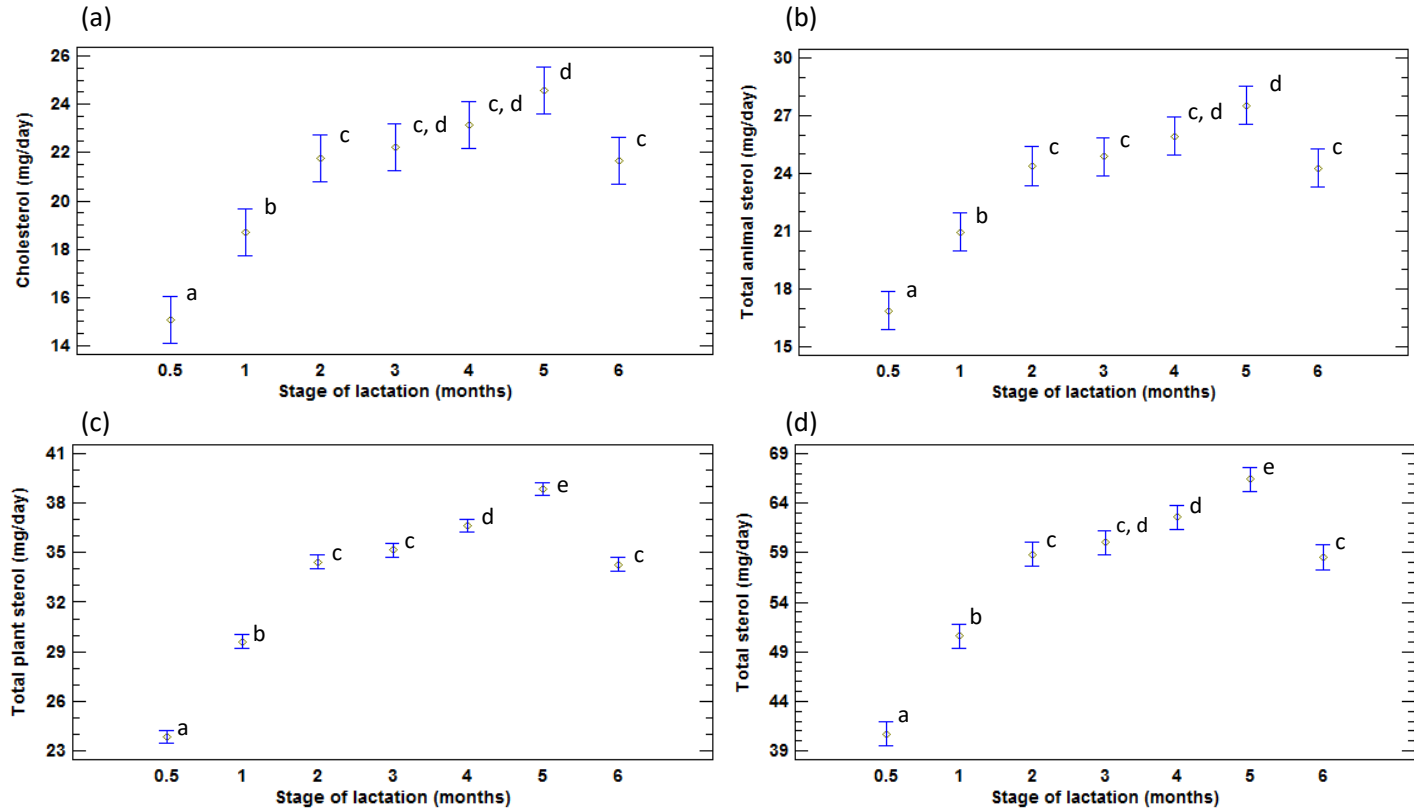


Figure 2. Average intakes of cholesterol (a), animal sterol (b), plant sterol (c) and total sterol (d). Different superscript letters denote significant differences ($p < 0.001$) between lactation stages. Tukey's HSD test.

4.-Addition of milk fat globule membrane as an ingredient of infant formulas for resembling the polar lipids of human milk

Lorena Claumarchirant^a, Antonio Cilla^a, Esther Matencio^b, Luis Manuel Sanchez-Siles^b, Pilar Castro-Gomez^c, Javier Fontecha^c, Amparo Alegría^a, María Jesús Lagarda^{a*}

^aNutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 - Burjassot (Valencia), Spain

^bHero Institute of Infant Nutrition, Hero Group, Avda. Murcia 1, 30820 Alcantarilla, Murcia, Spain.

³Institute of Food Science Research (CIAL; CSIC-UAM). Lipid Group. Madrid Autonomous University, c/ Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, Spain.

*To whom correspondence should be addressed (telephone +34-963544909; fax +34-963544954; e-mail: m.j.lagarda@uv.es)

International Dairy Journal, 2016, 61, 228-238

ABSTRACT

Polar lipid (PL) contents in human milk (HM) from two different geographic zones in Spain (central and coastal) were determined. These PLs were also analysed in several infant formulas (IFs), three of which contained milk fat globule membrane (MFGM), an ingredient used to resemble the PL profile of HM. Total PL in HM decreased significantly ($p < 0.05$) from transitional milk ($48.62 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$) to 6 months ($28.66 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$). In HM, sphingomyelin was the most abundant PL, followed by phosphatidylethanolamine; in IFs the most abundant PL was phosphatidylethanolamine. Only IFs with MFGM ($54.79 - 58.07 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$) could supply the total and individual PL content present in all lactation periods, with the exception of sphingomyelin, which did not match the content in transitional milk. PL intake by infants fed HM or IFs was determined to be $96-306$ and $152-575 \text{ mg day}^{-1}$, respectively.

1. Introduction

Human milk (HM) is considered the optimal food for infants during the first 6 months of life (Kramer & Kakuma, 2001). The lipid fraction, in addition to representing almost 50% of the dietary calories, provides bioactive compounds localised in the fat globules as polar lipids (PLs), cholesterol, enzymes, proteins, glycoproteins and glycosphingolipids (cerebrosides and gangliosides) (German & Dillard, 2006).

The PLs phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS) and sphingomyelin (SM) are quantitatively minor constituents of HM fat globules, but they have interesting nutritional properties and are important structural components. Furthermore, they also afford long chain polyunsaturated fatty acids, which play an essential role in the growth and brain development of newborns infants (Wang et al., 2000). Of these PLs, the PC and SM contents are considered to be of great importance for the development of infants, acting as precursors of intracellular messengers such as ceramides and diacylglycerols (Zeisel & Blusztajn, 1994). Furthermore, approximately 17% of the total choline received by the newborn infant comes from these PLs (PC and SM), while the remaining choline is found in free form as phosphocholine and glycerophosphocholine (Holmes, Snodgrass, & Iles, 2000; Holmes-McNary, Wei-Ling Cheng, Mar, Fussell, & Zeisel, 1996; Ilcol, Ozbek, Hamurtekin, & Ulus, 2005). Choline is an essential nutrient involved in several biological processes, mainly metabolism, but also membrane construction in the brain and nervous tissue (Zeisel, 2000). The choline content is secreted into HM from the maternal circulation, and increases during lactation, because neonates require large amounts of this compound for rapid organ growth and membrane biosynthesis. In this regard, the recommended choline intake in the postnatal period is about 125 and 150 mg day⁻¹ at 0-6months and 6-12 months, respectively (IOM, 2006).

Several authors have reported the PL content in HM in the different stages of lactation in Asian women (Giuffrida et al., 2013; Thakkar et al., 2013; Wang et al., 2000) and in women in northern Europe (Garcia et al., 2012; Harzer, Haug, Dieterich, & Gentner, 1983; Lopez & Ménard, 2011; Zou et al., 2012). Nevertheless, we found only one study in southern Europe focussing on the content and composition of PLs in the different stages of lactation (Sala-Vila, Castellote, Rodriguez-Palmero, Campoy, & López-Sabater, 2005).

When breastfeeding is not possible, use is made of infant formulas (IFs) with macronutrient and micronutrient compositions as similar as possible to those of HM. The composition of HM initially served as a basis for the development of IFs, particularly its lipid composition, which is of great importance for visual acuity (Birch, Birch, Hoffman, & Uauy, 1992), cognitive performance, proper growth and development of the immune system (Koletzko, Agostoni, Bergmann, Ritzenthaler, & Shamir, 2011). Several studies have determined the PL contents in IFs (i.e., adapted, partially adapted, special formulas, bovine-derived formulas and soy-derived formulas) using different analytical methods such as high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD; Braun, Flück, Cotting, Monard, & Giuffrida, 2010; Sala-Vila, Castellote-Bargalló, Rodríguez-Palmero-Seuma, & López-Sabater, 2003), thin layer chromatography-(TLC-) densitometry (Ilcol et al., 2005; Zeisel, Char, & Sheard, 1986), HPLC-UV (Kynast & Schmitz, 1988) and HPLC-tandem mass spectrometry (Fong, Ma, & Norris, 2013), among others (Holmes et al., 2000; Holmes-McNary et al., 1996), and some have compared the contents with HM. Recently, a review of different aspects of PLs (contents, biological effects, methodology and method validation) in IFs and HM has been published (Cilla, Diego-Quintaes, Barberá, & Alegría, 2015).

Recently, studies on IF supplemented with MFGM have shown promising results on neurodevelopment (Timby, Domellöf, Hernell, Lönnerdal, & Domellöf, 2014) and defence against infections (Timby et al., 2015). The addition of MFGM to IF can vary the PL content (phospholipids and SM) in IFs. This study for the first

time evaluates the PL content and intakes supplied by these IFs with MFGM, to determine whether they resemble those provided by HM. In addition, HM is a dynamic matrix whose fat composition is influenced by factors such as maternal diets, the stage of lactation, the duration of pregnancy and genetics, in addition to other potential associated factors such as the geographical setting, cultural traditions and socioeconomic status (Pita, Morales, Sánchez-Pozo, Martínez-Valverde, & Gil, 1985; Smit, Martini, Mulder, Boersma, & Muskiet, 2002). Based on the above, we considered it of interest to investigate the PL content in the course of lactation (from colostrum to mature milk) and in two different zones in Spain (central and coastal), with a view to determining whether the use of MFGM is able to improve the resemblance between IFs and HM.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

The solvents chloroform, methanol, isooctane (2,2,4-trimethylpentane), isopropanol and tetrahydrofuran (THF), of HPLC grade, were purchased from LABSCAN (Dublin, Ireland). Triethylamine (TEA) (purity 99.5%) and formic acid (purity 98%) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA). Methanol (analytical grade), sodium chloride and anhydrous sodium sulphate were purchased from Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, USA), and dichloromethane (DCM) (analytical grade) from Scharlau Chemie, S.A. (Sentmenat, Barcelona, Spain). Ultrapure water was obtained by means of a Millipore Q water purification system (Milford, MA, USA). Standards of PC from egg yolk and PE from bovine brain (purity 99%), PI ammonium salt solution from soybean (purity 99.5%), PS sodium salt from bovine brain (purity 97.6%) and SM from chicken egg yolk (purity 100%) were used to obtain calibration curves and identify and quantify each PL (Sigma-Aldrich).

2.2. Samples

Samples of HM were obtained from 65 volunteer mothers of term infants between 18 and 40 years of age who were apparently healthy, non-smokers, and

without caloric restrictions. Each milk sample obtained was immediately stored in the refrigerator for a few hours until arrival in the laboratory, where it was stored in a freezer (-20 °C) until preparation of the corresponding pools. These pools were obtained from different stages of lactation (colostrum, transition, 1, 3, 6, 9 and 12 months) and three different cities of Spain (Madrid, Murcia and Valencia). The number of individuals included in pools of each city varied according to the period of study: Madrid (20-22) and Valencia and Murcia (8-22). For each pool, similar volumes of each donor were homogenised to obtain representative pools. Due to the difficulties for collecting the samples in the periods of colostrum, transition, 9 and 12 months in Valencia and Murcia, it was only performed a single pool for each of these periods. The study protocol was approved by the Clinical Research Ethic Committee and breastfeeding Committee of Puerta de Hierro-Majadahonda University Hospital (Madrid, Spain). All subjects were informed and gave their signed consent before inclusion in the study.

Thirteen powdered IFs of a single batch each, marketed in three European countries (Sweden, the Czech Republic and Spain), for infants between 0 and 6 months of age, were analysed. The labelstated compositions referred to compounds of the protein and fat fractions as a source of PL are summarised in Table 1. It should be mentioned that in addition to vegetable oils and fish oils commonly added to these products, some formulas (1, 5, 6 and 9) contain milk fat with or without whey enriched with MFGM.

2.3. Extraction of the lipid fraction of the samples

Extraction of the PLs of HM and IFs (previously reconstituted as indicated in Table 1) in triplicate was carried out according to the method of Castro-Gómez et al. (2014). Briefly, 3 mL of sample was weighed, and 22.5 mL DCM/methanol (2:1) was added, vortexed for 1 min and then kept slightly shaking for 30 min at room temperature. After centrifugation for 5 min at 1809 x g (0 °C), the lower DCM layer was released and the process was repeated adding 18 mL of DCM/methanol (2:1) to the upper (methanol) and interface phase. The two DCM phases were pooled and 4.5

mL 0.8% (w/v) NaCl was added, vortexed for 1 min and refrigerated (4 °C) overnight. Subsequently, centrifugation was carried out for 5 min at 1809 x g (0 °C), and the lower DCM layer was filtered (PVDF, 17 mm, 0.45 mm Synta, Madrid, Spain), then evaporated using a rotary vacuum evaporator at 45 °C. Separated lipids were weighed and dissolved in 1 mL of DCM, stored in amber vials, exposed to a stream of N₂ and frozen at -20 °C. Samples were evaporated and dissolved in DCM prior to analysis, at concentrations of 5 mg mL⁻¹ and 30 mg mL⁻¹ for lipid profiles and PL analysis, respectively.

2.4. Chromatographic determinations using HPLC-ELSD

Separation of PLs was accomplished with an Agilent Technologies, model 1200 HPLC system (Palo Alto, CA, USA) coupled to ELSD (SEDERE, SEDEX 85 model, Alfortville Cedex, France), using pre-filtered compressed air as the nebulising gas at a pressure of 3.5 bar, a temperature of 60 °C and a gain set to 3. The drift tube temperature was 90 °C. Two Zorbax Rx-SIL columns (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) measuring 250 mm x 4.5 mm and with a 5 mm particle size were used in series with a pre-column of the same packing. A volume of 50 µL of each concentration was injected. Solvent gradient was as detailed in Castro-Gómez et al. (2014). Analyses were carried out with freshly prepared solvents.

The PLs were identified and quantified by comparing with standards and confirmed with an internal reference material such as buttermilk. For quantification, calibration curves at different concentrations of PC (9.5-706.2 mg mL⁻¹), PE (9.2-1019.7 mg mL⁻¹), PI (9-663.7 mg mL⁻¹), PS (8.8-651.0 mg mL⁻¹) and SM (9.3-687.0 mg mL⁻¹) were performed. The calibration curves and correlation coefficients (r) obtained were: PC, $y = 24.97x - 1000.20$ (r = 0.98); PE, $y = 4.11x - 184.96$ (r = 0.99); PI, $y = 16.25x - 614.10$ (r = 0.98); PS, $y = 20.05x - 791.66$ (r = 0.98); SM, $y = 3.48x - 147.78$ (r = 0.98).

2.5. Estimation of polar lipid intakes from human milk and infant formulas

2.5.1. Human milk

To calculate intake during the first year of life, the average intake (g day^{-1}) obtained from the literature and corresponding to a total of 2156 healthy infants born at term was used (Da Costa et al., 2010; Haisma et al., 2003; Neville et al., 1988; Nielsen et al., 2011; Reilly, Ashworth, & Wells, 2005; Wells et al., 2012; Wong, Hachey, Insull, Opekun, & Klein, 1993). The mean volumes (g day^{-1}) of the HM ingested by these newborn infants were evaluated in 7 different stages of lactation: colostrum 309 ± 191 ($n = 13$); transition 586 ± 44 ($n = 13$); 1 month 675 ± 36 ($n = 750$); 3 months 811 ± 67 ($n = 1884$); 6 months 845 ± 99 ($n = 1045$); 9 months 720 ± 205 ($n = 750$); and 12 months 599 ± 277 ($n = 750$).

2.5.2. Infant formulas

To calculate intake during the first 6 months of life, the average intake (mL day^{-1}) obtained from 8 different studies and corresponding to a total of 1113 healthy infants born at term was used according to Claumarchirant, Matencio, Sanchez-Siles, Alegría, and Lagarda (2015).

2.6. Statistical analysis

Two-way, stages of lactation (0.5, 1, 3 and 6 months) and geographic zones [central (Madrid) and coastal (Valencia and Murcia)] analysis of variance (ANOVA) and Tukey's HSD test ($p < 0.05$) were applied to total and individual PL contents in HM. The significance of interactions was also included for individual PL contents. Due to the known different composition of colostrum and the lower PL contents found, this phase was omitted from the statistical analysis. Also, the stages 9 and 12 months were omitted from the statistical analysis because after the sixth month, complementary feeding was introduced. Regression analysis was performed to evaluate total PL in the stages of lactation in HM.

ANOVA and Tukey's HSD test ($p < 0.05$) were applied to total and individual PL contents to evaluate possible differences according to the type of IF involved.

The same statistical analysis was applied to evaluate lipid classes and daily intake of SM, PC and total PL in different lactation stages from HM and IFs.

The Statgraphics Plus version 5.1 statistical package (Rockville, MD, USA) was used.

3. Results and discussion

Neutral lipids (mainly triacylglycerides, TAG, from the core of milk fat globules) and glycerophospholipids PE, PI, PS and PC, as well as SM (the main sphingolipid in HM) were determined.

3.1. Neutral lipid classes in human milk and infant formulas using HPLC-ELSD

The relative percentages of lipid classes in HM obtained by HPLC-ELSD are shown in Fig. 1A. As expected, the most abundant neutral lipid class was TAG, which represented between 92 and 98% of the total lipids. As can be observed in the figure, the TAG content was higher ($p < 0.05$) in colostrum (~98%) than in human milk samples from 0.5 to 6 months, which showed TAG concentrations of ~95%. In relation to this, the human milk samples of 9 and 12 months provided the lowest TAG concentrations (92-93%), this decrease being related to the increase in diacylglycerides (DAG) with respect to the other samples (see Fig. 1A). It is remarkable that TAG eluted in four different peaks, a fact that can be attributed to long- and short-chain TAG moieties (Rodríguez-Alcalá & Fontecha, 2010). The rest of the neutral lipids comprising diacylglycerides (DAG) that eluted in three peaks, cholesterol and free fatty acids, monoacylglycerides (MAG) and cholesterol ester accounted for between 0.67 and 6.94%. In the case of IFs, Fig. 1B shows several IFs selected according to their different sources of fat, and in which TAG were also the most abundant neutral lipids, reaching a range of 97-98%. This variation could be attributed to the different ingredients added to the IFs, but the statistically significant differences between them are not relevant. Of note is the observation that the range in the sum of DAG, cholesterol ester, cholesterol, free fatty acids and MAG of all

IFs was lower than that observed in HM. The sums of these minor neutral lipids were between 0.89 and 2.08%.

3.2. Total polar lipids in human milk and infant formulas

3.2.1. Human milk

Polar lipids are, quantitatively, minor constituents of human milk fat globules, and in this study they were represented by phospholipids and SM, which varied during the course of lactation (maximised at the colostrum and transitional stages), and in mature HM represented between 0.97 and 1.31% of the total fat. These values are in accordance with the results obtained by Garcia et al. (2012) (0.4-1.4% in mature HM).

Phosphatidylethanolamine, PI and PS eluted as two peaks; PC eluted as four peaks; and SM eluted as 5 peaks because of the separation of molecular species. The elution of 5 peaks for SM has already been reported and interpreted as the presence of various sphingoloid bases and fatty acids (Fong, Norris, & MacGibbon, 2007; Lopez et al., 2008). The elution of PC as four peaks with different relative intensities has previously been reported by Lopez and Ménard (2011) and Lopez et al. (2008), and has been related to changes in the fatty acid composition of polar lipids as a result of diets. Braun et al. (2010), within the same type of PL also found multiple peaks, attributed to different molecular structures related to the composition of fatty acids.

The amounts and relative percentages of total PL in colostrum (0 months), transitional milk (0.5 months) and mature milk (1, 3, 6, 9 and 12 months) are presented in Table 2. Regarding the lactation period from 0 to 6 months, the total PL contents ranged from 26.56 to 43.70 mg 100 mL⁻¹ of milk for the central zone and from 28.12 to 53.53 mg 100 mL⁻¹ for the coastal zone, the minimum concentration being recorded at 6 months and the maximum in transition milk samples (see Table 2). The amount of total PL found in this study for HM falls within the range of the data reported in the literature (15.3-81.5 mg 100 mL⁻¹; Garcia et al., 2012; Giuffrida et al., 2013; Harzer et al., 1983), but is higher than reported by other authors (15.0-

24.2 mg 100 mL⁻¹; Bitman, Wood, Mehta, Hamosh, & Hamosh, 1984; Lopez & Ménard, 2011; Russo et al., 2013; Thakkar et al., 2013; Zou et al., 2012). This discrepancy could be due to factors linked to geographical zone, eating habits, cultural traditions and socioeconomic status, or type of sample collection (a single sample per day or different samples per day), among others. Furthermore, Sala-Vila et al. (2005), in mature HM from Granada (southern Spain), recorded lower total polar lipid contents (147 ± 23 nmol mL⁻¹) than in our study (357.4 - 567.6 nmol mL⁻¹), which could be due to the timing of sample collection, because these authors obtained their samples at the beginning of each feeding (foremilk), and the lipid contents are lower in foremilk than in hindmilk. This variability is also explained in the recent review published by Cilla et al. (2015).

Independently of the geographic zone involved, significant differences in total PL amounts were found between all lactation periods (48.62 ± 5.82 , 39.93 ± 2.49 , 34.71 ± 2.19 and 28.66 ± 3.35 mg 100 mL⁻¹ for transitional milk and milk at 1, 3 and 6 months, respectively), the highest values corresponding to transitional milk. This could be due to the variation of total lipids, which decreases with lactation (4.07 ± 0.87 , 3.58 ± 0.39 , 3.19 ± 0.08 , 2.78 ± 0.39 , 2.35 ± 0.04 and 2.98 ± 0.08 g 100 mL⁻¹ for transitional milk and milk at 1, 3, 6, 9 and 12 months, respectively). From 6 months post-partum onwards, the human milk contains less amount of fat and so, the amount PL was lower. Moreover, according to Sala-Vila et al. (2005), this finding can be explained by a decrease in PL biosynthesis in the mammary gland in the later stages of lactation. However, Harzer et al. (1983) and Shoji et al. (2006) found that the concentration of total PL remained constant in the course of lactation. Shoji et al. (2006) also evaluated the concentration of total PL in HM of preterm infants, which was likewise found to remain constant during lactation. Considering the content of colostrums in our study (34.35 ± 4.04 mg 100 mL⁻¹), we observed an increase in total PL content during the course from colostrum to transitional stage (maximum content), followed by a smooth decrease e in concordance with Sala-Vila et al. (2005) and Zou et al. (2012). These data could be explained by the relationship between the PL contents and the diameter of the milk fat globule, showing the PL

contents to be negatively correlated to the diameter of milk fat globule (transitional milk < mature milk < colostrum) (Lopez et al., 2011).

Independently of the lactation period involved, significant differences were found between the central zone (34.88-37.79 mg 100 mL⁻¹) and the coastal zone (38.47-40.78 mg 100 mL⁻¹). However, given the variability that characterises milk, these statistically significant differences are of no nutritional relevance (<10%).

Significant interactions ($p < 0.05$) between the geographic zone and lactation time were found, as can be seen in Fig. 2A. We observed a more marked decline in the first three months, followed by stabilisation from 3 to 6 months in the coastal zone. In the central zone, this decline was much lower in the first three months and was more pronounced from 3 to 6 months. The decrease from transitional milk to mature milk (6 months) has been described by a mathematical prediction model (multiplicative): $\text{total PL} = 3.72195 \times x^{-1/5}$ ($R^2 = 0.8025$), where x is the month of lactation. However, Bitman et al. (1984) described the decline in percentage PL during the first three months of life by means of a linear regression function, and Harzer et al. (1983) were unable to express the course of PL concentration by means of any mathematical equation offering a high correlation coefficient.

3.2.2. Infant formulas

The amounts and relative percentages of PLs in 13 IFs for infants between 0 and 6 months of age are presented in Table 3. The total PL ranged between 25.11 and 58.07 mg 100 mL⁻¹, according to the amount allowed by Regulation (EU) 2016/127 (EU, 2016; 2 g L⁻¹), and represented between 0.8 and 1.8% of the total fat. This interval is more extensive than that found in HM, which may be due to the great variety of IFs found in Europe (Spain, Sweden, Czech Republic). These infant formulas can be manufactured in different ways and with varied ingredients. In our study, IFs 9 (marketed in Sweden) and 5 and 6 (marketed in Spain) showed the highest total PL contents (>54 mg 100 mL⁻¹). The formulation of these IFs includes whey protein enriched with MFGM, a good source of PL. Average values of PL in IF with (5, 6 and 9) and without (1-4, 7-8, 10-13) MFGM were calculated and

compared with HM concentration in different lactation periods (see Fig. 3). To the best of our knowledge, this is the first report that IFs with MFGM could supply the content present in HM throughout the lactation period (from 0 to 6 months). In contrast, the IFs without MFGM in their formulation would only supply a correct content of PLs at 6 months of lactation (29.36 mg 100 mL⁻¹).

Our results (185-492 mg 100 g⁻¹ IF in powder form) are consistent with the total PL data reported by Fong et al. (2013) (228-304 mg 100 g⁻¹) and slightly higher than Braun et al. (2010) (145-171 mg 100 g⁻¹). The total PL values reported in IFs (adapted) by Kynast and Schmitz (1988) were 15.7-30.8 mg 100 g⁻¹, but these values refer to reconstituted IF rather than the powder form, and would agree with our results when appropriately calculated (24-55 mg 100 g⁻¹ reconstituted IF).

3.3. Polar lipid profiles

3.3.1. Human milk

The main PL classes in human milk were SM (28-36%) and PE (22-33%). In general, SM (ranging from 7.96 to 16.49 mg 100 mL⁻¹) was the most abundant PL, followed by PE (6.49-15.90 mg 100 mL⁻¹), PC (3.63-8.09 mg 100 mL⁻¹), PS (3.25-6.74 mg 100 mL⁻¹) and PI (3.07-6.32 mg 100 mL⁻¹). In previous studies (Bitman et al., 1984; Garcia et al., 2012; Harzer et al., 1983; Lopez & Ménard, 2011; Sala-Vila et al., 2005; Shoji et al., 2006; Zou et al., 2012), the main PLs in HM, irrespective of the lactation stage, were SM and PC, followed by PE (12-25%). This is in contrast to our own study, in which SM and PE were the main PLs, irrespective of lactation stage and geographic zone. Nevertheless, some authors agree with our PL profile (Benoit et al., 2010; Giuffrida et al., 2013; Thakkar et al., 2013; Wang et al., 2000). The PE percentage (~30%) was higher than in other studies, where the analysed PE probably included lysophosphatidyl-ethanolamine (Van Beusekom, Martini, Rutgers, Boersma, & Muskiet, 1990). Only Wang et al. (2000) found contents of PE (36%) in agreement with our own data. In the present study, the sum of the profile of PC and SM ranged between 43 and 50%, which is lower than in other studies (>57%) (Bitman et al., 1984; Harzer et al., 1983), and higher than the percentage

(39.5%) reported by Zou et al. (2012). Both SM and PC contain choline, which is required for rapid organ growth and membrane biosynthesis; hence, the content of PC and SM in HM is of great importance for the development of infants (Zou et al., 2012).

The two-way ANOVA results show the PL contents in different stages of lactation to be significantly different ($0.5 > 1 > 3 > 6$ months) ($p < 0.05$), independently of the geographic zone involved. Moreover, the PL contents in colostrum (0 months) were lower than in transitional milk (0.5 months).

Other authors (Holmes et al., 2000; Sala-Vila et al., 2005; Shoji et al., 2006; Thakkar et al., 2013; Zou et al., 2012) have described some particularities with respect to our study regarding the concentration of PLs during lactation. Zou et al. (2012), in coincidence with our own findings, recorded a decrease in PC and SM from transition milk, and observed an increase in early lactation (from colostrum to transitional milk). However, Holmes et al. (2000) and Shoji et al. (2006) observed no variation in the contents of PC and SM during the evolution from colostrum to mature milk. Nevertheless, Bitman et al. (1984) reported a decrease in SM from colostrum to mature milk, and a decrease in PC from colostrum to transitional milk that continued with a slight increase until mature HM. Furthermore, Sala-Vila et al. (2005) reported a decrease in PC and no modifications in SM. With regard to the evolution of mature milk, Bitman et al. (1984) observed that SM remained constant and PC decreased slightly, while Thakkar et al. (2013) found the SM content to exhibit an increasing trend and PC a decreasing trend over the stages of lactation. This change may be due to the influence of infant gender, with higher contents in male infants (Thakkar et al., 2013). In the case of HM from mothers giving birth to pre-term infants, Bitman et al. (1984) and Shoji et al. (2006) observed a decrease in PC and an increase in SM during the evolution from colostrum to mature milk.

With respect to the presence of choline and choline compounds in HM, different concentrations have been recorded, depending on the lactation time. For example, milk produced between 12 and 28 days after birth contains more choline and choline

compounds; glycerophosphocholine, phosphocholine and free choline being the main representatives (Ilcol et al., 2005). Subsequently, in the course from transition milk to mature milk, these contents are seen to decrease, showing a slight increase at 12 months for SM (Table 2). The mechanism by which SM and PC vary during lactation is unclear, but might involve differences in activity of the mammary gland (Shoji et al., 2006). Whether or not these changes are of nutritional significance to the infant remains uncertain. Nevertheless, in this regard, Tigney (1956) showed the SM and PE contents of the human brain to increase significantly during the first year of life. Consequently, the requirements of these PLs increase and must be covered by the diet of the infant. In this context, the tendency towards increased SM and PC in prolonged lactation (9 and 12 months) may represent a compensatory mechanism, acting as a choline supplier for ensuring optimal development and function of the newborn infant.

Furthermore, and independently of the lactation period involved, the contents of all the PLs analysed were significantly lower ($p < 0.05$) in the central zone than in the coastal zone, with the exception of SM and PE that showed no significant differences between the two geographical settings.

As can be seen in Fig. 2, significant interactions ($p < 0.05$) between geographical zone and lactation time were found in all cases. These contents of PL could be related with the fat content; so, the higher the fat content the higher the PL content. In the periods of transition and 6 months, coastal zone shows higher PL contents than central zone as well as higher lipidic content (Table 2). However, at 1 and 3 months, since there were minimal or no differences in the fat content, PL values were similar.

Despite these interactions, the PE (Fig. 2B) and SM (Fig. 2F) contents showed a similar tendency, coinciding with the observations for total PL. The PI, PS and PC contents (Fig. 2C-E, respectively) evolved a little differently according to lactation stage, i.e., the coastal zone showed a progressive decrease, while the central zone remained constant until the third month, followed by a decrease from months 3 to 6.

3.3.2. Infant formulas

In the same way as in HM, the main PL classes in IFs were PE (22-45%) and SM (21-27%). In contrast to HM, however, the most abundant PL was PE (ranging from 6.24 to 26.23 mg 100 mL⁻¹), followed by SM (6.01-13.73 mg 100 mL⁻¹), PC (4.56-8.74 mg 100 mL⁻¹), PS (3.79-5.94 mg 100 mL⁻¹) and PI (3.72-5.64 mg 100 mL⁻¹). In general, these contents are in the order of those found in HM.

Our PL contents are consistent with those analysed by Braun et al. (2010) and Fong et al. (2013), with the exception of an IF, analysed by the latter group, that had added powder colostrum and yielded PI, PC and SM values higher than our own.

The IFs with the highest PL contents were formulas 5, 6 and 9, which were produced with MFGM (a good source of phospholipids and sphingolipids). These three IFs showed significant differences ($p < 0.05$) versus the rest of IFs, which presented lower contents (PE, 6.24-15.09 mg 100 mL⁻¹; PI, 3.72-5.03 mg 100 mL⁻¹; PS, 3.79-4.90 mg 100 mL⁻¹; PC, 4.56-6.54 mg 100 mL⁻¹; SM, 6.01-9.90 mg 100 mL⁻¹). However, in the case of PI, no such differences between the IFs of greater content and the rest were observed. Furthermore, these three IFs (5, 6 and 9) showed no significant differences among each other in relation to PC and SM. Of note is the fact that the addition of this ingredient increased the PC and PE contents, and these were similar to the contents found in HM in all lactation periods. However, IFs without MFGM would only supply the lower range contents present in HM corresponding to 6 months for PE and colostrum, and to 3 and 6 months for PC (see Fig. 3). In addition, MFGM addition increased the SM contents in IFs with MFGM, resembling the contents present in HM in all lactation periods, except transition milk. Nevertheless, the SM content in IFs without this ingredient was lower than that found in HM (see Fig. 3).

The sum of PC and SM was between 36 and 45%, which was generally lower than the content in HM. Only three IFs (8, 10 and 12) showed a proportion of PLs with choline (PC and SM) in the order of that found in human milk (>43%), with a higher proportion of SM than PE, as in HM.

On comparing the contents of PLs containing choline (PC and SM) with the contents reported by other authors (Holmes et al., 2000; Ilcol et al., 2005; Zeisel et al., 1986), we found our PC contents to be similar to those of other studies (1.7-9.9 mg 100 mL⁻¹). However, the SM contents were greater than in other studies (0.4-6.6 mg 100 mL⁻¹). On establishing comparisons with the results referred to HM, the PC contents were seen to be of the same order. Nevertheless, only half of the IFs were in the lower range obtained for HM.

In this study we determined the total PL, PC and SM daily intakes. The latter two intakes were calculated due to the choline contributions, which as mentioned above have nutritional implications for the infant, and because SM contributes to myelination of the developing central nervous system (Schneider & Schmitt, 2013). Both geographic zones showed minimum total PL intake for colostrum (96 mg day⁻¹ for the coastal zone and 112 mg day⁻¹ for the central zone), whereas the maximum levels corresponded to transitional milk (306 mg day⁻¹) and 3 months (286 mg day⁻¹) for the coastal and central zones, respectively (Fig. 4A). Independent of the geographic zone involved, the average total PL intakes were 104 and 165 mg day⁻¹ at 0 and 12 months, respectively (maximised at the transitional stage with 278 mg day⁻¹). It should be underscored that the real intakes for 9 and 12 months can be increased due to the contribution of beikost. As far as we know, only Giuffrida et al. (2013) have evaluated total PL intake (140 mg day⁻¹) in one-month-old breastfed infants using a method similar to our own - the recorded value being lower than that obtained in our study (263 mg day⁻¹). The SM and PC intakes were lesser in colostrum and presented no significant differences during the lactation period (Fig. 4B and C). Independently of the geographic zone involved, the average PC intake ranged from 23 to 40 mg day⁻¹ in mature HM, with a minimum at 12 months and a maximum at 3 months, while the average SM intake ranged from 59 to 84 mg day⁻¹ in mature HM, with a minimum at 9 months and a maximum at one month. These findings are in agreement with those of Garcia et al. (2012), who reported a mean intake of SM of about 62 mg day⁻¹, taking into account a consumption of 800mL of HM per day (calculated as an estimate).

Taking into account the theoretical choline provided by PC and SM (molecular weight ratio) and the PL contents in colostrum, transitional and mature milk (up to 6 months), the mean choline intakes were 6.95, 18.21 and 16.31 mg day⁻¹, respectively. From the mean intake of HM in the first month reported by Giuffrida et al. (2013) (588 g day⁻¹) and the corresponding PC and SM contents, we evaluated the respective choline intake (molecular weight ratio). This intake of choline was 11.9 mg day⁻¹, which is lower than the value obtained in our study (17.1 mg day⁻¹). The intake of these PLs provides 5.56-14.56% of the recommended intake (125 mg day⁻¹), to which we must add the remaining portions provided by free choline, phosphocholine and glycerophosphocholine.

In the case of IFs, the total PL intake (mg day⁻¹) ranged from a minimum of 152mg day⁻¹ (0.5-month-old infants receiving IF 1) to a maximum of 575 mg day⁻¹ (5 months-old-infants receiving IF 5). Independently of the IF involved, the average total PL intake ranged from 224 to 366 mg day⁻¹ at 0.5 and 6 months (see Fig. 4D). To the best of our knowledge, no data on total PL intake in infants have been published to date.

The PLs with choline (PC and SM) ranged from 28 mg day⁻¹ (0.5 month old infants receiving IF 11) to 86 mg day⁻¹ (5 months old infant receiving IF 5) for PC. The SM content in turn ranged from 36 mg day⁻¹ (0.5 month old infants receiving IF 1) to 136mg day⁻¹ (5 months old infant receiving IF 5). Independently of the IF involved, the PC and SM intakes ranged from 37 to 60 mg day⁻¹ and from 54 to 88 mg day⁻¹, respectively, at 0.5-6 months (Fig. 4E and F).

In general, the intakes of choline in the studied IFs (9-31 mg choline day⁻¹) were in the range of those reported in HM, although the highest contents corresponded to the IFs with MFGM (17.7-31 mg choline day⁻¹). Accordingly, these IFs should be manufactured with a low quantity of choline ingredient. The mean choline intake through PC and SM in IFs represented approximately 7-25% of the recommended choline intake (IOM, 2006).

On comparing the intakes of PC and SM in the first month of breastfeeding, we observed that the average intake of PC in infants fed with IFs was greater (from 1.2-fold) than in those fed with HM. However, the intake of SM in the same period was higher (from 1.2-fold) in HM than in IFs.

4. Conclusions

The PL contents in HM among the total lipids and in terms of PL subclasses varied during the lactation period, being maximum in the transitional stage and decreasing in the course of lactation. However, in relation to the different geographic zones, we observed no significant changes in the relative contents of PE and SM, while the content of PI, PS and PC in the coastal zone were higher than in the central zone. The small differences observed would have no nutritional impact for the infant.

In the case of IFs, the PL contents were in the range of those found in HM. The highest contents were found in IFs 5, 6 and 9, which were formulated with MFGM, a good source of PLs. Such addition is reflected in a higher content of PC and PE, compared with the other IFs and HM. Furthermore, addition increased the SM contents in all three IFs, resembling the levels present in HM.

In infants fed with HM, the highest PL intake corresponded to transitional milk (about 0.5 months). With respect to the IFs, the highest intake was recorded at 5 months of lactation; IFs 5, 6 and 9 being those affording the highest intake, since they are the IFs with the highest PL contents.

In summary, the addition of MFGM increases mainly those compounds that contribute choline, such as PC and SM. Therefore, in formulating these IFs, addition of the choline ingredient could be lowered, since the addition of MFGM intrinsically affords this compound, which is so important for infants. In this regard, the addition of MFGM to IFs, which is still not a widespread practice, would cause IFs to much more closely resemble HM.

Acknowledgements

This work belongs to a CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) (20120542) project granted to Hero Spain, S.A., and L. Claumarchirant is the holder of a fellowship from this company. Thanks are due to Hero Spain, S.A. for providing the samples.

References

- Benoit, B., Fauquant, C., Daira, P., Peretti, N., Guichardant, M., & Michalski, M. C. (2010). Phospholipid species and minor sterols in French human milks. *Food Chemistry*, *120*, 684-691.
- Birch, D. G., Birch, E. E., Hoffman, D. R., & Uauy, R. D. (1992). Retinal development in very-low-birth-weight infants fed diets differing in omega-3 fatty acids. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *33*, 2365-2376.
- Bitman, J., Wood, D. L., Mehta, N. R., Hamosh, P., & Hamosh, M. (1984). Comparison of the phospholipid composition of breast milk from mothers of term and preterm infants during lactation. *American Journal of Clinical Nutrition*, *40*, 1103-1119.
- Braun, M., Flück, B., Cotting, C., Monard, F., & Giuffrida, F. (2010). Quantification of phospholipids in infant formula and growing up milk by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector. *Journal of AOAC International*, *93*, 948-955.
- Castro-Gómez, M. P., Rodríguez-Alcalá, L. M., Calvo, M. V., Romero, J., Mendiola, J. A., Ibañez, E., et al. (2014). Total milk fat extraction and quantification of polar and neutral lipids of cow, goat and ewe milk by using a pressurized liquid system and chromatographic techniques. *Journal of Dairy Science*, *97*, 6719-6728.
- Cilla, A., Diego-Quintaes, K., Barber_a, R., & Alegría, A. (2015). Phospholipids in human milk and infant formulas: Benefits and needs for correct infant nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2013.803951>.
- Claumarchirant, L., Matencio, E., Sanchez-Siles, L. M., Alegría, A., & Lagarda, M. J. (2015). Sterol composition in infant formulas and estimated intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 7245-7251.
- Da Costa, T. H. M., Haisma, H., Wells, J. C. K., Mander, A. P., Whitehead, R. G., & Bluck, L. J. (2010). How much human milk do infants consume? Data from 12 countries using a standardized stable isotope methodology. *Journal of Nutrition*, *140*, 2227-2232.

- EU. (2016). Regulation (EU) 2016/127 of 25 September 2015 supplementing regulation (EU) no 609/2013 of the European Parliament and of the Council as regards the specific compositional and information requirements for infant formula and followon formula and as regards requirements on information relating to infant and young child feeding. Brussels, Belgium: European Parliament.
- Fong, B., Ma, L., & Norris, C. (2013). Analysis of phospholipids in infant formulas using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 858-865.
- Fong, B. F., Norris, C. S., & MacGibbon, A. K. H. (2007). Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *International Dairy Journal*, *17*, 275-288.
- Garcia, C., Lutz, N. W., Confort-Gouny, S., Cozzone, P. J., Armand, M., & Bernard, M. (2012). Phospholipid fingerprints of milk from different mammals determined by P NMR: towards specific interest in human health. *Food Chemistry*, *135*, 1777-1783.
- German, J. B., & Dillard, C. J. (2006). Composition, structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *46*, 57-92.
- Giuffrida, F., Cruz-Hernandez, C., Flück, B., Tavazzi, I., Thakkar, S. K., Destailats, F., et al. (2013). Quantification of phospholipids classes in human milk. *Lipids*, *48*, 1051-1058.
- Haisma, H., Coward, W. A., Albernaz, E., Visser, G. H., Wells, J. C. K., Wright, A., et al. (2003). Breast milk and energy intake in exclusively, predominantly, and partially breast-fed infants. *European Journal of Clinical Nutrition*, *57*, 1633-1642.
- Harzer, G., Haug, M., Dieterich, I., & Gentner, P. (1983). Changing patterns of human milk lipids in the course of the lactation and during the day. *American Journal of Clinical Nutrition*, *37*, 612-621.
- Holmes-McNary, M. Q., Cheng, W. L., Mar, M. H., Fussell, S., & Zeisel, S. H. (1996). Choline and choline esters in human and rat milk and in infant formulas. *American Journal of Clinical Nutrition*, *64*, 572-576.
- Holmes, H. C., Snodgrass, G. J. A. I., & Iles, R. A. (2000). Changes in the choline content of human breast milk in the first 3 weeks after birth. *European Journal of Pediatrics*, *159*, 198-204.
- Iicol, Y. O., Ozbek, R., Hamurtekin, E., & Ulus, I. H. (2005). Choline status in newborns, infants, children, breast-feeding women, breast-fed infants and human breast milk. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *16*, 489-499.

- IOM. (2006). Dietary reference intakes: The essential guide to nutrients requirements for folate, thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, DC, USA: Institute of Medicine and National Academy of Sciences. <https://www.nap.edu/read/11537/chapter/23>. URL: National Academy Press. Accessed 04.02.16.
- Koletzko, B., Agostoni, C., Bergmann, R., Ritzenthaler, K., & Shamir, R. (2011). Physiological aspects of human milk lipids and implications for infant feeding: a workshop report. *Acta Paediatrica*, *100*, 1405-1415.
- Kramer, M. S., & Kakuma, R. (2001). The optimal duration of exclusive breastfeeding: A systematic review (WHO/NHD/01.08; WHO/FCH/01.23). Geneva, Switzerland: World Health Organization http://www.who.int/nutrition/publications/optimal_duration_of_exclusive_breastfeeding_review_eng.pdf Accessed 20.02.16.
- Kynast, G., & Schmitz, C. (1988). Determination of the phospholipid content of human milk, cow's milk and various infant formulas. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, *27*, 252-265.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., et al. (2011). Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chemistry*, *125*, 355-368.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Rousseau, F., Pradel, P., & Besle, J. (2008). Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid composition of the milk fat globule membrane are modified by diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 5226-5236.
- Lopez, C., & Ménard, O. (2011). Human milk fat globules: polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *83*, 29-41.
- Neville, M. C., Keller, R., Seacat, J., Lutes, V., Neifert, M., Casey, C., et al. (1988). Studies in human lactation: Milk volumes in lactating women during the onset of lactation and full lactation. *American Journal of Clinical Nutrition*, *48*, 1375-1386.
- Nielsen, S. B., Reilly, J. J., Fewtrell, M. S., Eaton, S., Grinham, J., & Wells, J. C. K. (2011). Adequacy of milk intake during exclusive breastfeeding: A longitudinal study. *Pediatrics*, *128*, e907-e914.

- Pita, M. L., Morales, J., Sánchez-Pozo, A., Martínez-Valverde, J., & Gil, A. (1985). Influence of the mother's weight and socioeconomic status on the fatty acid composition of human milk. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *29*, 366-373.
- Reilly, J. J., Ashworth, S., & Wells, J. C. K. (2005). Metabolisable energy consumption in the exclusively breast-fed infant aged 3e6 months from the developed world: a systematic review. *British Journal of Nutrition*, *94*, 56-63.
- Rodriguez-Alcalá, L. M., & Fontecha, J. (2010). Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction. *Journal of Chromatography A*, *1217*, 3063-3066.
- Russo, M., Cichello, F., Ragonese, C., Donato, P., Cacciola, F., Dugo, P., et al. (2013). Profiling and quantifying polar lipids in milk by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering and mass spectrometry detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *405*, 4617-4626.
- Sala-Vila, A., Castellote-Bargalló, A. I., Rodríguez-Palmero-Seuma, M., & López-Sabater, M. C. (2003). High-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for determination of phospholipid classes in human milk, infant formulas and phospholipid sources of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of Chromatography A*, *1008*, 73-80.
- Sala-Vila, A., Castellote, A. I., Rodríguez-Palmero, M., Campoy, C., & López-Sabater, M. C. (2005). Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): changes during lactation. *Nutrition*, *21*, 467-473.
- Schneider, M., & Schmitt, H. (2013). Nutritional aspects of polar lipids from milk phospho- and glycolipids. *Agro FOOD Industry Hi Tech*, *24*, 50-52.
- Shoji, H., Shimizu, T., Kaneko, N., Shino-Hara, K., Shiga, S., Saito, M., et al. (2006). Comparison of the phospholipid classes in human milk in Japanese mothers of term and preterm infants. *Acta Paediatrica*, *96*, 996-1000.
- Smit, E. N., Martini, I. A., Mulder, H., Boersma, E. R., & Muskiet, F. A. (2002). Estimated biological variation of the mature human milk fatty acid composition. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *66*, 549-555.
- Thakkar, S. K., Giuffrida, F., Cruz-Hernandez, C., De Castro, C. A., Mukherjee, R., Tran, L., et al. (2013). Dynamics of human milk nutrient composition of women from Singapore with a special focus on lipids. *American Journal of Human Biology*, *25*, 770-779.

- Tigney, A. H. (1956). Human brain lipids at various age in relation to myelination. *Journal of Mental Science*, 102, 851-855.
- Timby, N., Domellöf, E., Hernell, O., Lönnerdal, B., & Domellöf, M. (2014). Neurodevelopment, nutrition, and growth until 12 mo of age in infants fed a low energy, low-protein formula supplemented with bovine milk fat globule membranes: a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 99, 860-868.
- Timby, N., Hernell, O., Vaarala, O., Melin, M., Lönnerdal, B., & Domellöf, M. (2015). Infections in infants fed formula supplemented with bovine milk fat globule membranes. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 60, 384-389.
- Van Beusekom, C. M., Martini, I. A., Rutgers, H. M., Boersma, E. R., & Muskiet, F. A. J. (1990). A carbohydrate-rich diet not only leads to incorporation of mediumchain fatty acids (6:0-14:0) in milk triglycerides but also in each milk phospholipid subclass. *American Journal of Clinical Nutrition*, 52, 326-334.
- Wang, L., Shimizu, Y., Kaneko, S., Hanaka, S., Abe, T., Shimasaki, H., et al. (2000). Comparison of the fatty acid composition of total lipids and phospholipids in breast milk from Japanese women. *Pediatrics International*, 42, 14-20.
- Wells, J. C. K., Jonsdottir, O. H. J., Hibberd, P. L., Fewtrell, M. S., Thorsdottir, I., Eaton, S., et al. (2012). Randomized controlled trial of 4 compared with 6 mo of exclusive breastfeeding in Iceland: Differences in breast-milk intake by stable isotope probe. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96, 73-79.
- Wong, W. W., Hachey, D. L., Insull, W., Opekun, A. R., & Klein, P. D. (1993). Effect of dietary cholesterol on cholesterol synthesis in breast-fed and formula-fed infants. *Journal of Lipid Research*, 34, 1403-1411.
- Zeisel, S. H. (2000). Choline: Needed for normal development of memory. *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 528S-531S.
- Zeisel, S. H., & Blusztajn, J. K. (1994). Choline and human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 14, 269-296.
- Zeisel, S. H., Char, D., & Sheard, N. F. (1986). Choline, phosphatidylcholine and sphingomyelin in human and bovine milk and infant formulas. *Journal of Nutrition*, 116, 50-58.
- Zou, X., Guo, Z., Huang, J., Jin, Q., Cheong, L., Wang, X., et al. (2012). Human milk fat globules from different stages of lactation: A lipid composition analysis and

microstructure characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7158-7167.

Table 1

Main ingredients relative to protein and fat fractions of infant formulas analysed, the fat content and the reconstitution factors.^a

IFs	Country	Ingredients	Fat (% w/w)	RF (% w/v)
1	Spain	milk lipids, skimmed milk, vegetable oils (rapeseed, sunflower, oleic sunflower), whey protein, fish oil (DHA), mortierella alpina oil (ARA), emulsifier (soya lecithin)	22.0 ± 0.6	13.5
2		demineralised whey protein, skimmed milk, vegetable oils (palm, rapeseed, coconut, sunflower and mortierella alpina oil (ARA), fish oil, soya lecithin, milk proteins	26.3 ± 0.4	12.9
3		skimmed milk, vegetable oils (palm, palm kernel, rapeseed, sunflower, sunflower high oleic, arachidonic acid), whey protein enriched with α -lactoalbumin, emulsifier (soya lecithin), fish oil (source of DHA)	19.7 ± 1.1	13.5
4		vegetable oils (palm, coconut, rapeseed, high oleic sunflower and sunflower), skimmed milk, whey protein concentrate, fungi and seedweed oils	25.4 ± 1.0	12.9
5		skimmed milk, milk fat, whey enriched in MFGM , whey enriched in α -lactoalbumin, soya lecithin, fish oil, vegetable oils (sunflower, rapeseed, palm, coconut, single cell oil)	25.5 ± 0.8	13.0
6		vegetable oils (sunflower, rapeseed, palm, coconut, single cell oil), skimmed milk, milk fat, whey protein rich in MFGM , whey protein rich in α -lactoalbumin, milk protein, fish oil, emulsifier (soya lecithin)	29.3 ± 0.3	11.4
7	Sweden	whey powder, vegetable oil (palm, canola, coconut, sunflower), skimmed milk powder, fish oil, oil from Mortierella alpina, emulsifier (soy lecithin)	25.7 ± 0.6	12.9
8		organic skimmed milk, organic demineralised whey powder, organic vegetable oils (palm, rapeseed, sunflower), polyunsaturated oils (fish, vegetable)	25.4 ± 0.5	13.0
9		skimmed milk, milk fat, whey enriched in MFGM , whey enriched in α -lactoalbumin, soya lecithin, fish oil, vegetable oils (sunflower, rapeseed, palm, coconut, single cell oil)	24.2 ± 0.9	13.0
10	Czech Rep	demineralised whey powder, vegetable oils, whole milk powder, skimmed milk powder, emulsifier (lecithin)	25.3 ± 0.1	12.9
11		demineralised whey, skimmed milk powder, vegetable oils (palm, rapeseed, sunflower, coconut, microbiologic (ARA)), soya lecithin, fish oil	22.0 ± 0.1	13.5
12		demineralized whey (from milk), vegetable oil, dried skimmed milk, whey protein concentrate (from milk), fish oil, soya lecithin	22.0 ± 0.1	13.5
13		demineralised whey, vegetable oils (palm, rape, coconut, sunflower, oils from microbial resource (ARA)), dried skim milk, concentrated whey milk, soya lecithin	19.9 ± 0.5	13.8

^aAbbreviations are: IFs, infant formulas; RF, reconstitution factor; DHA, docosahexaenoic acid; ARA, arachidonic acid; MFGM, milk fat globule membrane. Fat content values are the mean ± standard deviation of three replicates.

Table 2Fat and phospholipid contents of human milk pools.^a

Month (days)	Geographic zone	Fat content	PE	PI	PS	PC	SM	Total
0 (0-5)	Madrid	2.32±0.02	12.36±0.61 (33.20±0.75)	3.13±0.01 (8.42±0.23)	3.49±0.01 (9.38±0.24)	4.87±0.11 (13.10±0.10)	13.36±0.29 (35.90±0.28)	37.21±1.01
	Valencia/ Murcia	2.32±0.10	10.46±0.75 (33.29±0.86)	3.12±0.15 (9.95±0.57)	3.43±0.20 (10.94±0.58)	4.51±0.28 (14.37±0.54)	9.95±1.75 (31.45±2.49)	31.49±3.09
0.5 (6-15)	Madrid	3.28±0.05	13.90±0.98 ^{a-1} (31.79±0.56)	4.30±0.07 ^{a-1} (9.85±0.41)	4.66±0.10 ^{a-1} (10.68±0.42)	5.97±0.15 ^{a-1} (13.68±0.49)	14.86±1.11 ^{a-1} (33.99±0.79)	43.70±2.34 ^{a-1}
	Valencia/ Murcia	4.87±0.03	15.90±0.85 ^{a-1} (29.69±0.30)	6.32±0.05 ^{a-2} (11.83±0.47)	6.74±0.08 ^{a-2} (12.60±0.45)	8.09±0.14 ^{a-2} (15.12±0.44)	16.49±1.46 ^{a-1} (30.76±1.24)	53.53±2.55 ^{a-2}
1 (16-60)	Madrid	3.18±0.19	11.98±1.09 ^{b-1} (30.54±0.67)	4.15±0.24 ^{b-1} (10.60±0.60)	4.45±0.24 ^{b-1} (11.37±0.68)	5.42±0.31 ^{b-1} (13.84±0.65)	13.20±1.27 ^{b-1} (33.65±1.35)	39.18±2.76 ^{b-1}
	Valencia	4.03±0.03	12.68±0.66 ^{b-1} (30.05±0.78)	5.20±0.04 ^{b-2} (12.34±0.32)	5.55±0.07 ^{b-2} (13.17±0.28)	6.55±0.13 ^{b-2} (15.53±0.19)	12.19±0.54 ^{b-1} (28.91±0.50)	42.18±1.34 ^{b-2}
	Murcia	3.53±0.12	11.58±0.98 ^{b-1} (29.52±0.96)	4.60±0.17 ^{b-2} (11.76±0.52)	4.90±0.18 ^{b-2} (12.53±0.52)	5.67±0.24 ^{b-2} (14.48±0.38)	12.44±1.11 ^{b-1} (31.72±0.81)	39.19±2.52 ^{b-2}
3 (61-135)	Madrid	3.26±0.08	10.71±0.24 ^{c-1} (29.82±0.15)	4.23±0.11 ^{c-1} (11.80±0.16)	4.56±0.14 ^{c-1} (12.69±0.14)	5.06±0.14 ^{c-1} (14.10±0.13)	11.34±0.34 ^{c-1} (31.59±0.53)	35.90±0.88 ^{c-1}
	Valencia	3.20±0.03	9.51±0.76 ^{c-1} (29.55±0.73)	4.13±0.05 ^{c-2} (12.86±0.59)	4.39±0.06 ^{c-2} (13.69±0.63)	4.92±0.13 ^{c-2} (15.32±0.47)	9.20±0.90 ^{c-1} (28.58±1.26)	32.15±1.84 ^{c-2}
	Murcia	3.13±0.10	11.36±0.73 ^{c-1} (32.58±0.27)	4.06±0.13 ^{c-2} (11.66±0.29)	4.30±0.13 ^{c-2} (12.34±0.34)	4.86±0.16 ^{c-2} (13.94±0.33)	10.29±0.83 ^{c-1} (29.48±0.76)	34.87±1.96 ^{c-2}

Table 2 (Continuation)

Month (days)	Geographic zone	Fat content	PE	PI	PS	PC	SM	Total
6 (136-240)	Madrid	2.39±0.10	8.29±0.40 ^{d-1} (31.22±0.75)	3.12±0.13 ^{d-1} (11.76±0.24)	3.39±0.17 ^{d-1} (12.76±0.43)	3.79±0.19 ^{d-1} (14.26±0.36)	7.96±0.11 ^{d-1} (30.00±1.08)	26.56±0.74 ^{d-1}
	Valencia	3.28±0.05	10.24±0.60 ^{d-1} (30.66±0.26)	4.23±0.08 ^{d-2} (12.68±0.52)	4.49±0.07 ^{d-2} (13.45±0.61)	5.02±0.16 ^{d-2} (15.03±0.45)	9.44±1.09 ^{d-1} (28.18±1.59)	33.41±1.98 ^{d-2}
	Murcia	2.70±0.07	8.37±0.56 ^{d-1} (29.74±0.78)	3.50±0.09 ^{d-2} (12.45±0.31)	3.73±0.11 ^{d-2} (13.26±0.31)	4.13±0.12 ^{d-2} (14.71±0.30)	8.39±0.52 ^{d-1} (29.84±0.52)	28.12±1.36 ^{d-2}
9 (241-330)	Valencia/ Murcia	2.36±0.04	7.89±0.15 (30.37±0.81)	3.07±0.05 (11.81±0.18)	3.25±0.08 (12.49±0.26)	3.63±0.06 (13.98±0.16)	8.15±0.27 (31.35±0.64)	26.00±0.32
12 (331-420)	Valencia/ Murcia	2.98±0.08	6.49±0.43 (22.40±1.18)	3.83±0.11 (13.22±0.38)	4.02±0.11 (13.89±0.36)	4.21±0.13 (14.52±0.42)	10.44±1.00 (35.97±2.14)	29.00±1.41

^aAbbreviations are: PI, phosphatidylinositol; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; SM, sphingomyelin. Month 0 (days 0-5) is colostrum; month 0.5 (days 6-15) is transition milk; month 1 (day 16 onwards) is mature milk. Values (fat content in g 100 mL⁻¹; phospholipids in mg 100 mL⁻¹) are expressed as mean ± standard deviation of three replicates; the relative percentage to total phospholipid content determined by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector is indicated in parenthesis. Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$) with the lactation period of the same column independently of geographic zone; different superscript numbers indicate significant differences ($p < 0.05$) with the geographic zone of the same column independently of lactation period.

Table 3Fat and phospholipid contents of infant formulas.^a

IF	Fat content	PE	PI	PS	PC	SM	Total
1	2.98±0.08	6.24±0.32 ^a (24.83±0.69)	4.03±0.13 ^{a,b} (16.05±0.13)	4.06±0.12 ^a (16.15±0.10)	4.78±0.16 ^a (19.03±0.15)	6.01±0.10 ^a (23.94±0.94)	25.11±0.63 ^a
2	3.40±0.06	15.09±0.53 ^b (36.48±0.47)	4.89±0.08 ^{c,d} (11.83±0.22)	4.90±0.09 ^{b,c} (11.85±0.20)	6.58±0.21 ^b (15.91±0.15)	9.90±0.46 ^b (23.93±0.83)	41.35±1.14 ^b
3	2.67±0.14	10.75±0.64 ^c (33.87±0.30)	4.14±0.28 ^{a,b} (13.02±0.33)	3.79±0.23 ^a (11.96±0.33)	5.56±0.28 ^{c,d} (17.52±0.13)	7.50±0.35 ^{a,c,d} (23.63±0.94)	31.74±1.61 ^{c,d}
4	3.28±0.13	10.17±0.96 ^c (29.16±0.41)	5.03±0.35 ^{c,d,e} (14.44±0.21)	4.68±0.24 ^b (13.46±0.45)	6.54±0.46 ^b (18.77±0.27)	8.43±0.94 ^{b,c,d} (24.16±0.69)	34.85±2.94 ^{d,e}
5	3.32±0.11	20.74±1.09 ^d (37.86±0.12)	5.64±0.12 ^f (10.30±0.37)	5.94±0.21 ^d (10.86±0.36)	8.74±0.35 ^e (15.96±0.25)	13.73±1.30 ^e (25.02±1.06)	54.79±2.96 ^f
6	3.34±0.04	24.17±1.13 ^e (43.01±0.90)	5.36±0.09 ^{d,e,f} (9.54±0.27)	5.66±0.04 ^d (10.09±0.27)	8.49±0.17 ^e (15.12±0.33)	12.50±0.85 ^e (22.24±1.16)	56.18±1.79 ^f
7	3.32±0.08	13.36±1.45 ^{b,f} (35.18±1.00)	4.68±0.18 ^{c,g} (12.37±0.52)	4.79±0.17 ^{b,c} (12.67±0.57)	6.13±0.39 ^{c,b} (16.19±0.43)	8.96±0.94 ^{c,b} (23.59±0.55)	37.93±3.10 ^{b,e}
8	3.30±0.07	6.30±0.19 ^a (22.74±0.40)	4.29±0.11 ^{b,g} (15.50±0.18)	4.67±0.13 ^b (16.83±0.17)	4.94±0.11 ^{a,d} (17.84±0.10)	7.51±0.11 ^{a,c,d} (27.09±0.19)	27.71±0.60 ^{a,c}
9	3.17±0.12	26.23±0.84 ^e (45.18±0.59)	5.41±0.18 ^{e,f} (9.32±0.08)	5.20±0.25 ^c (8.96±0.08)	8.60±0.35 ^e (14.81±0.13)	12.63±0.84 ^e (21.73±0.65)	58.07±2.39 ^f
10	3.28±0.02	6.56±0.14 ^a (23.82±0.31)	4.27±0.03 ^{b,g} (15.49±0.07)	4.70±0.04 ^b (17.05±0.07)	5.01±0.05 ^{a,d} (18.19±0.13)	7.01±0.16 ^{a,c,d} (25.45±0.42)	27.54±0.34 ^{a,c}
11	2.97±0.00	6.77±0.13 ^a (26.34±0.41)	3.91±0.01 ^{a,b} (15.21±0.15)	4.09±0.01 ^a (15.93±0.19)	4.56±0.06 ^a (17.75±0.03)	6.37±0.20 ^a (24.77±0.52)	25.70±0.31 ^a
12	2.98±0.02	6.49±0.07 ^a (25.05±0.04)	3.93±0.01 ^{a,b} (15.15±0.19)	4.17±0.01 ^a (16.07±0.14)	4.64±0.00 ^a (17.89±0.19)	6.70±0.22 ^{a,d} (25.84±0.54)	25.93±0.30 ^a

Table 3 (Continuation)

IF	Fat content	PE	PI	PS	PC	SM	Total
13	2.74±0.07	11.77±0.70 ^{c,f}	3.72±0.12 ^a	4.16±0.13 ^a	5.01±0.18 ^{a,d}	8.63±0.52 ^{b,c,d}	33.30±1.52 ^{d,e}
		(35.34±0.48)	(11.18±0.36)	(12.50±0.35)	(15.06±0.21)	(25.92±0.78)	

^aAbbreviations are: IFs, infant formulas; PI, phosphatidylinositol; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; SM, sphingomyelin. Values (fat content in g 100 mL⁻¹; phospholipids in mg 100 mL⁻¹) are expressed as mean ± standard deviation of three replicates; relative percentage to total phospholipids content is given in parenthesis. Different superscript letters in the same column indicate significant differences between infant formulas (Tukey's HSD test).

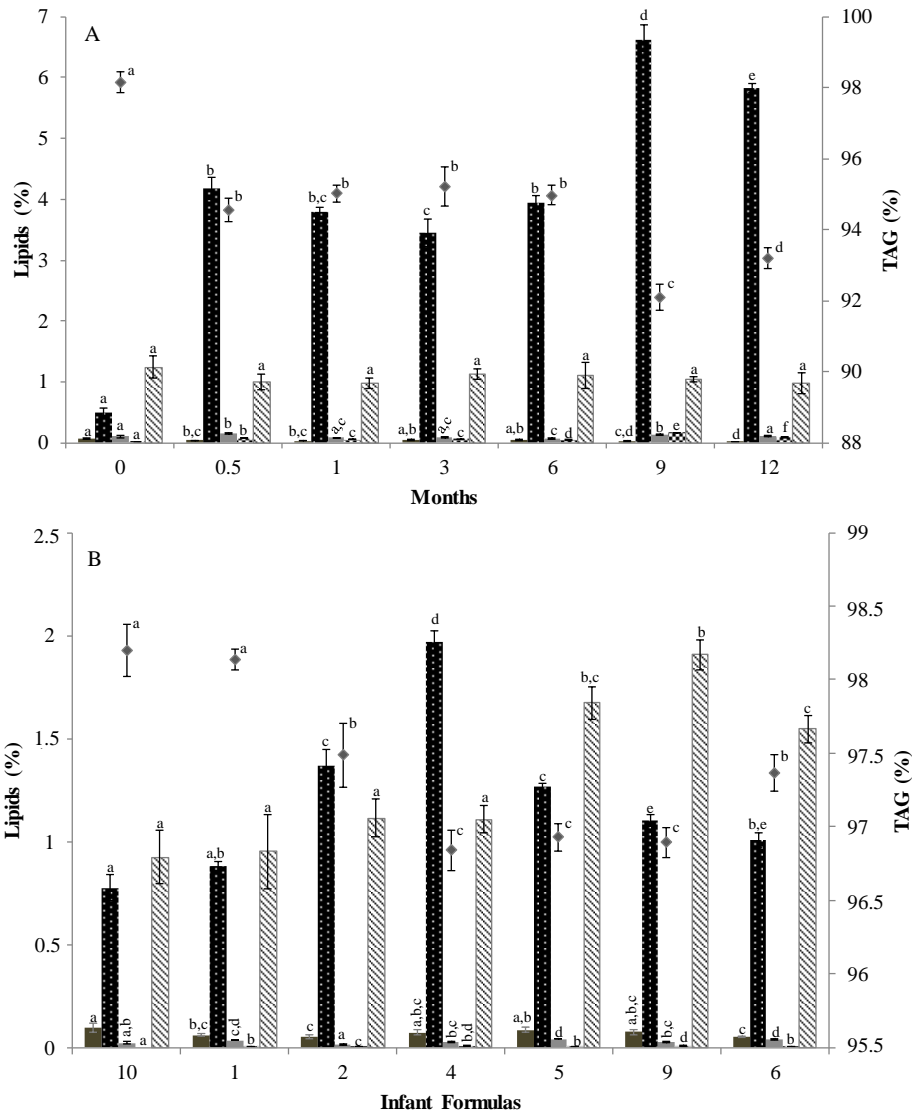


Fig. 1. Lipid class contents of human milk of the coastal zone (A) and infant formulas selected (B) with different ingredients (vegetable oil + milk fat (10, 1), vegetable oil (2, 4), vegetable oil + milk fat + milk fat globule membrane (5, 9, 6)) determined by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection: ■, cholesterol ester; ▒, diacylglycerides; ■, cholesterol + free fatty acids; ▒, monoacylglycerides; ▒, polar lipids (phospholipids + sphingomyelin); ◆, triacylglycerides. For each type of lipid, different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the lactation periods in HM (A) and between the different IFs (B).

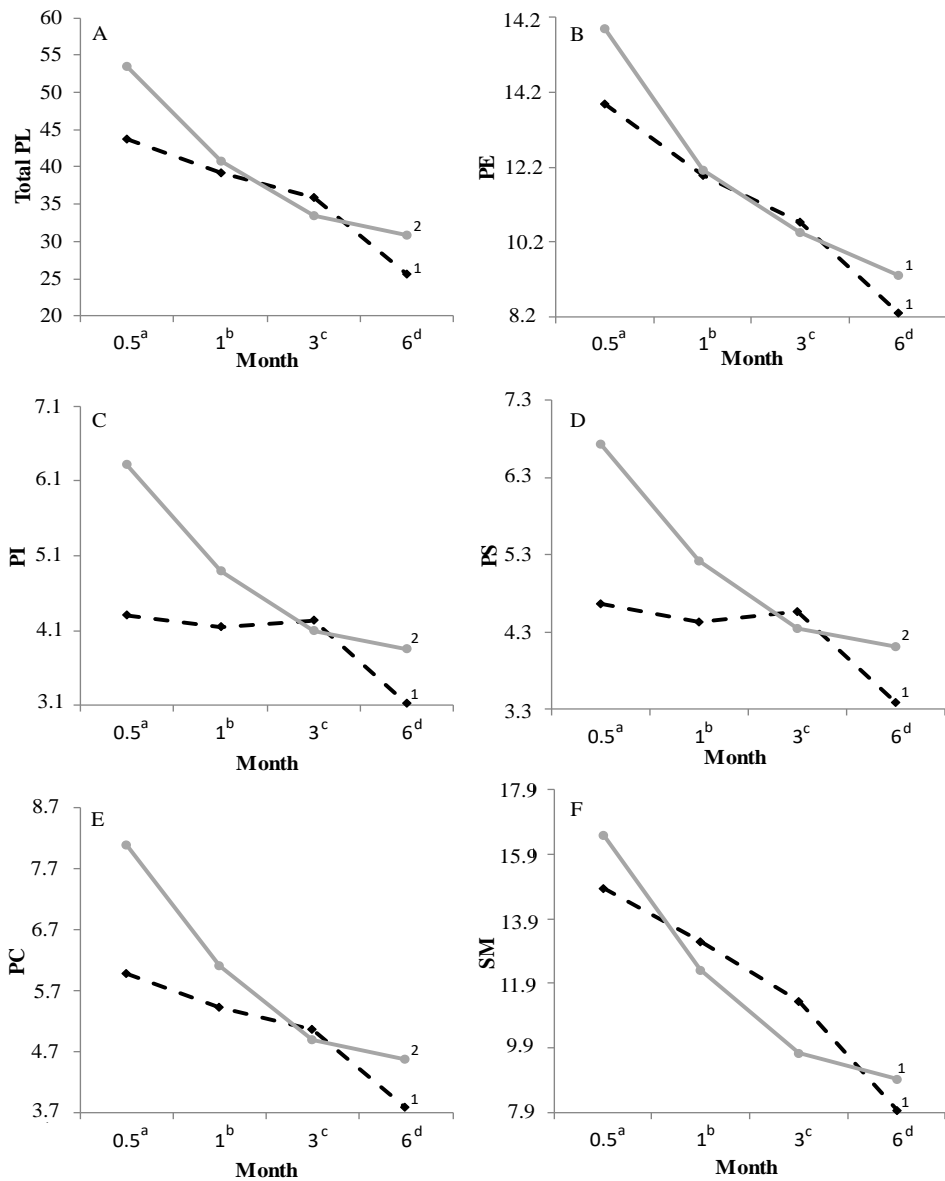


Fig. 2. Interaction plots of the two geographic zones ($p < 0.05$) throughout the lactation period: \blacklozenge central zone (values are the mean of three determinations); \bullet , coastal zone (values are the mean of six determinations, i.e., three determinations for each city of the zone, except those at 0.5 months that are the mean of three determinations). Panel A, total polar lipids (PL); panel B, phosphatidylethanolamine (PE); panel C, phosphatidylinositol (PI); panel D, phosphatidylserine (PS); panel E, phosphatidylcholine (PC); panel F, sphingomyelin (SM). Different letters indicate significant differences with the lactation period independently of geographic zone. Different numbers indicate significant differences with the geographic zone independently of lactation period.

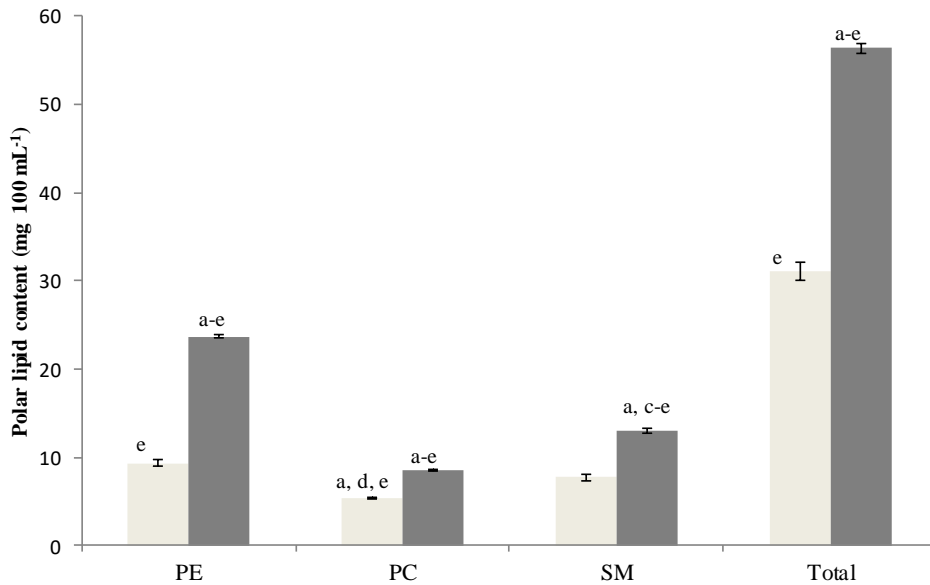


Fig. 3. Polar lipid content: total, PE, PC and SM (values expressed as $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1} \pm \text{SD}$) in infant formulas without (■; $n = 10$) or with MFGM (■; $n = 3$). The different letter indicates that infant formulas present contents similar to those found in colostrum (a), transitional milk (b) and milk corresponding to 1 month (c), 3 months (d) and 6 months (e). PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidylethanolamine; SM: sphingomyelin; MFGM: milk fat globule membrane.

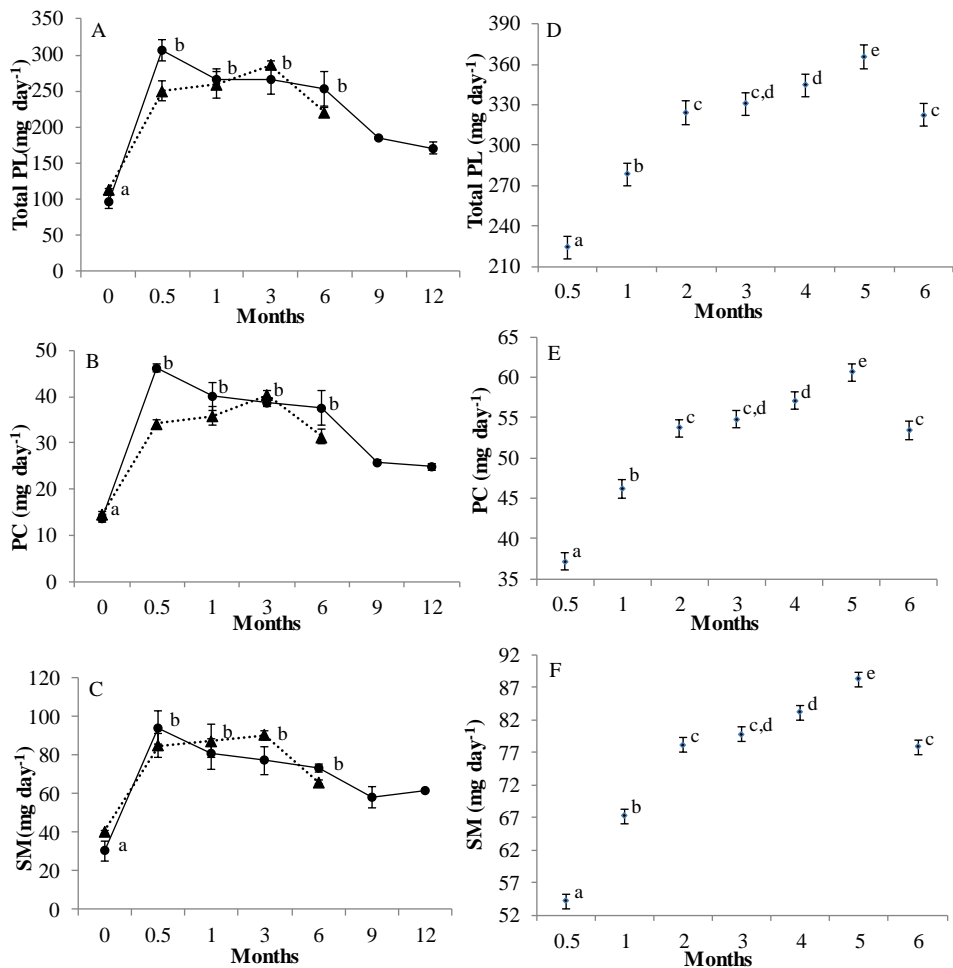


Fig. 4. Phospholipids intake (▲, central zone; ●, coastal zone) throughout the lactation period in infants fed with human milk [A, B, C; values are the mean ± standard deviation of three determinations, except for months 1, 3 and 6 of coastal zone for which six determinations (three determinations for each city of the zone) were analysed] or infant formulas (D, E, F; values are the as mean ± standard deviation of thirteen IFs). Panels A and D, total polar lipids (PL); panels B and E, phosphatidylcholine (PC); panels C and F, sphingomyelin (SM). Different superscript letters denote significant differences ($p < 0.05$) between lactation stages (Tukey's HSD test).

5.- Evaluation of Sialic Acid in Infant Feeding: Contents and Bioavailability

Lorena Claumarchirant,[†] Luis Manuel Sanchez-Siles,[§] Esther Matencio,[§] Amparo Alegría,[†] and María Jesús Lagarda^{*,†}

[†]Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avenida Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot (Valencia), Spain

[§]Hero Institute of Infant Nutrition, Hero Group, Avenida Murcia 1, 30820 Alcantarilla (Murcia), Spain

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2016**, *64*, 8333-8342

ABSTRACT:

Sialic acid (Sia) contents and bioaccessibility (BA) in human milk (HM) and infant formulas (IFs) were determined, and Sia intakes by infants between 0 and 6 months of age were evaluated. Total Sia contents in HM decreased during lactation from 36.14 to 24.47 mg/100 mL. The total Sia contents in IFs (13.15–25.78 mg/100 mL) were lower than in HM and were not related to the addition of ingredients acting as sources of Sia in their formulation. The Sia intakes derived from IF consumption were lower than in HM, and only one IF reached the intakes provided by HM from the age of 2 months. Despite the lower total Sia content in IFs, the BA of Sia in IFs (88.08–92.96%) was significantly greater than in mature HM (72.51%) and similar to that found in colostrum (96.43%). However, the Sia contents in the available soluble fraction of IFs did not reach those provided by HM.

KEYWORDS: *bioaccessibility, human milk, infant formulas, sialic acid*

■ INTRODUCTION

Human milk (HM) is the optimum food during the first months of life of the newborn infant, but when breastfeeding is not possible, many infants are fed infant formulas (IFs). Sialic acids (N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) being the main representative forms) are found free or mainly conjugated (sialoglycoconjugated) to oligosaccharides, glycoproteins, or glycolipids (gangliosides). Most of the sialic acid (Sia) in mature HM is bound to oligosaccharides (69–76%), a smaller fraction is bound to proteins (21–28%), and only 3% present in the free form and bound to gangliosides.¹ In the case of the IFs, most of the Sia is bound to protein (70%), some is bound to oligosaccharides (27.8%), and only 0.9% is found in the free form.² In HM, Neu5Ac is the predominant form of Sia, and Neu5Gc is usually absent. In comparison, the Sia contents in IFs depend on the Sia from the bovine or caprine milks used to manufacture these products, which contain approximately 5%³ or 57%⁴ Neu5Gc, respectively, and have been shown to contain <25% of the total Sia contents found in mature HM.²

It has been hypothesized from animal studies that due to the immaturity of the metabolic system of newborn infants, they might have a lower capacity for synthesizing *de novo* Sia. Therefore, the intake of this compound is important for correct development during the first stages of life.^{1,3,5} The main roles of Sia are related to cellular recognition and communication, with participation in pathogen adhesion mechanisms, acting as false receptors of viruses and bacteria,^{6,7} and to development of the digestive and nervous systems (improvement of learning and memory).³

Sialic acids are bioactive compounds present in HM (9–155 mg/100 mL)^{2,5,8–16} and in lesser concentrations in IFs (6.5–32.5 mg/100 mL).^{2,4,5,8,10,13,17–22} The differences in Sia concentrations may be related to different factors such as the stage of lactation of HM, ingredients used in the formulation of IFs, or the analytical methodology used (spectrophotometric and HPLC methods) among others. From

nutritional and functional points of view, it is interesting to know not only the Sia contents in infant foods and the intakes but also the bioavailability (i.e., the fraction of an ingested nutrient or bioactive compound that is available for use in physiological functions or for storage). The first step defining bioavailability is bioaccessibility, this being understood as the fraction of a compound that is released from its matrix within the gastrointestinal tract and thus becomes available for intestinal absorption. The determination of the soluble compounds fraction in simulated gastrointestinal digestion allows us to estimate the relative availability of compounds from food, and this constitutes a predictor of potential Sia bioavailability.²³ With regard to the mechanism of absorption of dietetic Sia, very little is known. However, in Caco-2 cells, a validated model of intestinal epithelium, absorption via pinocytosis, and specific lysosomal transporter of Sia has been suggested.²⁴ Animal studies show that the ratio of absorption and excretion is dependent on the nature of the molecule to which it is attached and the retention time in the intestine. Sia is absorbed more rapidly (1.5 h earlier) when it is in free form than when it is bound to other structures (oligosaccharides and proteins).²⁵

As far as we know, only one study, conducted by our research group, has examined bioaccessibility in infant foods (IFs, follow-on formulas, and HM) through a simulated digestion model involving only two steps (gastric and intestinal).²⁶ To more closely correlate the digestion process to the *in vivo* situation, the present study evaluates the bioaccessibility of Sia (Neu5Ac and Neu5Gc) in HM and IFs using a simulated gastrointestinal digestion model in three steps, including neuraminidases in the saliva step, and comprising an intestinal phase with the formation of micelles. To obtain more current data that could be used as the gold standard in formulating IFs, we analyzed HM samples corresponding to different stages of lactation. In previous studies, the addition of milk fat globule membrane (MFGM) to IFs was seen to yield a sterol²⁷ and polar lipid²⁸ profile more similar to that of HM. To evaluate the influence of ingredients in IFs, the total Sia contents (Neu5Ac and Neu5Gc) in different IFs manufactured in Europe were determined.

■ MATERIALS AND METHODS

Reagents. Bovine bile, bovine serum albumin (BSA), calcium chloride dihydrate, magnesium chloride, glucose, glucosamine hydrochloride, glucuronic acid, mucin from porcine stomach type II, pepsin from porcine stomach (EC 3.4.23.1), α -amylase from human saliva (EC 3.2.1.1), cholesterol esterase from porcine pancreas (EC 3.1.1.13), colipase from porcine pancreas, lipase from porcine pancreas (EC 3.1.1.3), neuraminidase from *Clostridium perfringens* (EC 3.2.1.18), sodium dihydrogen phosphate, pancreatin from porcine pancreas, phospholipase A2 from porcine pancreas (EC 3.1.1.4), potassium thiocyanate, sodium taurocholate, tris(hydroxymethyl)-aminomethane, ion exchange Dowex 1X8 (quaternary amine as functional group, 200–400 mesh particle size, chloride form), 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene dihydrochloride (DMB), and standard reagents of Neu5Ac (purity $\geq 95\%$) and Neu5Gc (purity $\geq 95\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydrochloric acid (37%), uric acid, urea, sodium bicarbonate, potassium chloride, sodium chloride, sodium hydroxide, potassium dihydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate, β -mercaptoethanol, formic acid, glacial acetic acid, and sulfuric acid were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Sodium hydrosulfite of analytical grade was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Sterile water for irrigation was from Braun (Melsungen, Germany). Acetonitrile and methanol of HPLC grade were purchased from J. T. Baker (Deventer, The Netherlands). Milli-Q water was supplied by Millipore (Barcelona, Spain).

Samples. Samples of HM were obtained from 65 healthy Spanish women aged between 18 and 40 years. The donors were volunteer mothers of term infants with medium-high socioeconomic status, apparently healthy, nonsmokers, and without caloric restrictions. Colostrum (days 1–5), transitional milk (days 6–15), and mature milk, 1 month (days 16–60), 3 months (days 61–135), 6 months (days 136–240), 9 months (days 241–330), and 12 months (days 331–420), from two different geographic zones in Spain (Madrid as central zone and Murcia and Valencia as

coastal zone) were collected. Each milk sample obtained of one breast, through mechanical extraction and before breastfeeding, was collected in plastic containers and immediately stored in the refrigerator for a few hours until arrival in the laboratory, where it was stored in a freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) until preparation of the corresponding pools. For each stage of lactation, similar volumes from each donor were mixed and homogenized with a magnetic homogenizer for 4 min to obtain representative pools (seven different pools of HM for the coastal zone and five different pools of HM for the central zone). The study protocol was approved by the Clinical Research Ethic Committee and Breastfeeding Committee of Puerta de Hierro-Majadahonda University Hospital (Madrid, Spain). All subjects were informed and gave their signed consent before inclusion in the study.

Thirteen powdered starter IFs of a single batch each, marketed in three European countries (six from Spain, three from Sweden, and four from the Czech Republic) were analyzed. The label-stated compositions and reconstitution factors (RF) of IFs are summarized in Table 1.

In the preliminary assays of Sia bioaccessibility evaluation, the mature HM pool (4–7 months) provided by a mother was used.

Simulated Static Model Gastrointestinal Digestion. The simulated gastrointestinal digestion described by Alemany et al.,²⁹ consisting of three sequential phases (salivary, gastric, and intestinal) including the formation of mixed micelles, was applied to HM (colostrum and 1 month) and IFs with or without MFGM (reconstituted as indicated on the labeling). Slight modifications such as the addition of neuraminidase in the salivary phase and changes in gastric pH (value = 4) to more closely simulate the physiological conditions of newborn infants were made. The neuraminidase from *C. perfringens* was selected due to its optimum activity at salivary pH,³⁰ and the gastric pH was adjusted to 4 to simulate the conditions of infants,³¹ considering that pepsin remains active.³² Briefly, 20 g of liquid HM or reconstituted IF was transferred to an Erlenmeyer flask. Then 9 mL of saliva solution (pH 6.5 ± 0.2) containing organic and inorganic components, uric

acid, mucin, α -amylase (1.8 U), and neuraminidase (1.8 U) was added. The mixture was incubated for 5 min in a shaking water bath (37 °C, 95 rpm). Then, 13.5 mL of gastric juice (pH 4 ± 0.07) containing organic and inorganic solutions, mucin, BSA, and pepsin from porcine stomach (6102 U or 143.6 U/mL of gastric content) were added, and the pH was corrected to 4.0 with 0.5 M HCl. The mixture was incubated for 1 h under the same conditions as the salivary step. Subsequently, 25 mL of duodenal juice (pH 7.8 ± 0.2) containing 75 mg of pancreatin and 9 mL of bile solution (pH 8.0 ± 0.2) with 54 mg of bile were added, and the sample pH was neutralized (value = 6.8–7.2). Porcine pancreatic lipase (60 U or 0.78 U/mL of intestinal content), colipase (12.5 μ g), porcine cholesterol esterase (5 U), phospholipase A2 (502 U), and sodium taurocholate (0.02 mg) were then added. The final mixture was incubated for 2 h in a shaking water bath (37 °C, 95 rpm) and centrifuged for 90 min (3220g, 4 °C) to obtain the aqueous-micellar fraction (supernatants) regarded as the bioaccessible fraction (BF) of the digested samples. Two independent replicates of the same sample were performed on the same day.

The bioaccessibility (BA, expressed in %) of Sia was calculated from following equation: [BF content (mg Sia/100 mL sample)/total content in the undigested sample (mg Sia/100 mL sample)] \times 100.

The quality of digestion was evaluated by reproducibility of the digestion method based on four independent assays on two different days (two assays/day), using colostrum sample because of the complexity of the matrix. In addition, interference contribution was assessed by analyzing a blank of samples (soy IF) or a blank of digestion reagents.

Sialic Acid Determination. Neu5Ac and Neu5Gc were determined according to the method of Salcedo et al.²⁰ with slight modifications, reducing the weight of samples. Briefly, 0.75 g of powder formula or lyophilized HM was dissolved in 10 mL of distilled water. The BF of HM and IFs was also lyophilized, and 0.4 g was diluted to 5 mL with distilled water. Then, 0.9 mL of the mixture was hydrolyzed with 2.1 mL of 0.05 M H₂SO₄, followed by incubation at 80 °C in a block heater

(Stuart Scientific) for 1 h. The hydrolysate was cooled to room temperature, centrifuged (1000g, 10 min, 4 °C), and purified by ion-exchange chromatography using a Dowex 1X8 column (2.5 mL of gel previously activated following the instructions of the manufacturer). Four hundred microliters of purified sample was ultrafiltered with Microcon Ultracel YM-10 (Millipore, Milford, MA, USA) at 13000g and 4 °C for 10 min. Then, 50 µL of the filtered sample was derivatized with 50 µL of DMB reagent prepared daily (8 mM DMB, 1.5 M acetic acid, 14 mM sodium hydrosulfite, and 0.8 M β-mercaptoethanol) and heated for 2.5 h in a block heater at 50 °C in the dark. After cooling to room temperature, 20 µL of derivatized sample was injected.

HPLC analysis was carried out on a Shimadzu HPLC system composed of a Shimadzu LC-10AD pump, a Shimadzu CTO-6AS oven, a Rheodyne model 7725 manual injector of variable volume, a Waters 474 fluorescence detector, and a communication module CBM-20A. Data were collected and analyzed using Shimadzu LC-solution 1.25. The mobile phase used was water/methanol/acetonitrile 85:7:8 (v/v/v), with a flow of 0.9 mL/min (mobile phase was filtered using a Millipore system with 20 µm Millex-GN membrane filters).

The detector parameters were as follows: $\lambda_{\text{ex}} = 373 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 448 \text{ nm}$; gain, 1; attenuation, 64; response, 5 s. The column used was a Hidrosorb RP-18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) with a Hidrosorb RP-18 (5 µm) guard column, both purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The column was kept at a constant temperature of 30 °C. The quantification of Neu5Ac and Neu5Gc was through external calibration (12.5–250.8 and 1.6–8 ng/assay, respectively). Total Sia was calculated as the sum of Neu5Ac and Neu5Gc. Sample determination was conducted in three independent assays.

Estimation of Sialic Acid Intakes. To calculate Sia intake in HM during the first year of life, the mean volumes (g/day) of the HM obtained from seven different studies and corresponding to a total of 2156 healthy infants born to term were used according to the procedure of Claumarchirant et al.²⁸ In the case of IF, the average

intake (mL/day) during the first 6 months of life was obtained from eight different studies corresponding to a total of 1113 healthy infants born to term according to the procedure of Claumarchirant et al.²⁷

Statistical Analysis. Two-factor analysis of variance (ANOVA) (stages of lactation, 0, 0.5, 1, 3, and 6 months; and geographic zones, central and coastal) and Tukey's HSD test ($p < 0.05$) were applied to Sia contents in HM. The significance of interactions was also included for Sia contents. Regression analysis was performed to evaluate the influence of stages of lactation upon total Sia in HM. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's HSD test ($p < 0.05$) were applied to Sia contents in IFs. In HM and IFs the same type of analysis was used to evaluate the results of Sia contents in BF, BA percentages, and Sia intakes. The Statgraphics Plus version 5.1 statistical package (Rockville, MD, USA) was used.

■ RESULTS AND DISCUSSION

Human Milk. The Sia contents in different HM pools analyzed at different stages of lactation are summarized in Table 2. Neu5Ac was the only Sia form found in HM (Figure 1a). The Sia contents (mg/100 mL) in the different stages of lactation ranged from 101.6 to 136.1 for colostrum, from 89.4 to 92.3 for transitional milk, and from 24.5 to 61.0 for mature HM. The amount of Sia in colostrum was higher than in the other stages of lactation, being 3 times greater than in mature milk (1–6 months), in coincidence with the wide range reported in the literature (Table 2).^{2,5,8–16}

Infants need a higher sialic intake to ensure optimum and rapid brain growth during neuronal development in the early stages of life.¹ Accordingly, colostrum offers the highest Sia content, because infants have difficulties synthesizing this compound due to the immaturity of their liver.⁵ It should be noted that the last intrauterine quarter and the first year of life are the times when the brain needs the largest amounts of gangliosides, which contain Sia.¹ Furthermore, these high levels are consistent with increased neuraminidase enzyme activity during intestinal maturation, as demonstrated in some mammals.^{9,33}

The Sia contents show significantly statistically ($p < 0.05$) differences in the different stages of lactation ($0 > 0.5 > 1 > 3$ months). Independent of the geographic zone involved, the Sia contents decreased over time—the lowest amounts corresponding to 9 and 12 months. However, no significant differences were observed between 3 and 6 months. The best simple regression model obtained ($y = 1/(0.0122587 + 0.00443454x)$, where $y = \text{mg Sia total}/100 \text{ mL of HM}$ and $x = \text{month of lactation}$), explained 78.73% of the decrease in Sia over the different lactation stages. This behavior is similar to that observed by Carlson⁵ (exponential model) and Brand-Miller et al.¹¹ However, in our study the decline in the first 15 days was more pronounced (23 vs 12%) than in the study of Carlson⁵ for Sia-bound oligosaccharides and of the same order (72%) as that indicated by Brand-Miller et al.¹¹ during the first 3 months for total Sia. Other authors have also reported a decrease over time. In this regard, Wang et al.² observed a slightly greater decrease in the first 3 months than in our study (80 vs 72%).

Independent of the lactation stage involved, the Neu5Ac contents were significantly lower ($p < 0.05$) in the central zone than in the coastal zone. This population variability could be the result of nutritional factors, as has been mentioned above, and may be conditioned by Sia intake from food sources such as animal milks, eggs, and cheese.¹ Another factor that could explain this difference is a high intake of vitamin A in the coastal zone, because according to Qiao et al.,¹⁴ a high content of vitamin A in the diet of mothers would increase the synthesis of Sia. Significant interactions ($p < 0.05$) between the geographic zone and lactation stage were found, as can be seen in Figure 2. In the first 15 days, the decline in the central zone was lower (11.9 vs 32.12% less) than in the coastal zone.

Infant Formulas. The Neu5Ac, Neu5Gc, and total Sia contents of the IFs analyzed are summarized in Table 3. The total Sia contents ranged from 13.1 to 25.8 mg/100 mL (97.40–186 mg/100 g product). In addition to Neu5Ac (12.6–25.1 mg/100 mL or 93.46–182.17 mg/100 g product), we also detected small amounts of Neu5Gc (0.14–0.97 mg/100 mL or 1.07–7.46 mg/100 g product) (Figure 1b).

Neu5Ac represented 95.5–99% of total Sia, the proportion being similar to that found in mature bovine milk.^{4,15,34,35} The Sia values found in our study agree with the wide range in Sia concentration in IFs recorded in previous studies (Table 3).^{2,4,5,8,13,17–22} On the other hand, larger Sia concentrations have been reported in bovine mature milk (6–22 mg/100 mL),^{8,18,36–38} which could partially explain the higher Sia values recorded in our study. The highest Sia content described in the literature⁴ was attributed to the addition of colostrum to an IF.

The statistical analysis showed IF-13 to contain a significantly ($p < 0.05$) greater amount of total Sia than the rest of the starter formulas analyzed. This difference cannot be explained by the different whey/casein ratios of the analyzed IFs, despite the fact that Wang et al.² found higher Sia values for cow's milk-based IFs with a 60:40 whey/casein ratio than for a 20:80 whey/casein ratio. The whey/casein ratio in itself is not always able to justify the observed differences in Sia concentrations, because the literature describes a wide range of Sia concentrations for similar whey/casein ratios (60:40), from 11.4 to 27 mg/100 mL.^{2,5,8,17}

The literature points to bovine whey as a better source of Sia than bovine casein,^{5,8} and this ingredient is used in the formulation of all IFs (Table 1). Besides, other ingredients such as whey enriched with MFGM and demineralized whey may be a source of Sia. Whey proteins mainly comprise β -lactoglobulin, α -lactoalbumin, and casein glycomacropeptide (CGMP) among others.³⁹ CGMP is a rich source of sialic acid,⁴⁰ but the content in whey varies depending on several factors such as the type of cheese used to manufacture the whey, the different manufacturing process available to produce it, and the type of whey ingredients produced.³⁹ It has been shown that whey protein concentrate (WPC) has higher contents than demineralized whey powder (DWP) (938–1987 vs 1397 mg/100 g).^{4,8} However, in our study these ingredients were not seen to influence the total Sia contents. Nesser et al.,⁸ in IFs elaborated with WPC (whey/casein ratio 100:0), reported higher total Sia contents than when using DWP (whey/casein ratio 60:40) (25–28 vs 17–20 mg/100 mL). The differences found between Nesser et al.⁸ and our study may be due to the

whey/casein ratio. Neeser et al.⁸ provides a ratio more extensive than those found in our study, and this whey/casein ratio may affect more than the type of ingredient (WPC or DWP). Other types of ingredients with a broad Sia content that could also modify these amounts are WPC with α -lactalbumin or MFGM (1624 vs 2409 mg/100 g),¹³ MFGM (0.89 mg/100 g),⁴¹ pure α -lactalbumin in the S1 fraction of this protein (1800 mg/100 g),⁴² and skimmed milk power (177 mg/100 g).⁴

The addition of MFGM to IFs of this study does not increase the Sia contents, in contrast to what happens with bioactive compounds such as sterols²⁷ and polar lipids.²⁸ This may be because Sia is present in MFGM in very small amounts, only bound to gangliosides, and this represents a very small proportion (<3%) in relation to the amounts bound to proteins and oligosaccharides.^{2,8}

Although there has been a lot of progress in the design and development of IFs to mimic HM composition, the recorded Sia contents in IFs analyzed are lower than in HM, representing only between 11 and 21% for colostrum and between 41 and 80% for mature HM (3 months). In the case of mature HM, this percentage is higher than that found by Wang et al.,² because most of their IFs did not reach 25% of the HM contents. On the other hand, IF-13, with the highest Sia contents, reached the contents provided by HM only from 6 months (90%). In relation to the Neu5Gc/Neu5Ac ratio (Figure 3), IF-9 was the IF with the ratio closest to that of HM, although its total Sia contents were low.

Intakes from Human Milk versus Infant Formulas. A decrease in Sia intake from HM was observed over time (Figure 4a), from 0.5 months (520 ± 12 mg/day) to 3 months (255 ± 38 mg/day). There was no significant difference between this last period and 6 months (238 ± 31 mg/day). The lower intake at 0 months was due to a lesser volume of colostrum ingested by the infants (309 ± 191 g/day), adapted to their digestive capacity. This decreased intake of Sia with the evolution of lactation is related to the total Sia contents present at each stage. Furthermore, it would adapt to the capacity of the infants to synthesize Sia as their organ systems acquire sufficient maturity (particularly the liver), making it unnecessary to ingest such large

amounts of Sia, due to endogenous synthesis. From 9 to 12 months, the Sia intakes decreased (203 ± 22 and 166 ± 13 mg/day, respectively) due to the reduction in ingested volume of HM, although this compound may be supplied through beikost.

To our knowledge, few evaluations have been made of Sia intake in infants from HM. The Sia intake estimated in our study (expressed as mg/kg/day for child growth standards⁴³) during the first 15 days was 41% lower than that published by Carlson⁵ (123 ± 24 vs 210) and similar to the intake after 1 month (85 ± 9 vs 55–134)³ and from 3 to 6 months (37 ± 8 vs 31–40).^{5,13} In IFs, total Sia intake ranged from a minimum of 80 mg/day (0.5-month-old infants receiving IF-1) to a maximum of 255 mg/day (5-month-old infants receiving IF-13). Independent of the IF involved, the average total Sia intake ranged from 119 to 171 mg/day at 0.5 and 6 months (Figure 4b). Generally, no statistically significant differences ($p < 0.05$) were found between the different months. Only a slightly higher content at 4 and 5 months was noted with respect to months 0.5 and 1.

The only values referred to Sia intake from IFs published to date correspond to a previous study by our research group.¹³ In general, the Sia intake obtained for each IF analyzed was higher than those recorded previously. Sia intakes through HM were higher than through IFs during the first 6 months of lactation. The pattern of Sia intake from IF differs with respect to intake from HM. In IF, Sia intake increases slowly until 5 months. Thus, when the infant is fed only these IFs, the mean total Sia intake is 23, 41, 69, and 72% of that provided by breast-feeding at 0.5, 1, 3, and 6 months, respectively. In the fifth month, two-thirds of the IFs analyzed (IF-3, IF-4, IF-5, IF-8, IF-10, IF-11, IF-12, and IF-13) would reach the intake provided by HM in this period (238 ± 30 mg/day). Only IF-13 would reach intakes provided by HM from the second month (255 ± 38 to 238 ± 30 mg/day).

Sialic Acid Bioaccessibility. Some studies have applied in vitro dynamic digestion techniques simulating infant gastrointestinal conditions. Ménard et al.⁴⁴ validated a simple in vitro dynamic gastrointestinal digestion model and compared

it with an *in vivo* method (in piglets). These authors confirmed the rapid hydrolysis of casein under gastric conditions, whereas whey proteins appeared more resistant to digestion. Bourlieu et al.⁴⁵ studied the way in which the structure of the IF emulsion modifies the kinetics of the digestion. Such semidynamic models are more complex, expensive, and difficult to reproduce than the *in vitro* static models and have not been applied to determine the BA of Sia. Thus, as a first step in evaluating the BA of Sia, and as an improvement upon a static method applied in a preliminary study,²⁶ an *in vitro* digestion model has been applied.

Preliminary Assays. In this phase of work, we have compared two static *in vitro* digestion methods of bioaccessibility evaluation in the same mature HM. In a previous work carried out by our research group,²⁶ Sia bioaccessibility was determined in a HM pool (4–7 months), after gastrointestinal digestion in two stages. In the present study, micellar digestion in three steps with the addition of neuraminidases was applied to the same aforementioned HM pool of study of Lacomba et al.²⁶

In addition, with the purpose of evaluating possible interferences or contributions by the blank, we performed digestion blanks with soy IF (vegetable matrix containing no Sia, but as complex as the samples under study) and reagent blanks.

As expected, the undigested soy IF showed no Neu5Gc contents, and the Neu5Ac contents were below the limit of detection (2.11 ng assay) (data not shown). In contrast, the BF of the soy IF (Figure 1c) and the reagent blank (Figure 1d) presented peaks at the retention times of Neu5Gc and Neu5Ac. On subtracting the contribution of the reagent blanks from BF of the soy IF, Neu5Ac and Neu5Gc were confirmed to be absent in the BF of the soy IF. In this regard, Spichtig et al.,⁴ on conducting hydrolytic studies with enzymes as a step prior to determining IFs by HPLC, noted that the use of sialidase can cause interferences with the peak of Neu5Gc, although the underlying cause is not known. Therefore, the interference

observed in our study might be attributable to neuraminidase in the salivary step of digestion, and the blank response must be subtracted from all of the digested samples.

Taking into account the total Sia content in the pool of undigested HM (29.99 ± 0.78 mg/100 mL)²⁶ and BF (21.80 ± 1.17 mg/100 mL), Sia was found to exhibit lower BA than reported by Lacomba et al.²⁶ (73 ± 4 vs $87 \pm 2\%$). This fact could be due to differences in the *in vitro* digestion applied, mainly in the intestinal phase. Together with pancreatin used (type and similar amount in both studies) in our study, we add several individual enzymes (colipase, phospholipase A2, lipase, cholesterol esterase) and taurocholate salts to provide optimum conditions for micellization not considered in the method of Lacomba et al.,²⁶ as well as the addition of neuraminidases in salivary phase (stage not present in the digestion of Lacomba et al.²⁶). Intra- and interday variabilities (5–9 and 21%, respectively) could also explain this difference.

Sia Bioaccessibility in HM versus IF. An *in vitro* digestion model has been applied to colostrum and mature HM (1 month of lactation) and to three IFs without (IF-2) or with the incorporation of MFGM (IF-5 and IF-6). The total Sia, Neu5Ac, and Neu5Gc contents of the BF and their BA in the analyzed samples are shown in Table 4. The BA of Neu5Gc in IFs (78.33–84.47%) was lower than that of Neu5Ac (88.25–93.88%). It should be noted that in adults, Neu5Gc is usually little absorbed and may be rapidly excreted in urine. Furthermore, an immunogenic response occurs when a normal adult is exposed to glycoconjugate containing Neu5Gc.⁴⁶ Therefore, Neu5Gc ingested with the IFs could be degraded by intestinal enzymes before reaching the bloodstream. However, this immunogenic response against Neu5Gc during the first days of an infant's life must be studied.¹⁷

In the same way as with the undigested samples, following simulated digestion, the total Sia contents in BF show the following sequence: colostrum > mature HM >

IFs (Figure 1e). Statistically significant differences ($p < 0.05$) were found only between mature HM and colostrum or IFs (Table 4).

The greatest BA corresponded to colostrum (96%) and was similar to that of the IFs (88–93%)—both being significantly different ($p < 0.05$) from the BA of mature HM (73%) (Table 4). This is due to the fact that the BA of mature HM in undigested samples decreased 3–6 times more than in colostrum and IFs. In this regard, Lacomba et al.²⁶ found no Sia in the digestion residue. The decrease in Sia in the BF thus could be explained by the fact that under the conditions used to simulate the gastric stage (pH 4 and 37 °C), Sia may be present in open and hemiacetal forms in equilibrium, and both could suffer dehydration—the open form yielding a highly reactive conjugate system (Michael’s acceptor) and the hemiacetal form yielding an acetal unable to react with DMB.

By comparison of our results with the only BA data published to date,²⁶ BA was seen to be greater in IFs (91 ± 2 vs $77 \pm 2\%$) and lower in mature HM (1 month) (72 ± 5 vs $87 \pm 2\%$). This difference may be due to the type of digestion involved and the effect of the food matrix (explained below).

The differences in BA between colostrum and mature HM may be due to the respective compositions involved. Sialic acid can be bound to proteins, oligosaccharides, and gangliosides (lipids) or found in free form. In colostrum, the fat is dispersed into small drops and coated with a greater MFGM content than mature HM (characterized by large globules and lesser amounts of MFGM), thereby facilitating lipolysis and digestion.⁴⁷ As for proteins and oligosaccharides, colostrum has a greater Sia content bound to oligosaccharides and proteins than mature HM.^{12,48} Proteins have greater solubility at neutral pH, so rapid hydrolysis can be produced in the intestinal phase (pH 6.8–7.2).⁴⁴ In addition, the whey/casein ratio is different, with higher serum protein contents in colostrum than in mature HM (90:10 vs 60:40, respectively),³¹ and whey proteins usually contain more bound Sia.

With regard to oligosaccharides, these compounds are not digested and absorbed in the small intestine of healthy newborn infants, as reported by Brand-Miller et al.⁴⁹ on performing lactulose hydrogen breath tests; rather, they would reach the colon, where the growth of bifidogenic flora may be favored. Engfer et al.⁵⁰ studied this effect in an in vitro digestion model applied to neutral and acidic oligosaccharides, using enzymes prepared from human (maltase) and porcine pancreatic tissue (α -amylase) and human and porcine intestinal brush border membranes. They likewise found oligosaccharides to resist hydrolysis in the intestine, releasing only <3% of the possible Sia. Furthermore, it has been found that part of these oligosaccharides are absorbed intact, so they are bioaccessible, because they are eliminated in the urine of infants,⁵¹ and the fraction of Sia bound to them therefore could be absorbed. In suckling mice to which radioactively labeled Sia was administered, Sia was seen to penetrate the bloodstream, followed by excretion in urine, with greater absorption of free Sia, followed by Sia bound to oligosaccharides and proteins. These authors also noted that suckling mice metabolize a greater amount of sialyllactose than adult mice.²⁵ Therefore, the high proportion of Sia in colostrum appears to provide the infant with optimal conditions for absorption and utilization,¹ thereby meeting the needs for development in this crucial stage of life.

The greater BA of IFs with respect to mature HM could be due to the fact that IFs are characterized by smaller milk fat globules due to homogenization—a high-pressure mechanical treatment used to decrease globule size and rupture MFGM, stabilizing the droplet surface of the IFs with casein micelles, whey protein aggregates, and possibly remnants of MFGM.^{45,52–54} This smaller size results in a larger water–fat interphase, increasing the lipolysis and adsorption and proteolysis of lactoglobulin and caseins.⁵⁴ The greater content of Sia bound to proteins in IFs versus mature HM (70 vs 21–28%)² along with its higher content of whey proteins (see Table 1) could justify the greater BA of Sia in IFs.

Intake of Sia Provided by the Bioaccessibility of HM versus IF. Daily intake of Sia provide by HM (colostrum and mature HM) and IF used in assays of

bioaccessibility and their soluble fraction are shown in Figure 4, panels a and b, respectively. It was observed that the daily intakes of Sia from the colostrum (Figure 4a) and the IF (Figure 4b), as well as their bioaccessible fractions, were similar. Nevertheless, in mature HM (1 month) (Figure 4a) Sia intake after digestion of mature HM (intake calculated from Sia content in soluble fraction) decreases by 28%. Despite this decline, Sia intake from the soluble fraction of IFs reaches only 49–57% of the intake provided by the soluble fraction of mature HM.

In general, the Sia contents and intakes in IFs are lower than in mature HM, although no relationship has been established between ingredients incorporated to IFs as good sources of Sia and total Sia contents in IFs. Despite the lower total Sia content in IFs, the corresponding BA is higher than in mature HM and similar to that of colostrum. However, IFs do not reach the amount of soluble Sia available for absorption (BF) provided by HM. Given the complexity of IFs, further studies designed to characterize the Sia contained in their ingredients are needed to develop Sia patterns in IFs and BA similar to those found in HM.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(M.J.L.) Phone: +34-963544909. Fax +34-963544954. E-mail: m.j.lagarda@uv.es.

Funding

This work belongs to a CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) project granted to Hero Spain, S.A.; L.C. is the holder of a fellowship from this company.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ABBREVIATIONS USED

BA, bioaccessibility; BF, bioaccessible fraction; BSA, bovine serum albumin; DMB, 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene dihydrochloride; DWP, desmineralized whey powder; CGMP, glycomacropeptide; HM, human milk; IFs, infant formulas;

MFGM, milk fat globule membrane; Neu5Ac, N-acetylneuraminic acid; Neu5Gc, N-glycolylneuraminic acid; Sia, acid sialic; WPC, whey protein concentrate.

■ REFERENCES

- (1) Wang, B. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu. Rev. Nutr.* **2009**, *29*, 177–222.
- (2) Wang, B.; Brand-Miller, J.; McVeagh, P.; Petocz, P. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *74*, 510–515.
- (3) Wang, B.; Brand-Miller, J. The role and potential of sialic acid in human nutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2003**, *57*, 1351–1369.
- (4) Spichtig, V.; Michaud, J.; Austin, S. Determination of sialic acids in milks and milk-based products. *Anal. Biochem.* **2010**, *405*, 28–40.
- (5) Carlson, S. E. N-Acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* **1985**, *41*, 720–726.
- (6) Varki, A.; Schauer, R. Sialic acids. In *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed.; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., Etzler, M. E., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, 2009; pp 35–52.
- (7) Salcedo, J.; Barbera, R.; Matencio, E.; Alegria, A.; Lagarda, M. J. Gangliosides and sialic acid effects upon newborn pathogenic bacteria adhesion: an in vitro study. *Food Chem.* **2013**, *136*, 726–734.
- (8) Neeser, J. R.; Golliard, M.; Del Vedovo, S. Quantitative determination of complex carbohydrates in bovine milk and in milk based infant formulas. *J. Dairy Sci.* **1991**, *74*, 2860–2871.
- (9) Sabharwal, H.; Sjoblad, S.; Lundblad, A. Sialylated oligosaccharides in human milk and feces of preterm, full-term, and weaning infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1991**, *12*, 480–484.
- (10) Heine, W.; Wutzke, K. D.; Radke, M. Sialic acid in breast milk and infant formula food. *Monatsschr. Kinderheilkd.* **1993**, *141*, 946–950.
- (11) Brand-Miller, J.; Bull, S.; Miller, J.; Mcveagh, P. The oligosaccharide composition of human milk: temporal and individual variations in monosaccharide components. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1994**, *19*, 371–376.

- (12) Martín-Sosa, S.; Martín, M. J.; García-Pardo, L. A.; Hueso, P. Distribution of sialic acids in the milk of Spanish mothers of full term infants during lactation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2004**, *39*, 499–503.
- (13) Lacomba, R.; Salcedo, J.; Alegría, A.; Barberá, R.; Hueso, P.; Matencio, E.; Lagarda, M. J. Sialic acid (N-acetyl and Nglycolylneuraminic acid) and ganglioside in whey protein concentrates and infant formulae. *Int. Dairy J.* **2011**, *21*, 887–895.
- (14) Qiao, Y.; Feng, J.; Yang, J.; Gu, G. The relationship between dietary vitamin A intake and the levels of sialic acid in the breast milk of lactating women. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2013**, *59*, 347–351.
- (15) Li, H.; Fan, X. Quantitative analysis of sialic acids in Chinese conventional foods by HPLC-FLD. *Open J. Prev. Med.* **2014**, *4*, 57–63.
- (16) Salcedo, J.; Gormaz, M.; López-Mendoza, M. C.; Nogarotto, E.; Silvestre, D. Human milk bactericidal properties: effect of lyophilization and relation to maternal factors and milk components. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2015**, *60*, 527–532.
- (17) Sánchez-Díaz, A.; Ruano, M. J.; Lorente, F.; Hueso, P. A critical analysis of total sialic acid and sialoglycoconjugate contents of bovine milk-based infant formulas. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1997**, *24*, 405–410.
- (18) Martín, M. J.; Vázquez, E.; Rueda, R. Application of a sensitive fluorometric HPLC assay to determine the sialic acid content of infant formulas. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 2943–2949.
- (19) Sørensen, L. K. Determination of sialic acids in infant formula by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **2010**, *24*, 1208–1212.
- (20) Salcedo, J.; Lacomba, R.; Alegría, A.; Barberá, R.; Matencio, E.; Lagarda, M. J. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determining sialic acid in infant formulas. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1905–1910.
- (21) Hurum, D. C.; Rohrer, J. S. Determination of sialic acids in infant formula by chromatographic methods: a comparison of highperformance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and ultra-high-performance liquid chromatography methods. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 1152–1161.
- (22) Li, C.; Liu, L.; Xie, H.; Liu, N. Determining Neu5Ac in infant formula with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int. J. Dairy Technol.* **2015**, *68*, 166–173.

- (23) Fernández-García, E.; Carvajal-Lérida, I.; Pérez-Gálvez, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr. Res. (N. Y., NY, U. S.)* **2009**, *29*, 751–760.
- (24) Bardor, M.; Nguyen, D. H.; Diaz, S.; Varki, A. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid Nglycolylneuraminic acid into human cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4228–4237.
- (25) Nöhle, U.; Schauer, R. Metabolism of sialic acids from exogenously administered sialyllactose and mucin in mouse and rat. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1984**, *365*, 1457–1467.
- (26) Lacomba, R.; Salcedo, J.; Alegría, A.; Barberá, R.; Hueso, P.; Matencio, E.; Lagarda, M. J. Effect of simulated gastrointestinal digestion on sialic acid and gangliosides present in human milk and infant formulas. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5755–5762.
- (27) Claumarchirant, L.; Matencio, E.; Sanchez-Siles, L. M.; Alegría, A.; Lagarda, M. J. Sterol composition in infant formulas and estimated intake. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7245–7151.
- (28) Claumarchirant, L.; Cilla, A.; Matencio, E.; Sanchez-Siles, L. M.; Castro-Gomez, P.; Fontecha, J.; Alegría, A.; Lagarda, M. J. Addition of milk fat globule membrane as an ingredient of infant formulas for resembling the polar lipids of human milk. *Int. Dairy J.* **2016**, *61*, 228–238.
- (29) Alemany, L.; Cilla, A.; Garcia-Llatas, G.; Rodriguez-Estrada, M. T.; Cardenia, V.; Alegría, A. Effect of simulated gastrointestinal digestion on plant sterols and their oxides in enriched beverages. *Food Res. Int.* **2013**, *52*, 1–7.
- (30) Fukui, Y.; Fukui, K.; Moriyama, T. Source of neuraminidase in human whole saliva. *Infect. Immun.* **1973**, *8*, 329–334.
- (31) Nguyen, T. T.; Bhandari, B.; Cichero, J.; Prakash, S. A comprehensive review on in vitro digestion of infant formula. *Food Res. Int.* **2015**, *76*, 373–386.
- (32) Piper, D. W.; Fenton, B. H. pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut* **1965**, *6*, 506.
- (33) Dickson, J. J.; Messer, M. Intestinal neuraminidase activity of suckling rats and other mammals. Relationship to the sialic acid content of milk. *Biochem. J.* **1978**, *170*, 407–413.
- (34) Puente, R.; Hueso, P. Lactational changes in the Nglycolylneuraminic acid content of bovine milk gangliosides. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1993**, *374*, 475–478.

- (35) Tang, K.-T.; Liang, L.-N.; Cai, Y.-Q.; Mou, S.-F. Determination of sialic acid in milk and products using high performance anionexchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection. *Chin. J. Anal. Chem.* **2008**, *36*, 1535–1538.
- (36) Puente, R.; García-Pardo, L. A.; Hueso, P. Gangliosides in bovine milk. Changes in content and distribution of individual ganglioside levels during lactation. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1992**, *373*, 283–288.
- (37) Puente, R.; García-Pardo, A.; Rueda, R.; Gil, A.; Hueso, P. Seasonal variations in the concentration of gangliosides and sialic acids in milk from different mammalian species. *Int. Dairy J.* **1996**, *6*, 315–322.
- (38) Chen, Y.; Pan, L.; Liu, N.; Troy, F. A.; Wang, B. LC-MS/MS quantification of N-acetylneuraminic acid, N-glycolylneuraminic acid and ketodeoxynonulosonic acid levels in the urine and potential relationship with dietary sialic acid intake and disease in 3-to 5-year-old children. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 332–341.
- (39) Bonnaillie, L. M.; Qi, P.; Wickham, E.; Tomasula, P. M. Enrichment and purification of casein glycomacropeptide from whey protein isolate using supercritical carbon dioxide processing and membrane ultrafiltration. *Foods* **2014**, *3*, 94–109.
- (40) Brody, E. P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *Br. J. Nutr.* **2000**, *84*, 39–46.
- (41) Sánchez-Juanes, F.; Alonso, J. M.; Zancada, L.; Hueso, P. Glycosphingolipids from bovine milk and milk fat globule membranes: a comparative study. Adhesion to enterotoxigenic Escherichia coli strains. *Biol. Chem.* **2009**, *390*, 31–40.
- (42) Hopper, K. E.; McKenzie, H. A. Minor components of bovine α -lactalbumin A and B. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct.* **1973**, *295*, 352–363.
- (43) WHO. Child growth standards. Weight-for-age. Charts of Zscores of boys and girls, 2006; http://www.who.int/childgrowth/standards/weight_for_age/en/ (accessed Oct 7, 2016).
- (44) Ménard, O.; Cattenoz, T.; Guillemin, H.; Souchon, I.; Deglaire, A.; Dupont, D.; Picque, D. Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chem.* **2014**, *145*, 1039–1045.
- (45) Bourlieu, C.; Ménard, O.; De La Chevasnerie, A.; Sams, L.; Rousseau, F.; Madec, M. N.; Robert, B.; Deglaire, A.; Pezennec, S.; Bouhallab, S.; Carrière, F.; Dupont, D. The structure of infant formulas impacts their lipolysis, proteolysis and disintegration during in vitro gastric digestion. *Food Chem.* **2015**, *182*, 224–235.

- (46) Tangvoranuntakul, P.; Gagneux, P.; Diaz, S.; Bardor, M.; Varki, N.; Varki, A.; Muchmore, E. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 12045–12050.
- (47) Lopez, C.; Cauty, C.; Guyomarc'h, F. Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. *Dairy Sci. Technol.* **2015**, *95*, 863–893.
- (48) Martin-Sosa, S.; Martín, M. J.; García-Pardo, L. A.; Hueso, P. Sialyloligosaccharides in human and bovine milk and in infant formulas: variations with the progression of lactation. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 52–59.
- (49) Brand-Miller, J. C.; McVeagh, P.; McNeil, Y.; Messer, M. Digestion of human milk oligosaccharides by healthy infants evaluated by the lactulose hydrogen breath test. *J. Pediatr.* **1998**, *133*, 95–98.
- (50) Engfer, M. B.; Stahl, B.; Finke, B.; Sawatzki, G.; Daniel, H. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1589–1596.
- (51) Newburg, D. S. Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2000**, *30*, S8–S17.
- (52) Berton, A.; Rouvellac, S.; Robert, B.; Rousseau, F.; Lopez, C.; Crenon, I. Effect of the size and interface composition of milk fat globules on their in vitro digestion by the human pancreatic lipase: native versus homogenized milk fat globules. *Food Hydrocolloids* **2012**, *29*, 123–134.
- (53) Gallier, S.; Cui, J.; Olson, T. D.; Rutherford, S. M.; Ye, A.; Moughan, P. J.; Singh, H. In vivo digestion of bovine milk fat globules: Effect of processing and interfacial structural changes. I. Gastric digestion. *Food Chem.* **2013**, *141*, 3273–3281.
- (54) Bourlieu, C.; Bouzerzour, K.; Ferret-Bernard, S.; Bourgot, C. L.; Chever, S.; Ménard, O.; Deglaire, A.; Cuinet, I.; Le Ruyet, P.; Bonhomme, C.; Dupont, D.; Le Huërou-Luron, I. Infant formula interface and fat source impact on neonatal digestion and gut microbiota. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2015**, *117*, 1500–1512.

Table 1. Main Ingredients of Infant Formulas (IFs) Analyzed^a

IFs	country	ingredients	RF	W:C
1	Spain	Lactose, milk lipids , maltodextrin, skimmed milk, vegetable oils (rapeseed, sunflower, oleic sunflower), wehey protein , minerals, fish oil (DHA), mortierella alpina oil (ARA), emulsifier (soya lecithin), vitamins.	13.5	68:32
2		demineralised wehey protein , skimmed milk, vegetable oils (palm, rapeseed, coconut, sunflower and mortierella alpina oil (ARA)), lactose, minerals, fish oil, soya lecithin, vitamins, milk proteins .	12.9	70:30
3		skimmed milk, lactose, vegetable oils (palm, palm kernel, rapeseed, sunflower, sunflower high oleic, arachidonic acid), FOS, wehey protein enriched with α-lactoalbumin , maltodextrin, minerals salt, emulsifier (soya lecithin), fish oil (source of DHA), vitamins, antioxidants.	13.5	60:40
4		Lactose, vegetable oils (palm, coconut, rapeseed, high oleic sunflower and sunflower), skimmed milk, wehey protein , GOS, maltodextrin, minerals, lecithin, fungi and seedweed oils, vitamins.	12.9	60:40
5		Lactose, vegetable oils (sunflower, rapeseed, palm, coconut, single cell oil), skimmed milk, GOS, milk fat, wehey protein enriched in MFGM, wehey protein enriched in α-lactoalbumin , minerals, soya lecithin, fish oil, fungi oils, vitamins.	13.0	62:38
6		Lactose, vegetable oils (sunflower, rapeseed, palm, coconut, single cell oil), skimmed milk, milk fat, wehey protein rich in MFGM, wehey protein rich in α-lactoalbumin , milk protein, vitamins, fish oil, fungi and seedweed oils, emulsifier (soya lecithin), minerals.	11.4	71:29
7	Sweden	Wehey milk , lactose, skimmed milk, vegetable oil (palm, canola, coconut, sunflower), protein milk powder , maltodextrin, fish oil, oil from Mortierella alpina, soy lecithin, vitamins.	12.9	70:30
8		organic skimmed milk, organic demineralised wehey powder , organic vegetable oils (palm, rapeseed, sunflower), GOS, lactose, polyunsaturated oils (fish, vegetable), minerals, soya lecithin, vitamins.	13.0	70:30
9		Lactose, vegetable oils (sunflower, rapeseed, palm, coconut, single cell oil), skimmed milk, GOS, milk fat, wehey protein enriched in MFGM, wehey protein enriched in α-lactoalbumin , minerals, soya lecithin, fish oil, fungi oils, vitamins.	13.0	62:38

Table 1. (Continuation)

IFs	country	ingredients	RF	W:C
10	Czech Republic	demineralised whey powder , vegetable oils, whole milk powder , lactose, skimmed milk powder, GOS, minerals, vitamins, emulsifier (lecithin).	12.9	66:34
11		demineralised whey , vegetable oils (palm, rapeseed, sunflower, coconut, microbiologic (ARA)), lactose, milk , FOS, GOS, minerals, vitamins, soya lecithin.	13.5	60:40
12		demineralized whey (from milk), vegetable oil, lactose, whey of skimmed milk, GOS, whey protein concentrate (from milk), FOS, minerals, vitamins soya lecithin.	13.5	60:40
13		whey hydrolyzate , vegetable oils (palm, rape, coconut, sunflower, oils from microbial resource (ARA)), GOS, FOS, lactose, dried skim milk, concentrated whey milk , soya lecithin.	13.8	50:50

^aReconstitution factors (RF) in % w/v and ratio whey/casein (W:C). In bold are highlighted the ingredients that can be a source of Sia. ^bARA, arachidonic; DHA, docosahexaenoic; FOS, fructooligosaccharides; GOS, galactooligosaccharides; MFGM, milk fat globule membrane.

Table 2. Neu5Ac Content (mg/100 mL) in Human Milk Analyzed^a

stage of lactation ^b (month)	city of Spain ^c	Neu5Ac ^d	literature data
colostrum ^a	Madrid (n=25)	101.6±7.6 ^y	127-156 ^{2,3,11}
	Valencia/Murcia (n=8)	136.1±8.4 ^z	
transition ^b	Madrid (n=25)	89.4±4.5 ^y	9-130 ^{2,7-10}
	Valencia/Murcia (n=8)	92.3±1.5 ^z	
mature	1 ^c Madrid (n=24)	51.0±1.6 ^y	23-98 ^{3,7,9-13,15}
	Valencia (n=4)	52.5±2.2 ^z	
	Murcia (n=13)	61.0±4.1 ^z	
	3 ^d Madrid (n=21)	26.6±0.9 ^y	
	Valencia (n=10)	36.1±2.2 ^z	
	Murcia (n=11)	33.7±0.7 ^z	
	6 ^d Madrid (n=20)	24.5±2.1 ^y	
	Valencia (n=4)	31.9±2.5 ^z	
	Murcia (n=6)	30.2±0.9 ^z	
	9	Valencia/Murcia (n=5)	
12	Valencia/Murcia (n=8)	28.1±2.1	

^aValues are expressed as the mean ± standard deviation of three replicates. ^bNo coincidence in superscript letters (a-d) indicates significant differences ($p < 0.05$) with the lactation period, independent of geographic zone. ^cn, number of milk samples in each pool. Central zone, Madrid; coastal zone, Valencia and Murcia. ^dNo coincidence in superscript letters (y, z) indicates significant differences ($p < 0.05$) with the geographic zone.

Table 3. Total Sialic Acid, Neu5Ac, and Neu5Gc Contents in Infant Formulas Analyzed^a

IF	country	Neu5Ac	Neu5Gc	total
1	Spain	12.6 ± 0.9 ^a	0.53 ± 0.02 ^{a,b}	13.1 ± 0.9 ^a
2	Spain	16.6 ± 1.0 ^{b,c}	0.55 ± 0.03 ^{a,b}	17.2 ± 1.1 ^{b,c}
3	Spain	19.4 ± 0.8 ^{c,d}	0.61 ± 0.14 ^{a,b}	20.0 ± 0.9 ^{c,d}
4	Spain	20.2 ± 1.1 ^d	0.97 ± 0.18 ^c	21.2 ± 1.1 ^d
5	Spain	20.5 ± 1.7 ^d	0.69 ± 0.03 ^b	21.2 ± 1.7 ^d
6	Spain	19.7 ± 0.2 ^{c,d}	0.61 ± 0.02 ^{a,b}	20.4 ± 0.3 ^{c,d}
7	Sweden	14.9 ± 0.2 ^{a,b}	0.48 ± 0.00 ^a	15.4 ± 0.2 ^{a,b}
8	Sweden	20.7 ± 1.8 ^d	0.52 ± 0.02 ^{a,b}	21.2 ± 1.8 ^d
9	Sweden	15.1 ± 0.7 ^{a,b}	0.14 ± 0.01 ^d	15.2 ± 0.7 ^{a,b}
10	Czech Republic	21.3 ± 0.8 ^d	0.50 ± 0.02 ^{a,b}	21.8 ± 0.9 ^d
11	Czech Republic	19.52 ± 1.24 ^{c,d}	0.55 ± 0.00 ^{a,b}	20.1 ± 1.2 ^{c,d}
12	Czech Republic	20.8 ± 2.0 ^d	0.57 ± 0.02 ^{a,b}	21.4 ± 2.0 ^d
13	Czech Republic	25.1 ± 1.0 ^e	0.64 ± 0.01 ^{a,b}	25.8 ± 1.0 ^e

literature data^{2,3,7,12,16-22}

6.5-29

47-94^b250^{b,c}1.5-5.9^b11^{b,c}

^aValues are expressed in mg/100 mL as the mean ± standard deviation of three replicates. Different letters in the same column indicate significant differences between infant formulas (IFs). Tukey's HSD test. ^bValues are expressed in mg/100 g. ^cIF added of colostrum.

Table 4. Sia Content (mg/100 mL) in HM and IFs Nondigested and Their Bioaccessible Fraction (BF) and Bioaccessibility (%)^a

		Neu5Ac	Neu5Gc	total	bioaccessibility
colostrum	ND	136.1 ± 8.4		136.1 ± 8.4	96 ± 7 ^a
	BF	131.3 ± 10.0		131.3 ± 10.0 ^a	
mature milk (1 month)	ND	52.5 ± 2.2		52.5 ± 2.2	72 ± 5 ^b
	BF	38.1 ± 2.4		38.1 ± 2.4 ^b	
IF-2	ND	16.6 ± 1.0	0.55 ± 0.03	17.2 ± 1.1	93 ± 5 ^a
	BF	15.6 ± 0.7	0.43 ± 0.02	16.0 ± 0.9 ^c	
IF-5	ND	20.5 ± 1.7	0.69 ± 0.03	21.2 ± 1.7	88 ± 5 ^a
	BF	18.1 ± 1.1	0.57 ± 0.06	18.7 ± 1.2 ^c	
IF-6	ND	19.7 ± 0.2	0.61 ± 0.02	20.3 ± 0.3	91 ± 7 ^a
	BF	18.0 ± 1.5	0.51 ± 0.06	19.2 ± 1.6 ^c	

^aIn the same column, different superscript letters between different infant foods denote significant differences ($p < 0.05$) in Sia total content of BF or percentages BA. Tukey's HSD test. ND, nondigested; BF, bioaccessible fraction; BA, bioaccessibility.

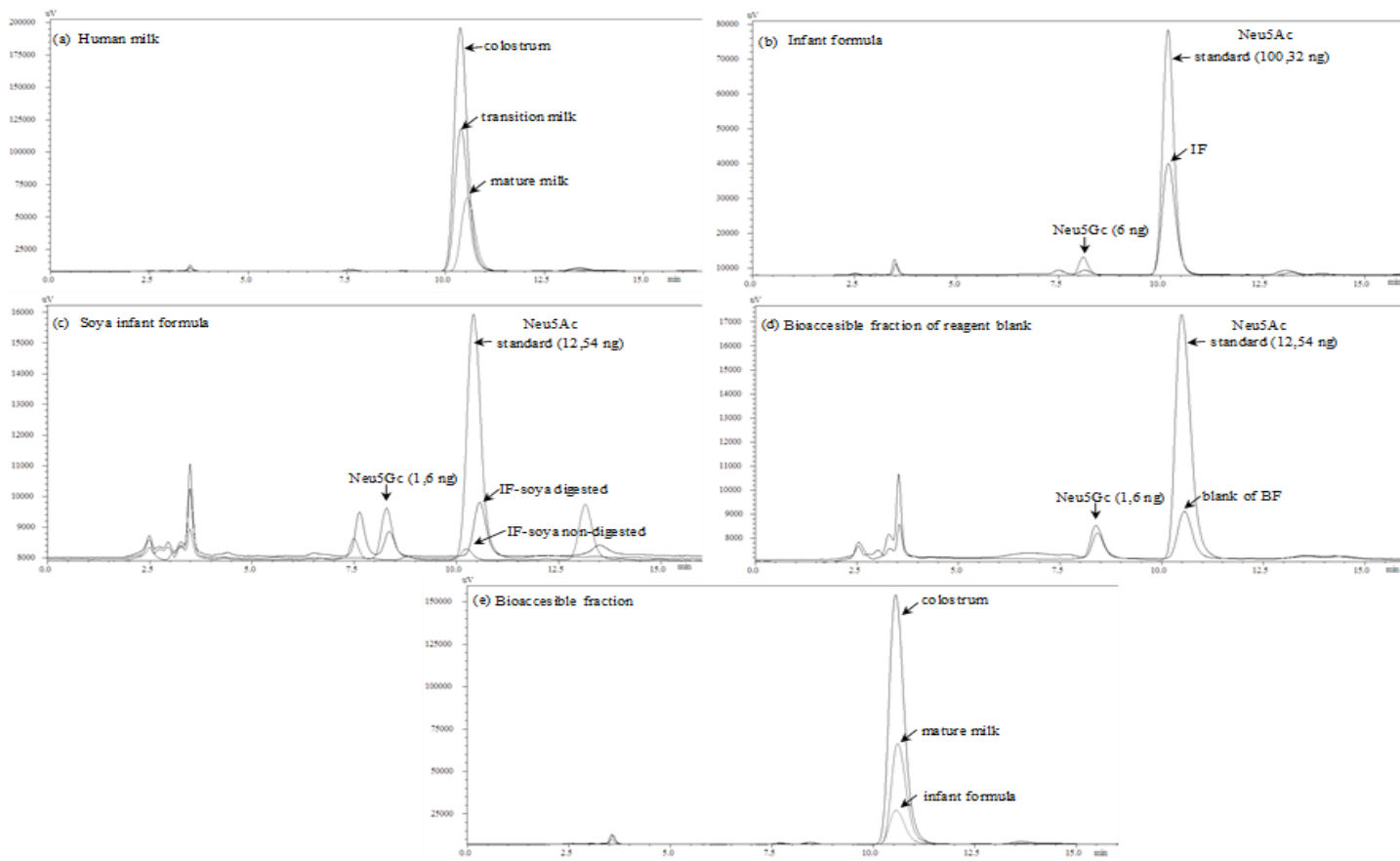


Figure 1. Chromatograms of (a) human milk (HM), (b) infant formula (IF), (c) IF-soy nondigested and digested, (d) bioaccessible fraction of reagent blank, and (e) bioaccessible fraction of human milk and infant formulas.

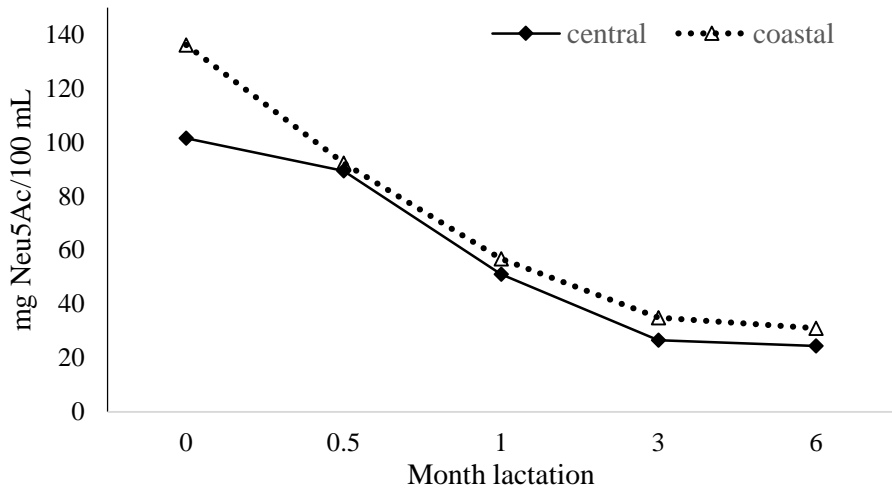


Figure 2. Interaction plot of the two geographic zones with time of lactation.

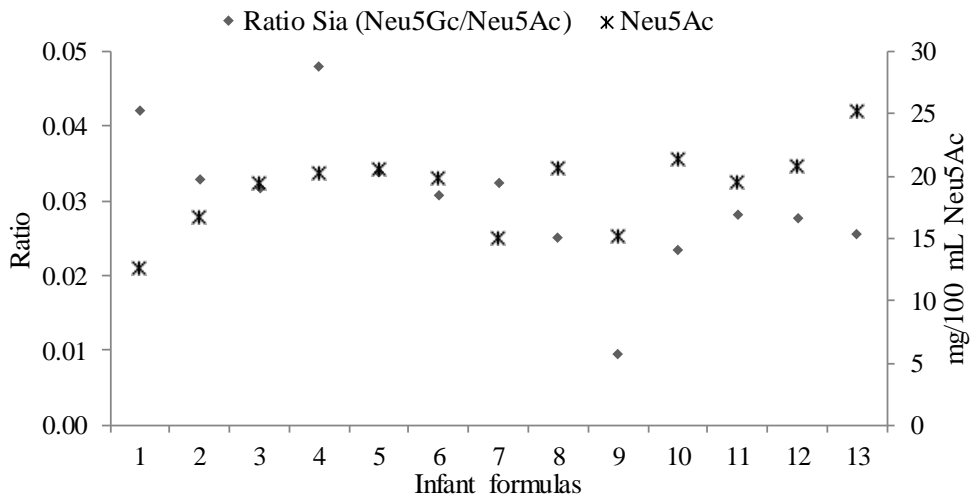


Figure 3. Neu5Gc/Neu5Ac ratio in different infant formulas and content of Neu5Ac.

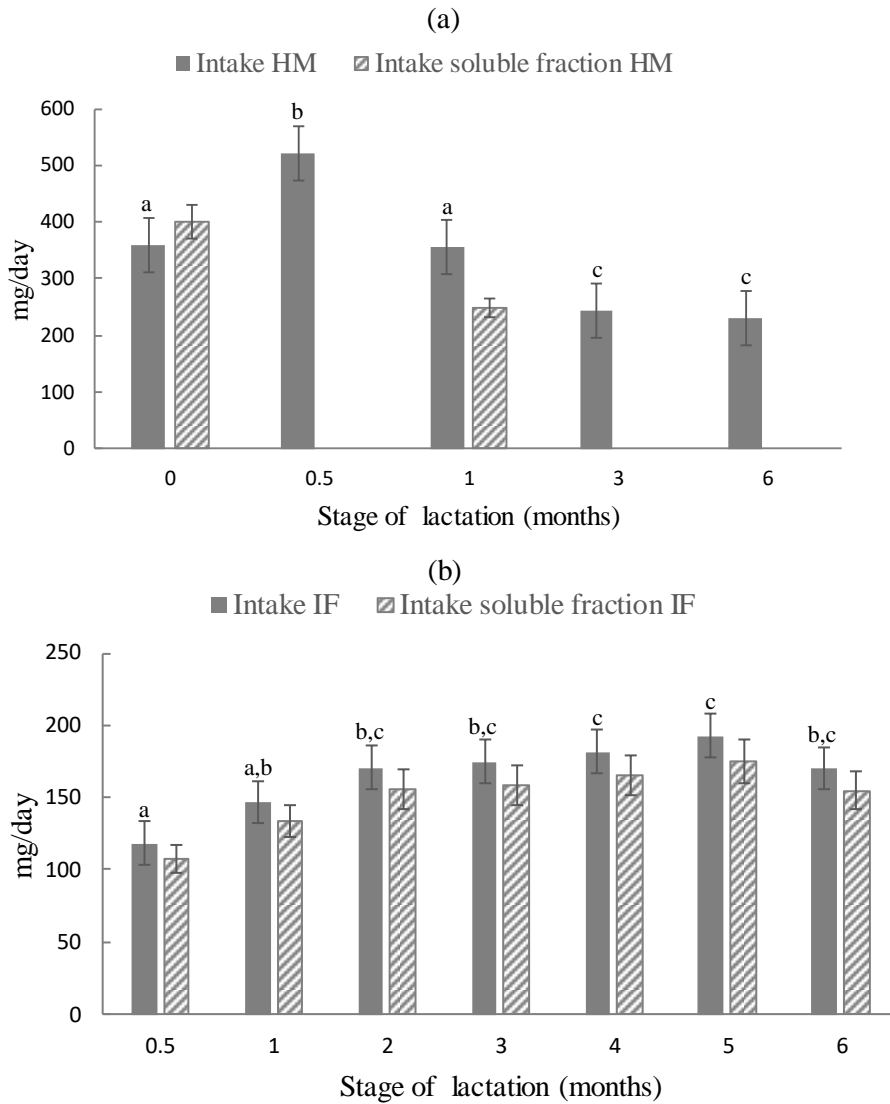


Figure 4. Average intake of total Sia in HM and their soluble fraction (a) and IFs and their soluble fraction (b). Different letters above bars denote significant differences ($p < 0.05$) between lactation stages. Tukey's HSD test.

6.- Ingrediente rico en membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM) como fuente de gangliósidos en preparados para lactantes

Ingredient rich in milk fat globule membrane (MFGM) as a source of gangliosides in infant formula

L. Claumarchirant¹, L. M. Sanchez-Siles², A. Alegría¹, M. J. Lagarda^{1*}

¹Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmàcia, Universitat de València, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 - Burjassot (Valencia) España.

²Instituto de Nutrición Infantil de Hero. Grupo Hero. Avda. Murcia 1, 30820 – Alcantarilla (Murcia), España.

*Maria Jesus Lagarda (telephone +34-963544909; Fax +34-963544954; E-mail: m.j.lagarda@uv.es)

Acta Pediátrica, 2017 (aceptado, pendiente de publicación)

Resumen

Introducción: Los gangliósidos (GG) son compuestos bioactivos importantes para el lactante (desarrollo neuronal, sistema inmune, ...), presentes en la leche humana (LH) y en menor cantidad en los preparados para lactantes (PL).

Con el objetivo de evaluar la influencia de adicionar a los PL un ingrediente rico en membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM) y asemejar los contenidos de GG a la LH, se determina el contenido total de GG en diferentes PL comercializados en el mercado europeo. Además, se estima la ingesta de GG por los lactantes alimentados con estos PL.

Material y métodos: Se determina el contenido de GG en 13 PL comercializados en Europa mediante espectrofotometría, utilizando el reactivo colorimétrico resorcinol. Para las ingestas, se utilizan volúmenes medios de PL ingeridos por 1113 lactantes, obtenidos de la literatura, correspondientes a los primeros 6 meses.

Resultados y Discusión: El contenido de GG en los PL varía de 0,30 a 2,69 mg ASUL/L, presentando los mayores contenidos de GG los PL que llevan adicionado en su formulación el ingrediente rico en MFGM (1,23-2,69 mg ASUL/L). De los PL con MFGM, el PL-6 es el que presenta contenidos significativamente mayores ($p < 0,05$). Independientemente del PL, la ingesta diaria de GG es mayor en los PL con MFGM y oscila de 0,58 a 0,94 mg ASUL/día.

Conclusiones: La adición de MFGM a los PL es una buena estrategia para mejora los contenidos e ingestas de GG en PL.

Palabras clave: Gangliósidos, preparados para lactantes, membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM), ingestas.

Abstract

Introduction: Gangliosides (GG) are important bioactive compounds for the newborn (normal neuron development, immune system, etc.), present in human milk (HM) and in lesser amounts in infant formulas (IFs).

With the aim of evaluating the influence of the addition of an ingredient rich in milk fat globule membrane (MFGM) and in order to obtain amounts of GG similar to those found in HM, the total GG content was determined in several IFs marketed in Europe. In addition, the GG intake by infants fed with these formulas was estimated.

Material and methods: Thirteen powdered cows' milk-based IFs marketed in Europe were analyzed by spectrophotometry, using the resorcinol method. To estimate GG intake, average IF volume of 1113 newborn corresponding to the first 6 months of life, obtained from the literature, were used.

Results and discussion: The total content of GG of the 13 IFs ranges between 0.30 to 2.69 mg ASUL/L, presenting the highest contents of GG, the IFs enriched with MFGM (1.23-2.69 mg ASUL/L). Of the IFs enriched with MFGM, the higher statistically significant value ($p < 0.05$) was found in IF-6. The dairy intake of GG was higher in IF enriched with MFGM and independently of IF ranges from 0.58 to 0.94 mg ASUL/day.

Conclusions: The addition of ingredients rich in MFGM in IF improves the content and daily intake of GG.

Keywords: Gangliosides, infant formulas, milk fat globule membrane (MFGM), intakes.

Introducción

La leche humana (LH) y los preparados para lactantes (PL) contienen gangliósidos (GG), los cuales son compuestos bioactivos importantes para el desarrollo neuronal de los lactantes¹. Los GG también pueden regular el sistema inmune, apoyar la maduración intestinal², tienen funciones protectoras contra patógenos entéricos^{2,3} y estimulan la proliferación de bifidobacterias en el intestino de los lactantes². Las funciones biológicas antes mencionadas han producido un gran interés en la determinación del contenido de GG en los PL, sustitutos de la LH cuando la lactancia materna no es posible.

Los GG son un grupo complejo de glicoesfingolípidos, constituidos por una ceramida (núcleo hidrofóbico) y una cadena oligosacárida hidrófila que contiene al menos un resto de ácido siálico. La ceramida se compone principalmente de una base esfingioide unida mediante un enlace amida a un ácido graso con una longitud de cadena y saturación variable⁴.

Los GG pueden ser determinados, indirectamente, por espectrofotometría de absorción molecular con reactivo resorcinol, expresándolos como ácido siálico unido a lípidos (ASUL)⁵ o, directamente, por cromatografía líquida con espectrofotometría de masas, expresándolos como GG. El disialogangliósido 3 (GD₃) y monosialogangliósido 3 (GM₃) son los predominantes en LH. En LH, el contenido y perfil de GG cambian a lo largo de la lactancia: de 7 mg ASUL/L en calostro, (70% de GD₃ y 9% de GM₃) a 4 mg ASUL/L en LH madura (9% GD₃ y 85% GM₃)^{6,7}. Los PL proporcionan menores cantidades de GG y un perfil diferente comparado con la LH, que oscilan entre 0,4-6,2 mg ASUL/L^{3,8-11} o entre 5-11,4 mg GG/L¹² o 3,5-18,9 mg GG/100 g^{13,14}, siendo el mayoritario el GD₃ (82-65%), seguido por GM₃ (0,3-11%).

En la formulación de los PL se intenta que su composición y funcionalidad sean lo más similar posible a la LH. En este sentido, existen ingredientes ricos en compuestos bioactivos, que pueden ser añadidos a la formulación de PL como grasa láctea, β -suero, proteínas del suero desmineralizado, proteínas del suero

concentradas^{8,13}. Particularmente, el concentrado de proteínas séricas rico en membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM) es una buena fuente de GG^{11,13}.

En los últimos años ha crecido el interés en la estructura y composición de los glóbulos grasos de la leche¹⁵. En parte es debido a las actividades biológicas relacionadas con la MFGM. Los lípidos bioactivos del MFGM están compuestos principalmente por fosfolípidos¹⁶, colesterol¹⁷ y GG¹¹. Recientes estudios han descrito efectos beneficiosos sobre neurodesarrollo y defensa contra infecciones en lactantes¹⁸. En un ensayo clínico realizado en Suecia con una fórmula enriquecida con MFGM se observó un desarrollo cognitivo similar a los niños alimentados con LH¹⁹ y una menor incidencia de otitis media en el grupo suplementado con la fórmula con MFGM que en el grupo control²⁰. Aunque no hay estudios clínicos realizados con los componentes individuales del MFGM, la suplementación de MFGM en PL puede reducir las diferencias que hay en desarrollo cognitivo e infecciones entre lactantes amamantados y alimentados con PL.¹⁸

En este estudio se determina el contenido total de GG en diferentes PL, con y sin adición de MFGM, comercializados en el mercado europeo. Además, se estima la ingesta de GG por los lactantes alimentados con estos preparados.

Material y métodos

Reactivos

Acetona, ácido clorhídrico fumante (HCl), cloroformo, cloruro potásico y metanol son obtenidos de Merck-Millipore (Darmstadt, Alemania). Ácido N-acetilneuramínico (pureza $\geq 95\%$) y resorcinol (mínimo 99%) son obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), y sulfato de cobre (III) pentahidratado comercializado por Panreac (Barcelona, España). Membrana de diálisis spectra/por (MWCO 3500) de Spectrumlabs (Rancho Dominguez, CA, USA). El agua ultrapura es obtenida por medio de un sistema de purificación de agua Millipore-Q (Milford, MA, EE.UU.).

La disolución de resorcinol, se prepara extemporáneamente con 10 mL de resorcinol 2% (p/v), 80 mL HCl fumante, 0,25 mL sulfato de cobre (III) pentahidratado 0,1M y 9,75 mL de agua ultrapura.

Muestras

Se analizan 13 PL de base láctea en polvo, comercializados en tres ciudades europeas (España, Suecia y República Checa). La composición y el factor de reconstitución (FR) de todos los preparados en polvo son resumidos en la Tabla 1.

Determinación de gangliósidos

Cinco g de PL en polvo, por duplicado se tratan con acetona para eliminar los lípidos neutros. El residuo obtenido se trata con cloroformo:metanol, en distintas proporciones, para extraer los lípidos. A continuación, los GG se extraen mediante partición de Folch, dializando la fracción de GG en agua destilada a 4°C durante 48 horas. El dializado se liofiliza, se resuspende en 1 mL de cloroformo:metanol (2:1, v/v) y se centrifuga¹¹.

El contenido total de GG se determina, como ASUL, por espectrofotometría del visible con resorcinol²¹. En resumen, 10 µl del sobrenadante del extracto de GG se evaporan a sequedad. Se añaden 500 µl de agua ultrapura y 500 µL de reactivo resorcinol. Se calientan durante 15 minutos a 100°C en un bloque calefactor. Tras enfriar, se añade 1 ml de alcohol amílico, se agita vigorosamente y se centrifuga (1000xg, 10 min, 4°C). Se realiza la determinación espectrofotométrica (Lambda 2. Perkin-Elmer) a 580 nm en la fase orgánica frente a un blanco de alcohol isoamílico. Paralelamente se preparan blancos y disoluciones patrón con 5, 10 y 15 µg de ácido N-acetilneuramínico.

Estimación de ingestas

Se calcula la ingesta diaria (mg/día), durante los primeros 6 meses de vida del lactante, con los volúmenes medios de PL ingeridos por un total de 1113 recién nacidos a término, sanos y alimentados con PL, de acuerdo a Claumarchirant et al.¹⁷

Análisis estadístico

Para evaluar las posibles diferencias entre los contenidos de GG en PL se aplica un análisis de varianza (ANOVA) y un test Tukey's HSD ($p < 0,05$). ANOVA de dos factores (periodo de lactancia y tipo de PL) y un test Tukey's HSD ($p < 0,05$) se aplica a los valores medios de ingesta de GG. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus, versión 5.1 (Rockville, MD, EE.UU.).

Resultados y Discusión

Contenidos

En la Tabla 2 se muestran los contenidos de grasa y GG totales de los PL analizados. Los PL sin MFGM en su formulación presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en sus contenidos de GG y estos contenidos oscilan de 0,30 (PL-1) a 1,30 (PL-7) mg ASUL/L, situándose dentro del intervalo proporcionado por algunos autores (0,5-2,9 mg ASUL/L) (ver Tabla 2).

Con el fin de poder comparar los resultados obtenidos con los trabajos más recientes se expresan los resultados en mg de GG por 100g o L de PL, tratándose de una aproximación ya que se utiliza uno de los posibles pesos moleculares del GG mayoritario (GD_3). Se obtienen contenidos de GG inferiores a los indicados en la bibliografía, excepto para el PL-6 enriquecido con MFGM que está dentro del intervalo. Este hecho puede ser debido a las técnicas de masas utilizadas (LC/ESI-MS/MS, UPLC-ESI-MS/MS, HPLC-LTQ-MS) que permiten cuantificar los GG de manera directa¹²⁻¹⁴, así como a la diversidad de ingredientes utilizados en la formulación de los PL.

En relación a este último factor, Nesser et al.⁸ obtienen un amplio intervalo de contenido de GG (0,5-6,2 mg ASUL/L) en PL formulados con distintos ingredientes (proteicos -caseína, leche entera o desnatada, caseinato potásico, concentrado proteico del suero, proteína hidrolizada, suero desmineralizado en polvo, y lipídicos -grasa láctea, aceite de maíz, mezcla de aceites vegetales) y diferente composición (relación seroproteínas:caseínas, grasa láctea:grasa vegetal y lactosa:maltodextrinas). La variabilidad en los contenidos de GG en PL podría ser

debida a la diversidad, procedencia y forma de obtención de los ingredientes utilizados en su elaboración, hecho indicado ya en la bibliografía^{8,9}. En este sentido, los concentrados de proteínas del suero son ingredientes que se obtienen después de homogenizar la leche de vaca, un proceso que disgrega y dispersa la MFGM; por tanto, los GG de esta fracción pueden migrar a diferentes fracciones que se puedan formar como son nata, leche desnatada y componentes no grasos o del suero, proporcionando un contenido variable de GG a los PL cuando estos ingredientes son utilizados en la formulación.⁸ En literatura se observa que adicionar suero proteico a PL, indistintamente que el ingrediente utilizado sea suero en polvo desmineralizado o concentrado de proteína del suero, proporciona altas cantidades de GG (3,2-6,2 mg ASUL/L)⁸.

Los PL adicionados de MFGM (5, 6 y 9. Ver Tabla 2) muestran mayores contenidos de GG (1,23-2,69 mg ASUL/L), presentando el PL-6 contenidos significativamente superiores ($p < 0,05$) al PL-5 y PL-9. Este hecho solo se justificaría por la utilización de una menor cantidad de MFGM o ingrediente graso y/o proteico en la formulación de los PL-5 y PL-9. A pesar de las diferencias en la naturaleza de la grasa de los PL respecto a las fracciones grasas lácteas utilizadas como ingrediente, esta relación directa entre contenidos de grasa y GG ha sido indicada para leche de otras especies de mamíferos²². Al respecto existen distintos ingredientes de MFGM comercializados y patentados que presentan contenidos de GG de 0,2 y 2 g/100g. Otros ingredientes que también aportarían contenidos de GG serían suero lácteo (64-85 mg/100 g), β -suero (314-420 mg/100 g) o ingrediente a base de lípidos polares (1544-1657 mg/100 g)¹³. Destacar que el PL-7 tiene contenidos equiparables a estos, sin encontrar relación alguna con sus ingredientes.

Al igual que en nuestro estudio, los mayores contenidos de GG en los PL indicados en literatura corresponden a aquellos que llevan adicionado MFGM, en forma de concentrado de proteínas del suero enriquecido con MFGM (2,29 mg ASUL/L de PL)¹¹ o un derivado de la MFGM (de origen bovino) que también

contiene otros compuestos bioactivos como fosfolípidos y ácidos grasos (9 mg GG/100 g de PL)²³.

Solo el PL-6 se aproximaría al contenido de GG proporcionado por la LH (2,3 mg ASUL/L)¹¹ (Lacomba et al., 2011). Si bien, ninguno de los PL de este estudio alcanzaría los niveles de GG de la LH aportados por Iwamori et al.⁷ (3,12-7,23 mg ASUL/L). En general, el PL con mayor contenido de GG (PL-6) proporciona de 1,2 a 1,9 veces menos de GG que la LH madura (3,12-4,82 mg ASUL/L)⁷. Esta variabilidad respecto a los contenidos de GG en LH es debida a que la LH es un fluido muy heterogéneo, cuya composición es influenciada por el periodo de lactancia, dieta materna, situación geográfica y sexo del lactante, entre otros.

Estimación de ingestas

Independientemente del mes de lactancia, la ingesta media de GG oscila de 0,3 a 2,3 mg ASUL/día, observando ingestas significativamente mayores ($p < 0,05$) para los PL (5 y 6) que llevan adicionado MFGM (ver Figura 1a).

Si se considera los distintos periodos de lactancia, independientemente del PL (Figura 1b), se produce un incremento de la ingesta de GG estadísticamente significativo ($p < 0,05$) desde los 0,5 a los 2 meses (desde 0,58 a 0,83 mg ASUL/día), manteniéndose constante hasta el quinto mes (0,83 - 0,94 mg ASUL/día), a partir del cual se produce un descenso estadísticamente significativo hasta 0,82 mg ASUL/día.

Las menores ingestas de GG en los primeros días de vida (0,5 meses) están relacionadas con la pequeña capacidad del estómago del lactante, que determina que el volumen de PL ingerido sea menor. Por otro lado, la disminución de ingesta de GG a los 6 meses es complementada con la introducción de la alimentación complementaria.

En la Figura 2 se muestran las ingestas de GG a partir de PL con y sin adición de MFGM analizados en este estudio y se comparan con las obtenidas en un trabajo

previo de nuestro grupo de investigación para tres PL (agrupados con o sin MFGM)¹¹ y con las calculadas a partir de los contenidos de LH obtenidos en otro estudio⁶.

El PL-6, con adición de MFGM es el que mayores ingestas proporciona, superiores a Lacomba et al.¹¹, excepto en el cuarto y sexto mes (ver Figura 2). Estas diferencias se pueden atribuir no solo al mayor contenido de GG en el PL-6, sino a la estimación de un menor volumen de PL ingerido por el lactante en nuestro estudio, calculado a partir de volúmenes reales ingeridos por el lactante obtenidos de una revisión bibliográfica, respecto al recomendado por el fabricante en la etiqueta utilizado por Lacomba et al.¹¹

Se observa que las ingestas de GG proporcionadas por los PL (34,5-477 $\mu\text{g ASUL/kg/día}$) son inferiores a las calculadas para LH (359-795 $\mu\text{g ASUL/kg/día}$)⁶. La máxima diferencia entre las ingestas aportadas por los PL y la LH corresponde al segundo mes de lactancia y las mínimas en el sexto donde el PL-6 incluso las iguala (ver Figura 2). Se constata que solo las ingestas producidas por el PL-6 igualarían o superarían la de la LH calculada por Lacomba et al.¹¹ (293 $\mu\text{g ASUL/kg/día}$) a partir de un pool de LH (4-7 meses de lactancia). El resto de PL solo alcanzarían entre el 27 y 83% de las ingestas de GG proporcionadas por la LH. Porcentajes superiores a los indicados por Sanchez-Diaz et al.⁹ (10-30%). Dada la implicación de los GG en el desarrollo cerebral, crecimiento, sistema inmune y protección frente a enteropatógenos¹⁰, interesaría que estas diferencias entre PL y LH lleguen a ser mínimas.

Conclusiones

La adición del ingrediente proteínas del suero ricas en MFGM mejoraría los contenidos e ingestas de GG a partir de PL, reduciendo así las diferencias entre PL y LH en todo el periodo estudiado (de 0,5 a 6 meses), especialmente en el sexto mes de la lactancia. Por tanto, será necesario realizar más estudios para que los contenidos e ingestas de GG en los PL puedan alcanzar los de la LH. Para ello es necesario analizar el contenido de GG en ingredientes utilizados en la formulación de PL y/o evaluar la influencia de estos ingredientes en los PL.

Bibliografía

1. Wang B, McVeagh P, Petocz P, Brand-Miller J. Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants. *Am J Clin Nutr*, 2003; 78: 1024-1029.
2. Rueda R. The role of dietary gangliosides on immunity and the prevention of infection. *Br J Nutr*. 2007; 98: S68-S73.
3. Laegreid A, Otnaess ABK, Fuglesang J. Human and bovine milk: comparison of ganglioside composition and enterotoxin-inhibitory activity. *Pediatr. Res*. 1986; 20: 416-421.
4. Kolter, T. Ganglioside biochemistry. *ISRN biochem*. 2012; 2012, 1-36.
5. Lacomba, R, Salcedo, J, Alegría, A, Lagarda, MJ, Barberá, R, Matencio, E. Determination of sialic acid and gangliosides in biological samples and dairy products: a review. *J Pharm Biomed Anal*. 2010; 51: 346-357.
6. Takamizawa K, Iwamori M, Mutai M, Nagai Y. Selective changes in gangliosides of human milk during lactation: a molecular indication for the period of lactation. *Biochim Biophys Acta*. 1986; 879: 73-77.
7. Iwamori M, Takamizawa K, Momoeda M, Iwamori Y, Taketani Y. Gangliosides in human, cow and goat milk, and their abilities as to neutralization of cholera toxin and botulinum type A neurotoxin. *Glycoconj J*. 2008; 25: 675-683.
8. Neeser JR, Golliard M, Del Vedovo S. Quantitative determination of complex carbohydrates in bovine milk and in milk-based infant formulas. *J Dairy Sci*. 1991; 74: 2860-2871.
9. Sánchez-Díaz A, Ruano MJ, Lorente F, Hueso P. A critical analysis of total sialic acid and sialoglycoconjugate contents of bovine milk-based infant formulas. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 1997; 24: 405-410.
10. Pan XL, Izumi T. Variation of the ganglioside compositions of human milk, cow's milk and infant formulas. *Early Hum Dev*. 2000; 57: 25-31.
11. Lacomba R, Salcedo J, Alegría A, Barberá R, Hueso P, Matencio E, Lagarda MJ. Sialic acid (N-acetyl and N-glycolylneuraminic acid) and ganglioside in whey protein concentrates and infant formulae. *Int Dairy J*. 2011; 21: 887-895.
12. Sørensen LK. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric approach for the determination of gangliosides GD₃ and GM₃ in bovine milk and infant formulae. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006; 20: 3625-3633.

13. Fong B, Norris C, McJarrow P. Liquid chromatography–high-resolution electrostatic ion-trap mass spectrometric analysis of GD₃ ganglioside in dairy products. *Int Dairy J.* 2011; 21: 42-47.
14. Zhang J, Ren Y, Huang B, Tao B, Ransborg Pedersen M, Li D. Determination of disialoganglioside GD₃ and monosialoganglioside GM₃ in infant formulas and whey protein concentrates by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2012; 35: 937-946.
15. Lopez C, Cauty C, Guyomarc'h F. Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. *Dairy Sci Technol.* 2015; 95: 863-893.
16. Claumarchirant L, Cilla A, Matencio E, Sanchez-Siles LM, Castro-Gomez P, Fontecha J, et al. Addition of milk fat globule membrane as an ingredient of infant formulas for resembling the polar lipids of human milk. *Int Dairy J.* 2016; 61: 228-38.
17. Claumarchirant L, Matencio E, Sanchez-Siles LM, Alegría A, Lagarda MJ. Sterol composition in infant formulas and estimated intake. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63: 7245-7151.
18. Hernell O, Timby N, Domellöf M, Lönnerdal B. Clinical Benefits of Milk Fat Globule Membranes for Infants and Children. *J Pediatr.* 2016; 173: S60-S65.
19. Timby N, Domello E, Hernell O, Lo B. Neurodevelopment, nutrition, and growth until 12 mo of age in infants fed a low-energy, low-protein formula supplemented with bovine milk fat globule membranes: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2014; 99: 860-868.
20. Timby N, Hernell O, Vaarala O, Melin M, Lönnerdal B, Domellöf M. Infections in infants fed formula supplemented with bovine milk fat globule membranes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 60: 384-389.
21. Svennerholm L. Quantitive estimation of sialic acids: II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim Biophys Acta.* 1957; 24: 604-611.
22. Puente R, García-Pardo A, Rueda R, Gil A, Hueso P. Seasonal variations in the concentration of gangliosides and sialic acids in milk from different mammalian species. *Int Dairy J.* 1996; 6: 315-322.
23. Gurnida DA, Rowan AM, Idjradinata P, Muchtadi D, Sekarwana N. Association of complex lipids containing gangliosides with cognitive development of 6-month-old infants. *Early Hum Dev.* 2012; 88: 595-601.

24. WHO. (2006). Child growth standars. Weight-for-age. Charts of Z-scores of boys and girls. URL: http://www.who.int/childgrowth/standards/weight_for_age/en/ (13.11.2016)

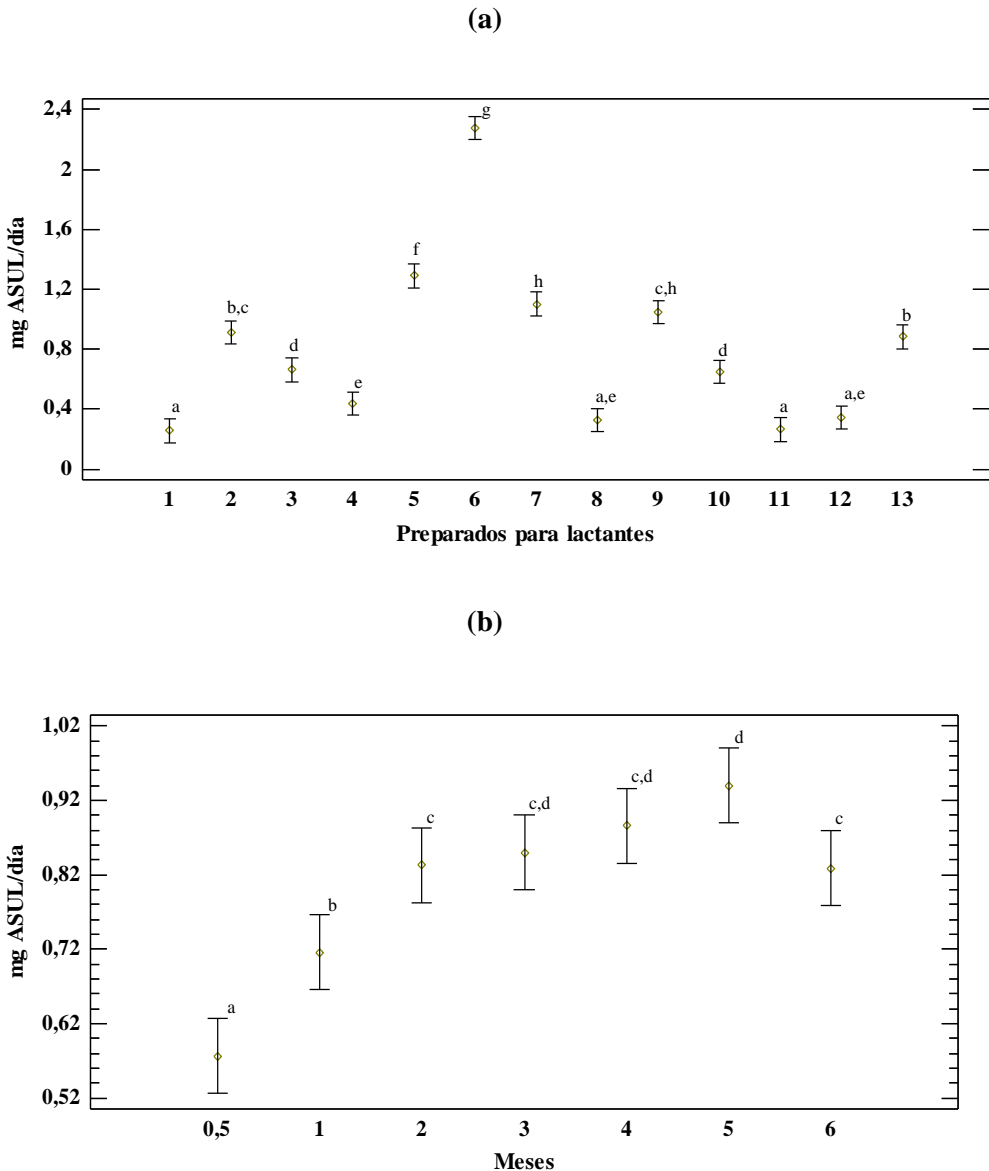
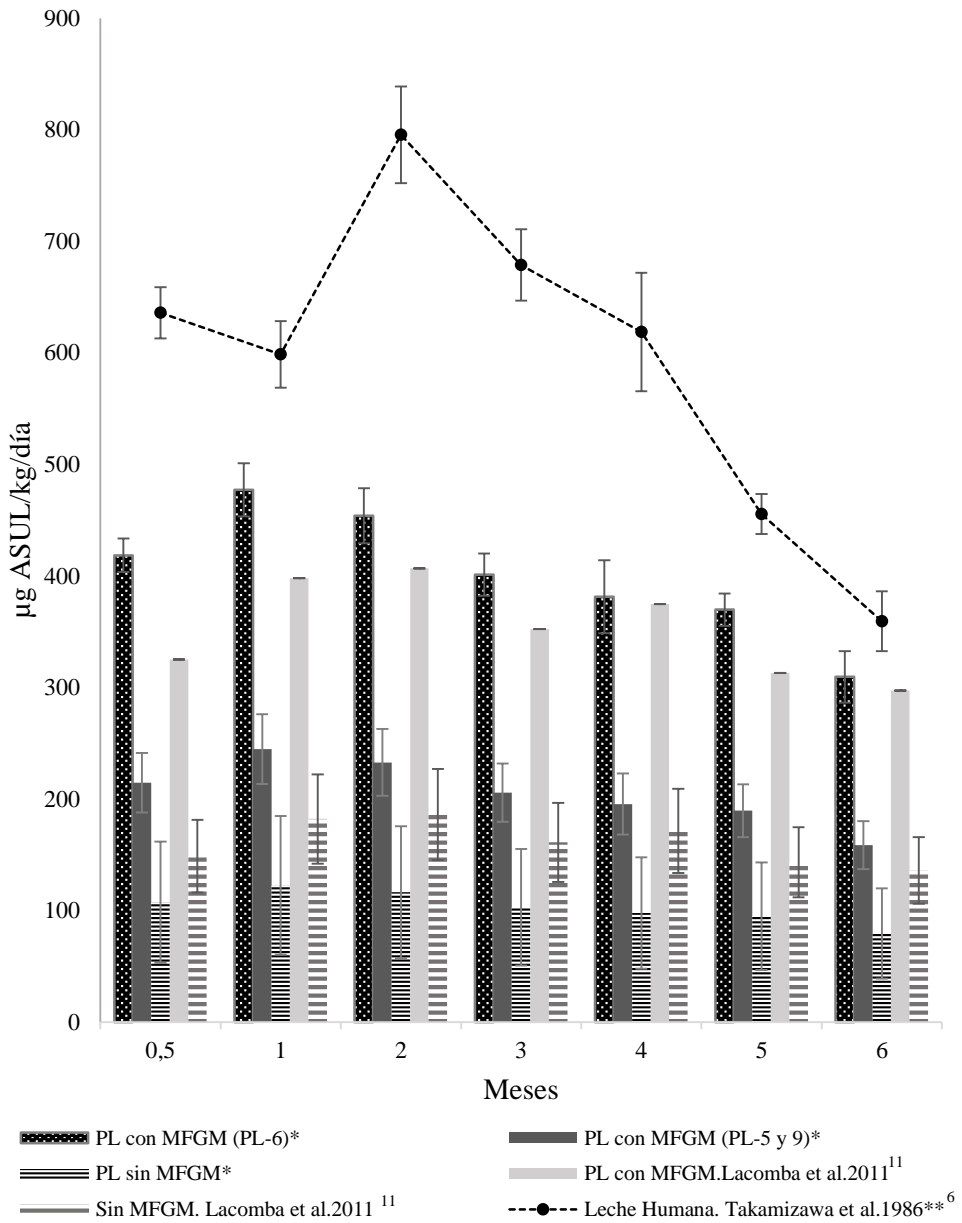


Figura 1. Ingesta media de gangliósidos totales. Diferente letra indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes preparados para lactantes (a) y entre los diferentes periodos de lactancia (b).



*Calculado utilizando el percentil 50 del peso corporal de recién nacidos niños y niñas (WHO, 2006)²⁴. **Ingestas de calculadas.

Figura 2. Ingesta media de gangliósidos totales en preparados para lactantes con o sin MFGM analizadas en este estudio, comparadas con las obtenidas por Lacomba et al.¹¹, y con las calculadas para leche humana a partir de datos de Takamizawa et al.⁶

Tabla 1. Ingredientes de los preparados para lactantes analizados y el factor de reconstitución.

PL	País	Ingredientes	FR (%p/v)	S:C
1	España	lactosa, lípidos lácteos, maltodextrina, leche desnatada, aceites vegetales (colza, girasol, girasol con oleico), proteínas del suero lácteo, aceite de pescado (DHA), aceite de <i>Mortierella Alpina</i> (ARA), emulsionantes (lecitina de soja), vitaminas, cloruro de colina, antioxidantes, taurina, fermentos lácteos.	13,5	68:32
2		suero lácteo desmineralizado, leche desnatada, aceites vegetales (palma, colza, coco, girasol y aceite de <i>Mortierella alpina</i>), lactosa, minerales, aceite de pescado, lecitina de soja, vitaminas, nucleótidos, proteínas de la leche, bifidobacterias.	12,9	70:30
3		leche desnatada, lactosa, aceites vegetales (palma, semilla de palma, colza, girasol, girasol alto oleico, de alga (ARA)), FOS, proteína del suero enriquecida con α -lactoalbumina, maltodextrina, sales minerales, emulsionante (lecitina de soja), aceite de pescado (fuente de DHA), vitaminas, nucleótidos, antioxidantes.	13,5	60:40
4		lactosa, aceites vegetales (palma, coco, colza, girasol alto oleico y de girasol), leche desnatada, proteínas del suero, GOS, maltodextrina, minerales, lecitinas, aceites de hongos y algas, vitaminas, nucleótidos.	12,9	60:40
5		lactosa, aceites vegetales (girasol, colza, palma, coco, aceite unicelular), leche desnatada, GOS, grasa láctea, proteína del suero enriquecida en MFGM , proteína del suero enriquecida en α -lactoalbumina, minerales, lecitina de soja, aceite de pescado, aceites de hongos, vitaminas, nucleótidos, cloruro de colina, inositol, carnitina.	13,0	62:38
6		lactosa, aceites vegetales (girasol, colza, palma, coco, aceite unicelular), leche desnatada, grasa láctea, proteína del suero enriquecida en MFGM , proteína del suero enriquecida en α -lactoalbumina, proteínas de la leche, vitaminas, aceite de pescado, aceites de hongos y algas, emulgente (lecitina de soja), minerales, cloruro de colina, taurina.	11,4	71:29

Tabla 1. (Continuación)

PL	País	Ingredientes	FR (%p/v)	S:C
7	Suecia	suero lácteo, lactosa, leche desnatada, aceite vegetal (palma, canola, coco, girasol), proteínas de la leche en polvo, maltodextrina, aceite de pescado, emulsionante, aceite de <i>Mortierella Alpina</i> , lecitina de soja, sales minerales, vitaminas, cultivos de bifidobacterias.	12,9	70:30
8		leche desnatada orgánica, suero orgánico desmineralizado en polvo, aceites orgánicos vegetales (palma, colza, girasol), GOS, lactosa, aceites poliinsaturados (pescado y vegetales), minerales, emulgente, vitaminas, estabilizador (ácido láctico).	13,0	70:30
9		lactosa, aceites vegetales (girasol, de colza, de palma, de coco, aceite unicelular), leche desnatada, GOS, grasa lactea, proteína del suero enriquecida en MFGM , proteína del suero enriquecida en α -lactoalbumin, minerales, lecitina de soja, aceite de pescado y hongos, vitaminas, taurina, nucleótidos, cloruro de colina, inositol, carnitina.	13,0	62:38
10	República Checa	suero desmineralizado en polvo, aceites vegetales, suero lácteo en polvo, lactosa, leche desnatada en polvo, GOS, minerales, vitaminas, colina, emulgente (lecitina).	12,9	66:34
11		suero desmineralizado, aceites vegetales (palma, colza, girasol, coco, microbiológicos (ARA)), lactosa, leche, FOS, GOS, minerales, vitaminas, lecitina de soja, aceites de pescado.	13,5	60:40
12		suero desmineralizado (de leche), aceite vegetal, lactosa, leche desnatada, GOS, proteína del suero concentrado (de leche), FOS, aceite de pescado, minerales, vitaminas, nucleótidos, lecitina de soja.	13,5	60:40
13		suero hidrolizado, aceites vegetales (palma, colza, coco, girasol, aceites de fuentes microbianas (ARA)), lactosa, leche desnatada en polvo, GOS, FOS, suero lácteo concentrado, minerales, vitaminas, lecitina de soja.	13,8	50:50

ARA: ácido araquidónico, DHA: ácido docosahexaenoico, FOS: fructooligosacaridos, FR: Factor de reconstitución, GOS: galactooligosacaridos, S:C: ratio seroproteína:caseína

Tabla 2. Contenido de grasa y gangliósidos totales en los preparados para lactantes (PL) analizados.

PL	Grasa (% p/p)	mg ASUL/100g	mg ASUL/L*	mg GG/100g**	mg GG/L**
1	22,2 ± 2,1	0,22 ± 0,07 ^a	0,30 ± 0,09	0,57 ± 0,17	0,77 ± 0,23
2	25,5 ± 1,0	0,84 ± 0,22 ^{b,c}	1,08 ± 0,28	2,13 ± 0,55	2,75 ± 0,71
3	23,7 ± 0,3	0,58 ± 0,03 ^{b,d}	0,78 ± 0,04	1,48 ± 0,07	2,00 ± 0,09
4	25,3 ± 0,8	0,40 ± 0,03 ^{a,d,e}	0,52 ± 0,04	1,02 ± 0,08	1,32 ± 0,10
5	27,2 ± 0,6	1,17 ± 0,12 ^f	1,52 ± 0,15	2,99 ± 0,30	3,88 ± 0,39
6	34,8 ± 0,7	2,36 ± 0,12 ^g	2,69 ± 0,13	6,01 ± 0,30	6,86 ± 0,34
7	25,8 ± 0,1	1,01 ± 0,09 ^{c,f}	1,30 ± 0,13	2,57 ± 0,25	3,32 ± 0,33
8	23,2 ± 0,6	0,30 ± 0,03 ^{a,e}	0,39 ± 0,04	0,76 ± 0,08	0,99 ± 0,11
9	27,7 ± 2,2	0,95 ± 0,20 ^{c,f}	1,23 ± 0,26	2,42 ± 0,52	3,15 ± 0,67
10	22,4 ± 2,0	0,59 ± 0,00 ^{b,d,e}	0,77 ± 0,00	1,52 ± 0,00	1,95 ± 0,00
11	22,3 ± 2,6	0,23 ± 0,04 ^a	0,31 ± 0,05	0,59 ± 0,10	0,80 ± 0,13
12	24,3 ± 0,4	0,30 ± 0,01 ^{a,e}	0,41 ± 0,02	0,77 ± 0,04	1,04 ± 0,05
13	21,4 ± 0,5	0,75 ± 0,07 ^{b,c}	1,04 ± 0,12	1,93 ± 0,22	2,66 ± 0,31
Datos literatura			0,50-6,20 ^{3,8-11}	3,47-18,88 ^{13,14}	4,96-11,42 ¹²

Resultados expresados como media ± desviación estándar de 4 réplicas procedentes de un mismo lote. Diferente letra en la misma columna indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los diferentes preparados para lactantes. Tukey's HSD test.

*Calculado utilizando el factor de reconstitución de cada preparado. **Convertidos a mg de GG utilizando el peso molecular del Sia (309 g/mol) y del GG mayoritario de los preparados para lactantes: GD₃ (1577 g/mol).

Abreviaturas

ASUL: ácido siálico unido a lípidos

FR: factor de reconstitución

GG: gangliósidos

HPLC-LTQ-MS: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas con trampa iónica

LC/ESI-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización mediante electrospray

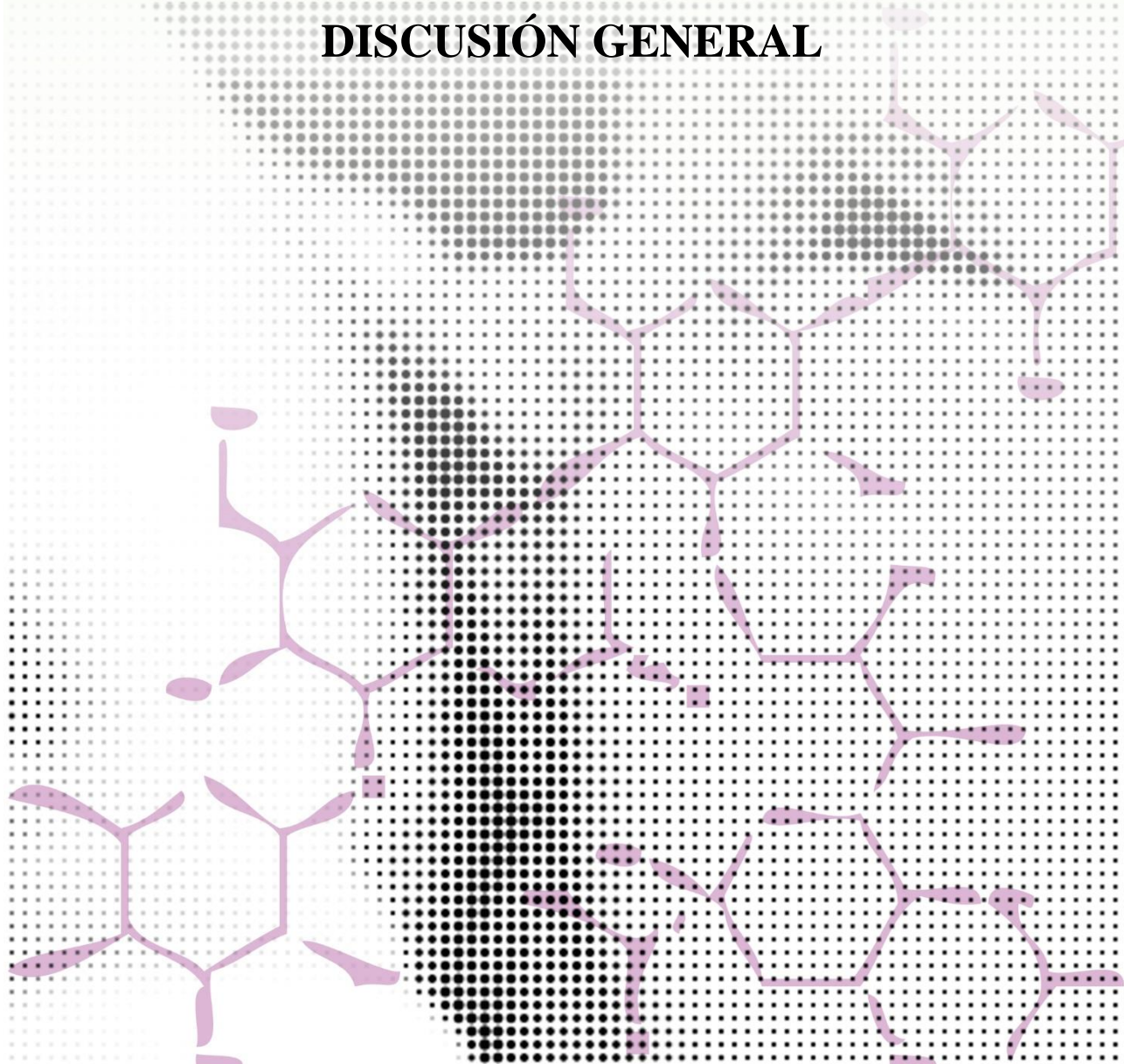
LH: leche humana

MFGM: membrana del glóbulo graso de la leche

PL: preparados para lactantes

UPLC-ESI-MS/MS: cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrometría de masas con ionización mediante electrospray

DISCUSIÓN GENERAL



1.-Composición en compuestos bioactivos de ingredientes de posible utilización en la elaboración de PL

La mayoría de PL son productos sólidos obtenidos a partir de leche de vaca modificada, a la que se le adicionan diferentes ingredientes con el objetivo de conseguir preparados con un perfil de carbohidratos, proteínas y lípidos lo más parecido posible a la LH y de acuerdo al RD 165/2014. Para asemejar el contenido en hidratos de carbono es necesaria la adición de lactosa y oligosacáridos (algunos de ellos con Sia). También se precisa adicionar concentrado de suero proteico para asemejar la relación suero:caseína (ingrediente rico en Sia y que, ocasionalmente, puede estar enriquecido en MFGM). Normalmente, se añaden distintas proporciones y tipos de aceites vegetales, de hongos y pescado (RD 165/2014). Sin embargo, en la formulación actual se observa la adición de grasa láctea (natas) a la mezcla de aceites indicada anteriormente, proporcionando gran variedad de especies lipídicas (colesterol, fosfolípidos), no presentes en aceites vegetales (Delplanque & Baudry, 2015).

Dada la escasa información disponible sobre contenidos de compuestos bioactivos en ingredientes lipídicos utilizados en la elaboración de PL, se analizan siete ingredientes (mazada, dos tipos de MFGM, concentrado de LP, dos tipos de nata y β -suero) de los que se desconoce el porcentaje en el que intervienen en los preparados estudiados. Debido a razones de confidencialidad no se ha podido incluir información sobre el contenido de compuestos bioactivos analizados y su influencia en las correspondientes publicaciones relativas a composición de los PL.

El contenido de grasa en los ingredientes oscila de 7,95-96,15 mg/100 g, siendo la nata la que mayores contenidos proporciona (nata-2 \approx nata-1 > concentrado de LP > MFGM-2 \approx MFGM-1 \approx β -suero > mazada). La grasa de la nata está compuesta mayoritariamente de TAG (98,2%), con un perfil lipídico de mayor a menor abundancia característico en todos los ingredientes: TAG > LP > DAG > AG libres + colesterol > esteres de colesterol > MAG, con excepción del β -suero que presenta mayores contenidos para los LP (57,5%).

En general, las natas y la mazada son los ingredientes con menor contenido de compuestos bioactivos estudiados, con excepción del colesterol, el cual presenta contenidos altos en natas (122,5-133,2 mg/100 g).

La MFGM es el ingrediente que mayores contenidos (mg/100g) de colesterol (263,6-288,8), Sia total (1749,5-1845,1) y GG (31,6-56,8, expresados como ASUL) aporta, con cantidades también altas de LP totales (4804,8-4468,2 mg/100 g) por detrás del concentrado de LP (12344,2) y el β -suero (8887,1). Su contenido en EV es muy bajo y no difiere del resto de ingredientes. Se ha indicado que fracciones de la MFGM obtenidas de la mazada o del β -suero tienen efecto anti-viral frente a rotavirus extraños (Ochonicky *et al.*, 2005); mientras que LP son esenciales para el crecimiento y desarrollo cerebral (Wang *et al.*, 2000). Por tanto, una posible adición a los PL podría proporcionar este efecto y asemejaría más estos PL a la LH.

Son escasos los trabajos que determinan los compuestos bioactivos estudiados en los ingredientes analizados en esta tesis. Al igual que en nuestro estudio, los ingredientes que mayor contenido de colesterol presentan (mg/100g) son la nata (51,8) > β -suero (31) > mazada (14) (Elling *et al.*, 1996). Por otra parte, y en concordancia con nuestro estudio, la nata y la mazada son los que menores contenidos de GG (concentrado de LP > β -suero > mazada) (Fong *et al.*, 2011) y LP (β -suero > nata \geq mazada) presentan. Los contenidos de LP en nata respecto a la mazada son controvertidos. En unos casos los contenidos de LP mayores se atribuyen a natas (Avalli & Contarini, 2005; Rombaut *et al.*, 2005; Gassi *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010), en otros a las mazadas (Elling *et al.*, 1996) o incluso similares (Rombaut *et al.*, 2006; Britten *et al.*, 2008). Esta variabilidad queda explícita en la revisión de Rombaut & Dewettinck (2006) donde se muestran diferentes contenidos de LP en productos lácteos (mg/100 g): β -suero (660-1629) > nata (115-243) \approx mazada (10,61-384). Además, se han descrito en relación a estos dos ingredientes (nata y mazada) mayores contenidos de LP en concentrados de LP (82-1244 vs. 31010 mg/100 g) (Gassi *et al.*, 2008; Gassi *et al.*, 2016) y MFGM (760-920 vs. 4430-4750 mg/100 g) (Morin *et al.*, 2007a).

Todos los ingredientes analizados presentan un perfil de LP similar, siendo los mayoritarios la PE (31-50%) y SM (23-36%), seguidos de PC (9-17%) > PS (3-15%) > PI (3-15%). Este perfil puede diferir de lo observado en literatura, donde algunos autores indican que la SM y PC son los LP mayoritarios para algunos de estos ingredientes (concentrados de LP, natas y mazadas) (Costa *et al.*, 2010; Gallier *et al.*, 2010; Gassi *et al.*, 2016). Esta variabilidad, en la mayoría de las ocasiones, puede ser debida al método de elaboración utilizado y su procedencia (Avalli & Contarini, 2005; Morin *et al.*, 2007a). Esto es debido a la localización de los LP en la monocapa o bicapa de la MFGM, así como su agrupación en los dominios lipídicos. La fase I_d (PE, PC, PI y PS) es influenciada por las altas temperaturas, mientras que la fase I_o (SM) queda mayormente afectada por las bajas temperaturas (Yao *et al.*, 2016b).

Los únicos datos disponibles sobre contenidos de Sia en ingredientes son los correspondientes al MFGM-10 patentado y comercializado por Lacprodan[®] (~2000 mg/100 g), cuyos contenidos son del orden de los obtenidos en este estudio (1749,54-1845,05 mg/100 g) y MFGM cruda, únicamente aislada del glóbulo de grasa de la leche (0,892 mg/100 g de peso seco) (Sánchez-Juanes *et al.*, 2009b), producto no comparable a los estudiados en este trabajo.

En relación a EV solo un estudio evalúa su contenido en MFGM, sometido o no a ultrafiltración (Fauquant *et al.*, 2007). Los contenidos no son comparables (son expresados en g EV/100 g esteroides + LP) y destaca que identifican y cuantifican estigmasterol y β -sitosterol, a diferencia de nuestro estudio en el que solo se cuantifican campesterol y β -sitosterol, y no se detecta estigmasterol.

2.- Validación de un método cromatográfico para esteroides

Para la cuantificación de esteroides en PL se valida un método basado en el proceso de extracción (Alemany-Costa *et al.*, 2012) y determinación por CG-FID (García-Llatas *et al.*, 2012) utilizados previamente por el grupo de investigación para determinar esteroides en otro tipo de matrices (zumo-leche y suero, respectivamente). Se ha realizado una validación completa siguiendo los criterios de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, 2005) que incluye los parámetros analíticos de linealidad, LOD y LOQ, selectividad, precisión y exactitud, mediante ensayos de recuperación.

El método por CG-FID permite determinar colesterol, desmosterol (precursor del colesterol) y EV (estigmasterol, campesterol, brasicasterol, β -sitosterol y sitostanol) en este tipo de alimentos infantiles, confirmando su identificación previamente por CG-MS. Es el primer método validado para EV en PL, si bien se ha validado la determinación de colesterol en PL utilizando HPLC-UV (Ahn *et al.*, 2012) y CG-FID (Jeong *et al.*, 2012).

El método cromatográfico presenta buena linealidad para todos los esteroides ($r > 0,99$), siendo el método más sensible para brasicasterol y colesterol y menos sensible para sitostanol. Dado que algunos PL contienen MFGM en su composición, se ha comprobado la linealidad para el colesterol en un intervalo de magnitud más amplio (198-3168 mg/L ensayo), mayor que los indicados por Ahn *et al.* (2012) (10-200 mg/L) y Jeong *et al.* (2012) (5-200 mg/L) para colesterol en PL.

Los LOD (0,14-0,99 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$) y LOQ (0,45-3,3 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$) obtenidos son adecuados, siendo menores para el brasicasterol y mayores para el colesterol. Los valores de LOD (0,076 mg/Kg) y LOQ (0,253 mg/Kg) para el colesterol obtenidos en este estudio son de 30 a 44 veces menores que los indicados por Ahn *et al.* (2012) y Jeong *et al.* (2012), respectivamente.

La precisión intradía oscila entre 1,6% y 8,8%, valores del orden de los indicados por la AOAC (2012) para las concentraciones presentes en los PL (< 8%

para colesterol, desmosterol, campesterol, estigmasterol y β -sitosterol, a una concentración de 100 mg/L de analito presente en el ensayo y < 12% para brasicasterol y sitostanol, a una concentración de 10 mg/L de analito presente en el ensayo). Además, para colesterol los valores intradía son similares a los obtenidos por Ahn *et al.* (2012) y Jeong *et al.* (2012) (3,2-12,2 y 2,6-8,9, respectivamente). La precisión interdía es menor del 10% para todos los esteroides, con excepción del sitostanol (20,4%).

Los porcentajes de recuperación (93-108%) están dentro del rango indicado por la AOAC (2012) (85-110% para colesterol, desmosterol, campesterol, estigmasterol y β -sitosterol, a una concentración de 100 mg/L de analito presente en el ensayo y 80-115% para brasicasterol y sitostanol, a una concentración de 10 mg/L de analito presente en el ensayo), con excepción del campesterol que estaría en el límite inferior. En relación al colesterol, los valores de recuperación ($98,83 \pm 2,93\%$) son del orden de lo observado por otros autores en PL (99,5-99,6%) (Ahn *et al.*, 2012; Jeong *et al.*, 2012).

Se trata de un método cromatográfico que no solo determina esteroides cuantificados en estudios previos mediante técnicas cromatográficas (Huisman *et al.*, 1996; Maduko & Park, 2007), sino que permite determinar también otros esteroides no identificados previamente (desmosterol, brasicasterol y sitostanol).

3.-Influencia del periodo de lactancia y zona geográfica en la composición en lípidos polares y ácido siálico de leche humana

La LH presenta una composición muy variable a lo largo de la lactancia, presentando tres tipos de secreción láctea (calostro, LH de transición y LH madura) que están en continuo cambio y que puede variar en función de la mujer o incluso en la misma mujer entre ambos pechos, a lo largo del día e incluso en una misma toma (Pita *et al.*, 1985; Smit *et al.*, 2002), siendo los lípidos y todos aquellos compuestos asociados a ellos los que más varían. De ahí, la importancia de determinar los contenidos de LP (fosfolípidos y esfingolípidos) y Sia en LH de diferentes periodos de lactancia (de 0 a 12 meses); así como, su perfil lipídico, como referencia para la elaboración de PL. Otros factores que también pueden influir en la composición de la LH son: genéticos, situación geográfica, tradiciones culturales, clima, alimentación y estatus socioeconómico. Por todo ello, además de estudiar los diferentes periodos de lactancia, se estudia las diferencias entre dos zonas geográficas de España (centro –Madrid- y litoral –Valencia y Murcia-), dado los pocos estudios realizados en el sur de Europa.

En el Anexo III se recoge el protocolo de recogida de la LH (periodos, tipo de extracción, criterios de inclusión y exclusión), la aprobación del Comité de Ética, la hoja de información al paciente y la declaración de consentimiento informado. En el Anexo IV se detalla el número de mujeres y el volumen de LH utilizado en la elaboración de las muestras de LH analizadas.

El perfil lipídico muestra que los TAG son los más abundantes en todos los periodos de lactancia, seguidos de DAG > LP > AG libres + colesterol > MAG > esteroides de colesterol, con excepción del calostro que presenta mayores contenidos de LP que de DAG. Se observa que el contenido de TAG (~95%) es significativamente mayor en el calostro ($p < 0,05$) que en las etapas posteriores de la lactancia (0,5-12 meses) (92-95%), presentando la LH procedente de 9 a 12 meses los menores contenidos, debido al incremento de DAG respecto a la LH de otros periodos. Los

LP disminuyen con la lactancia, representando en LH madura alrededor del 1% del total de la grasa, en concordancia a lo indicado por García *et al.* (2012).

Los contenidos (mg/100 mL) de LP totales y Sia disminuyen estadísticamente con el periodo de lactancia ($p < 0,05$): calostro (Neu5Ac: 101,56-136,14) > LH de transición (Neu5Ac: 89,38-92,32) > 1 mes (LP totales: 39,18-42,18; Neu5Ac: 51,02-61,03) > 3 meses (LP totales: 32,15-35,90; Neu5Ac: 26,58-3,71) > 6 meses (LP totales: 26,56-33,41; Neu5Ac: 24,47-30,16) > 9 meses (LP totales: 26,00; Neu5Ac: 28,50) \leq 12 meses (LP totales: 29,00; Neu5Ac: 28,07). Señalar que los LP totales a diferencia del Neu5Ac presentan contenidos mayores en transición (LP totales: 43,70-53,53) que en calostro (LP totales: 31,49-37,21). El calostro y/o LH de transición aporta LP y Neu5Ac en cantidad necesaria para la formación de tejidos, de interés por la dificultad que tiene el lactante para sintetizar estos compuestos (Carlson, 1985). En el último periodo intrauterino y los primeros 12 meses de vida, el cerebro necesita grandes cantidades de GG, los cuales contienen en su composición Sia (Wang, 2009). Además, se requieren cantidades importantes de colina para el crecimiento y desarrollo cerebral, compuesto que puede ser aportado por la PC y la SM (Dewettinck *et al.*, 2008). Además, estos LP son fuente de AG (linoleico, α -linolénico, ARA y DHA) necesarios para la síntesis de la membrana neuronal del lactante (Bitman *et al.*, 1984).

Los intervalos de contenidos para LP totales y Sia oscilan de: 26,00 - 53,53 mg de LP/100 mL y 26,58 - 136,14 mg Neu5Ac/100 mL, y son del orden de lo indicado en literatura para LP totales (15,0-24,2 mg/100 mL) (Harzer *et al.*, 1983; Garcia *et al.*, 2012; Giuffrida *et al.*, 2013) y Sia (9-156 mg/100 mL) (Neeser *et al.*, 1991; Sabharwal *et al.*, 1991; Heine *et al.*, 1993; Brand-Miller *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2001; Martín-Sosa *et al.*, 2004a; Spichtig *et al.*, 2010; Lacomba *et al.*, 2011a; Salcedo *et al.*, 2013; Li & Fan, 2014) en todo el periodo de lactancia, y mayores que los proporcionado por algunos autores para LP totales (15-24,2 mg/100 mL) (Bitman *et al.*, 1984; Sala-Vila *et al.*, 2005; Lopez & Ménard, 2011; Zou *et al.*, 2012; Russo *et al.*, 2013; Thakkar *et al.*, 2013). El alto contenido de LP obtenido en nuestro

trabajo respecto al contenido de LP en LH procedente del sur de España (Sala-Vila *et al.*, 2005) puede ser debido al momento de toma, la cual se realiza al inicio (mientras que en nuestro estudio se desconoce) y es conocido que los lípidos al inicio de la toma son menores que al final de la misma.

Se observa que los contenidos de LP totales disminuyen de 1,2 a 1,4 veces desde LH de transición a LH madura, mientras que el Neu5Ac disminuyen 3 veces desde calostro hasta llegar a LH madura. Los diferentes LP estudiados (PE, PI, PS, PC y SM) presentan el mismo comportamiento durante la lactancia que los LP totales, siendo el mayoritario la SM (7,96-16,49 mg/100 mL) > PE (6,49-15,90 mg/100 mL) > PC (3,63-8,09 mg/100 mL) > PS (3,25-6,74 mg/100 mL) > PI (3,07-6,32 mg/100 mL). Esta disminución de LP con el tiempo puede estar asociada directamente con el contenido de grasa (g/100 mL), la cual con el transcurso de la lactancia disminuye de $4,07 \pm 0,87$ (transición) a $2,36 \pm 0,04$ (LH madura), siendo menor en calostro ($2,32 \pm 0,06$ g/100 mL). Este menor contenido graso en el calostro explica que los contenidos de LP en este periodo sean menores, al igual que en estudios previos (Sala-Vila *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2012). Otro factor que podría afectar al contenido de LP sería su menor biosíntesis en la glándula mamaria durante el transcurso de la lactancia (Sala-Vila *et al.*, 2005). Además, existe una relación inversa de los LP con el tamaño del glóbulo graso en los diferentes periodos (LH transición < LH madura < calostro) (Lopez *et al.*, 2011), el cual debido a factores genéticos y hábitos alimentarios puede variar y aumentar (Bitman *et al.*, 1983) o disminuir (Zou *et al.*, 2012) con el transcurso de la lactancia. Esta menor biosíntesis puede estar relacionado con el menor espesor de la MFGM y, por consiguiente, una disminución de todos los compuestos asociados a esta membrana, entre ellos los LP, el Sia que forma parte de los GG (Bourlieu *et al.*, 2015a) y las glicoproteínas de dicha membrana. En el caso del Sia, otro factor que influye es la mayor cantidad de oligosacáridos y proteínas que contiene el calostro respecto a la LH madura. Es conocido que este compuesto bioactivo se encuentra unido a ellos en su mayoría, representando aproximadamente el 97% (Carlson, 1985; Wang *et al.*, 2001).

El perfil de LP determinado en los diferentes periodos de lactancia es similar al indicado por algunos autores (Wang *et al.*, 2000; Benoit *et al.*, 2010; Giuffrida *et al.*, 2013; Thakkar *et al.*, 2013), y discrepa con otros que indican que los LP mayoritarios son SM y PC (Harzer *et al.*, 1983; Bitman *et al.*, 1984; Sala-Vila *et al.*, 2005; Shoji *et al.*, 2006; Lopez & Ménard, 2011; Garcia *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2012). La suma de SM y PC oscila entre 39,5 % (Zou *et al.*, 2012) y > 57% (Harzer *et al.*, 1983; Bitman *et al.*, 1984), intervalo que engloba el obtenido en este trabajo (SM + PC: 43-50%). El alto porcentaje de PE respecto a otros estudios, puede ser debido a que incluye la liso-PE (Van Beusekom *et al.*, 1990).

Se han obtenido modelos matemáticos predictivos que relacionan los contenidos de estos compuestos con el periodo de lactancia y explican en un 80% la disminución del contenido de LP totales de LH de transición a 6 meses y en un 79% la disminución de Sia de calostro a 6 meses. El modelo matemático de Sia obtenido es similar a los propuestos hace más de dos décadas por Carlson (1985) y Brand-Miller *et al.* (1994) para Sia unido a oligosacáridos y Sia total en los primeros 3 meses, respectivamente. En los primeros 15 días de nuestro estudio este descenso de Sia es más pronunciado (23 vs. 12%) que el obtenido por Carlson (1985), mientras que en los 3 primeros meses (72%) es similar al obtenido por Brand-Miller *et al.* (1994) y ligeramente inferior al de Wang *et al.* (2001) (80%).

Atendiendo a la zona geográfica se observa que la zona centro de España (Madrid) presenta contenidos significativamente menores de LP y Sia ($p < 0,05$) que la zona del litoral (Valencia/Murcia). Estas diferencias son mínimas, tanto para los LP totales ($< 10\%$) como para el Sia ($< 16\%$), no teniendo relevancia nutricional para el lactante. Sin embargo, solamente los LP minoritarios (PC, PI, PS) muestran un contenido significativamente menor ($p < 0,05$) en zona centro respecto al litoral, diferencias que podrían ser debidas a las pequeñas variaciones en la alimentación de las donantes. Es conocido que la leche de mamíferos, huevos y queso son buena fuentes de Sia. Además, altos contenidos de vitamina A en la dieta de la madre (hígado, aceite de pescado, leche y derivados) puede incrementar la síntesis de Sia

(Qiao *et al.*, 2013). Destacar que la similitud de los contenidos de SM en ambas zonas es beneficioso, ya que, junto con la PC, aportan colina, esencial para los lactantes en el inicio de la vida (Zou *et al.*, 2012).

Los LP y Sia presentan interacciones (zona, estado de lactancia). La disminución en los contenidos de LP totales, SM y PE, en los 3 primeros meses, es más pronunciada en la zona litoral, estabilizándose posteriormente hasta los 6 meses, mientras que en la zona centro de 3 a 6 meses disminuye. En cambio, los contenidos de PC, PI y PS disminuyen durante los 3 primeros meses, en la zona litoral, mientras que en la zona centro los contenidos son constantes, disminuyendo posteriormente hasta los 6 meses. En los contenidos de Sia, se observa una menor disminución en la zona centro respecto al litoral (11,9 vs. 32,12%) durante los primeros 15 días, comportándose posteriormente de manera similar.

4.- Composición de compuestos bioactivos en preparados para lactantes

En el anexo V se muestran los ingredientes (A) y la composición (B) declarada por el fabricante en la etiqueta de los PL analizados.

4.1.-Comparación con la legislación

La Directiva 2013/46/UE traspuesta en el RD 165/2014 y el Reglamento Delegado 2016/127 establece el contenido máximo de fosfolípidos (2 g/L) e intervalos para la colina (7-50 mg/100 kcal o 25-50 mg/100 kcal, respectivamente) que deben contener los PL (ver Anexo I). Se observa que los contenidos de LP en los 13 PL estudiados (0,25-0,58 g/L) están de acuerdo con lo indicado en la legislación. Los contenidos de colina en los PL estudiados (10,93-22,47 mg/100 mL o 15,6-37,45 mg/100 kcal) son inferiores, ya que corresponden a los aportados por PC y SM, sin tener en cuenta otras fuentes como colina libre, fosfocolina y glicerofosfocolina (Holmes-McNary *et al.*, 1996; Holmes *et al.*, 2000; Ilcol *et al.*, 2005).

4.2.-Influencia de la adición de MFGM

Se analizan diferentes PL comercializados en Europa destinados a los lactantes de 0 a 6 meses. Los TAG son los más abundantes (96,8±0,01-98,2±0,2%) seguidos, generalmente, de LP totales (0,9±0,1-1,9±0,1%) > DAG (0,8-2%) > ésteres de colesterol (0,05-0,1%) > AG libres + colesterol (0,01-0,04%) > MAG (0,005-0,01%). Las diferencias en los TAG en los PL son mínimas y pueden ser atribuidas al tipo de ingrediente utilizado en su elaboración, principalmente en relación a su fracción lipídica (aceites vegetales o adicionados de grasa láctea o de grasa láctea y MFGM).

Los PL con MFGM en su formulación (PL-5, PL-6 y PL-9) presentan los mayores contenidos de grasa (27,2-34,8 g/100 mL), de colesterol (3,95-5,10 mg/100 mL), LP totales (54,79-58,07 mg/100 mL) y GG (1,23-2,69 mg ASUL/L), no influyendo la adición de este ingrediente en los contenidos de Sia total, Neu5Ac y Neu5Gc. Esto es debido a que se trata de compuestos bioactivos (colesterol, fosfolípidos, esfingolípidos y GG) asociados básicamente a la estructura de la

MFGM (Dewettinck *et al.*, 2008; Lopez, 2011). Sin embargo, el Sia unido a GG representa < 3% del Sia total y las proteínas de la MFGM (incluyendo glicoproteínas como la MUC y otras) representan solo entre el 1-2% de proteínas totales de la leche (Lopez, 2011). Por tanto, es escasa la cantidad de Sia presente en la MFGM.

La adición de MFGM no modifica el perfil de LP (PE > SM > PC > PS > PI). Sin embargo, sus contenidos (mg/100 mL) (PE: 20,74-26,23; SM: 12,50-13,73; PC: 8,49-8,74; PS: 5,20-5,94; PI: 5,36-5,64) son significativamente mayores a los PL sin MFGM.

Las diferencias en los contenidos de compuestos bioactivos pueden ser debidas al tipo y cantidad de MFGM utilizada en la elaboración (información no aportada por el fabricante). Además, la MFGM presenta un contenido en LP, colesterol y GG variable debido al aislamiento y fabricación de la misma, ya que parte de la MFGM o de los GG, que contiene ésta, pueden migrar a otras fracciones intermedias (natas, mazada, β -suero, etc) que se puedan formar durante la elaboración de este ingrediente, y que también pueden ser utilizadas en la formulación de estos preparados (Neeser *et al.*, 1991; Ross *et al.*, 2015).

Son escasos los datos bibliográficos sobre contenidos de compuestos bioactivos en preparados con MFGM. Los autores también indican mayores contenidos de colesterol (8 mg/100 mL) (Timby *et al.*, 2014); LP totales (235 mg /100g) (Gurnida *et al.*, 2012), (70 mg/100 mL) (Timby *et al.*, 2014) y GG (2,29 mg ASUL/L) (Lacomba *et al.*, 2011a), (9 mg GG/100 g) (Gurnida *et al.*, 2012) en aquellos PL formulados con MFGM. Se ha indicado que el incremento de GG en PL al incorporar MFGM es de 2-3 mg GG/100 g, mostrando también un aumento los fosfolípidos y ARA; mientras que el resto de compuestos del PL muestra contenidos similares, como es el caso del Sia (Gurnida *et al.*, 2012).

Los contenidos de Sia total en PL con MFGM (15,2 a 21,2 mg/100 mL) son intermedios respecto a todos los PL analizados y similares a los indicados por Lacomba *et al.* (2011a) (18,55 \pm 0,85 mg Sia/100 mL). Respecto a las formas de Sia

determinadas en PL con MFGM, destacar que además de Neu5Ac (15,1-20,5 mg/100 mL) también se determina Neu5Gc (0,14-0,69 mg/100 mL), compuesto de origen animal, que es aportado a los PL a través de la leche de vaca o de cabra, base de su formulación (Wang & Brand-Miller, 2003) y que no se detecta en LH, porque no puede ser sintetizado por el ser humano (Varki, 2008).

Los PL que no llevan adicionado MFGM en su formulación presentan los siguientes contenidos de colesterol (1,46-2,63 mg/100 mL), LP totales (25,11-37,93 mg/100 mL), Sia total (13,1-25,5 mg/100 mL) y GG (0,30-1,30 mg ASUL/L). Los contenidos (mg/100 mL) de los diferentes LP varían de: PE (6,24-15,09) > SM (6,01-9,90) > PC (4,56-6,54) > PS (3,79-4,90) > PI (3,72-5,03). El Neu5Ac representa el 95,4-97,7% del Sia total (12,6-25,1 mg Neu5Ac/100 mL).

En general, estos contenidos son del orden de lo observado en literatura (ver Tablas 9, 11, 13, 15). La adición de calostro a los PL proporciona contenidos de LP totales (607 mg/100 g) (Fong *et al.*, 2013) y Sia total (250 mg/100 g) (Spichtig *et al.*, 2010) superiores a los del presente estudio. Con las técnicas de determinación de GG por LC/ESI-MS/MS, UPLC-ESI-MS/MS y HPLC-LTQ-MS se consiguen mayores contenidos (5-11,4 mg GG/L) (Sørensen, 2006), (3,5-18,9 mg/100 g) (Fong *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). En relación a los compuestos que aportan colina al lactante, se observa que la PC es del orden de los encontrado en literatura, mientras que la SM es mayor que la obtenida por otros autores (Zeisel *et al.*, 1986, Holmes *et al.*, 2000; Ilcol *et al.*, 2005).

4.3.-Influencia de otros ingredientes

Existen distintos ingredientes (suero lácteo, grasa láctea, aceites vegetales, de pescado, hongos y algas) que también pueden influir en la composición de algunos compuestos bioactivos, como se comenta a continuación.

Se ha indicado que una relación alta de seroproteínas:caseína (100:0) proporciona mayores contenidos de Sia (Neeser *et al.*, 1991). El ingrediente de seroproteínas incrementa el contenido de Sia, ya que está compuesto de proteínas (β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, principalmente) y una buena fuente de Sia como es

el glicomacropéptido de caseína (Rojas *et al.*, 2009; Bonnaillie *et al.* 2014). Sin embargo, en este trabajo no se ha podido evidenciar la relación directa entre contenido de seroproteína y Sia. El PL-13 presenta los mayores contenido de Sia, pero su relación seroproteínas:caseína (50:50) es similar o incluso inferior a la de los otros PL analizados. El aporte de Sia (11,4-27 mg/100 mL) (Carlson, 1985; Neeser *et al.*, 1991; Sánchez-Díaz *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001) para PL con una relación 60:40 de seroproteínas:caseínas es muy amplio y acorde con los resultados obtenidos.

Se ha observado que la adición de grasa láctea determina altos contenidos de colesterol, incluso en aquellos PL que no llevan adicionado MFGM, como el PL-1. Estos resultados son acordes con los obtenidos por Scopesi *et al.*, (2002), que indica variabilidad del contenido de colesterol con la adición de diferentes ingredientes grasos. Estos autores indican que la adición de aceites vegetales, grasa láctea, grasa animal y huevos al PL proporciona contenidos altos de colesterol (22,6-25,8 mg/100 mL), seguidos de los adicionados de aceites vegetales y grasa láctea (4,8-4,9 mg/100 mL) y de aceites vegetales (0,3-6 mg/100 mL).

Otros tipos de ingredientes que pueden afectar específicamente al contenido de EV son las diferentes mezclas y tipos de aceites vegetales (colza, girasol, girasol con oleico, palma, semilla de palma, coco, etc), pescado y/o hongos (*Mortirella alpina*) utilizados en la formulación de estos PL. En este sentido, los contenidos de EV (mg/100 mL) oscilan de 3,1 a 5, siendo el β -sitosterol el fitosterol más abundante en todos los PL (1,82-3,01), seguido del campesterol (0,72-1,15), estigmasterol (0,27-0,53) y brasicasterol (0,14-0,28). El contenido de sitostanol se halla en cantidades muy inferiores al resto de fitosteroles y al de su fitosterol correspondiente (Ej. β -sitosterol 58-62% y sitostanol 0,9-4%). Estos contenidos son menores que los indicados por Huisman *et al.* (1996) (5,3-11,9 mg/100 mL) y Maduko & Park (2007) (7,2-13,5 mg/100 g de PL reconstituido), donde el EV mayoritario es también el β -sitosterol, seguido muy de cerca por el estigmasterol en el caso de Maduko & Park (2007).

Es conocido que el desmosterol (precursor del colesterol) es abundante en algas rojas (Lopes *et al.*, 2011), cangrejos, mejillones y crustáceos en general (Souchet &

Laplante, 2007). Además, en hongos de la familia *Mortierellaceae* es el esteroles predominante (86% del total de esteroides) (Nes & Nichols, 2006). En concreto, el hongo *Mortierella alpina* que solo produce desmosterol y 24(28)-methylenecholesterol, y es utilizado comercialmente para la producción de ARA (Wang *et al.*, 2011). En este sentido, los PL que llevan adicionados aceites de hongos, algas y pescado (PL-2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13) proporcionan menor contenido de colesterol y tiene mayor porcentaje de desmosterol ($\geq 10\%$). Este último esteroles presenta bajos contenidos (nd-0,42 mg/100 mL) y representa un porcentaje respecto a los esteroides animales variable (6,66-20,03%). No se han observado contenidos de desmosterol en la literatura para PL.

4.4.-Comparación PL vs. LH

Se debe recordar que, en esta tesis, se han analizado esteroides de origen animal y vegetal, LP, Sia y GG, en los PL. Si bien, solo se han analizado LP y Sia total, en LH. Por ello, en la comparación de los esteroides y GG entre PL y LH se han utilizado datos bibliográficos como se muestra a continuación. Generalmente, los contenidos de estos compuestos bioactivos en PL con o sin MFGM son menores que los presentes en LH.

Los contenidos de colesterol (4-5 mg/100 mL) en PL con MFGM (PL-5, PL-6 y PL-9) se aproximan al límite inferior del rango encontrado en literatura para LH madura (6,5-29,2 mg/100 mL) (Clark *et al.*, 1983; Kallio *et al.*, 1989; Jensen, 1996; Huisman *et al.*, 1996; Scopesi *et al.*, 2002; Koletzko *et al.*, 2011; Ramalho *et al.*, 2011; Kamelska *et al.*, 2013), siendo el PL-5 el que presenta los contenidos más altos. Sin embargo, los PL sin MFGM muestran contenidos de colesterol de 5,3 a 9,5 veces inferiores al contenido de LH descrito por Huisman *et al.* (1996) (14 mg colesterol/100 mL).

La adición de MFGM a los PL ayuda a proporcionar una relación de esteroides animales/vegetales más similar a la LH. Se observa que la cantidad de esteroides animales en los PL con MFGM (PL-5, PL-6 y PL-9) (4,26-5,46 mg/100 mL), representados en su mayoría por el colesterol ($> 80\%$), es mayor que la de los EV (3,65-5 mg/100 mL), al igual que ocurre en LH (ratio esteroles animal/vegetal > 1).

Como anteriormente se ha comentado, la adición de grasa láctea también favorece este perfil, ya que los PL con este tipo de grasa (PL-1, PL-5, PL-6 y PL-9) son los únicos que presentan mayor contenido significativo de colesterol que β -sitosterol, así como, una menor proporción de desmosterol en relación a los esteroides animales (< 10%).

El perfil de LP en los PL analizados es PE > SM, mientras que en la LH esta relación se invierte, manteniéndose el mismo orden en el resto de LP para ambos tipos de matrices (PC > PS > PI). Los PL con MFGM (PL-5, 6, 9) aportan contenidos de LP totales (56,18-58,07 vs. 26,56-53,53 mg LP totales/100 mL), así como de PE (23,71 \pm 0,15), PI (5,47 \pm 0,04), PS (5,60 \pm 0,11) y PC (8,61 \pm 0,10) mayores que en LH independientemente del periodo de lactancia estudiado (0-6 meses), con excepción de la SM (12,95 \pm 0,26) que alcanza los contenidos del calostro y la LH madura.

Sin embargo, el contenido medio (mg/100 mL) de los LP totales (31,11 \pm 1,04) y PE (9,35 \pm 0,44) en PL sin MFGM es comparable a la LH madura de 6 meses (29,36 mg LP totales/100 mL). La PC (5,37 \pm 0,15) alcanza los contenidos del calostro y LH madura (3-6 meses), y solo la PI (4,29 \pm 0,44) y PS (4,40 \pm 0,38) alcanzan los contenidos obtenidos en todos los periodos estudiados para la LH (0-6 meses). El aporte de SM (7,70 \pm 0,32), por estos PL, podría no alcanzar los proporcionados por la LH. Por lo tanto, la ingesta de colina disminuirá. Este hecho debe valorarse, ya que se trata de uno de los compuestos que, junto con la PC (deficitario también en el periodo de LH de transición y 1 mes), aportan el 17% de la colina total (Holmes-McNary *et al.*, 1996; Holmes *et al.*, 2000; Icol *et al.*, 2005). La suma de estos dos compuestos (PC + SM) en los PL sin MFGM representa un contenido menor (36-45%) que el proporcionado por la LH (43-50%) y solo el PL-8, PL-10 y PL-12 están en consonancia con lo observado en LH (suma PC y SM > 43%), aportando también un mayor contenido de SM que de PE, de acuerdo con el perfil de LP totales de la LH.

Los contenidos de Sia total en los PL analizados (13,1-25,8 mg/100 mL) son inferiores a los proporcionado por la LH (24,5-136,1 mg/100 mL), excepto en el PL-13 (sin MFGM) que alcanza los contenidos de la LH en el 6º mes de lactancia (25,8

vs. 24,5-31,9 mg Sia total/100 mL). En general, se observa que el contenido de Sia total en los PL es 4,6-9,0 veces menor que el del calostro y de 1,2-2,4 veces menor que el de la LH madura (3 meses).

En el caso de los GG (0,30-2,69 mg ASUL/L), el PL-6 (con MFGM) es el que más se aproxima a la LH, alcanzando los contenidos aportados por Lacomba *et al.* (2011a) (LH madura de 4-7 meses: 2,3 mg ASUL/L); si bien proporciona contenidos de GG entre 1,2 y 1,9 veces menores que la LH madura (3,12-4,82 mg ASUL/L) (Iwamori *et al.*, 2008). Sin embargo, el contenido de GG en los PL sin MFGM es de 2,4 a 24,1 veces menor que la cantidad aportada por la LH estudiada por Iwamori *et al.* (2008) (3,12-7,23 mg ASUL/L).

Solo se han encontrado tres trabajos en la bibliografía que simultáneamente analicen alguno de los LP en PL y LH, indicando mayores contenidos en la LH (Kynast & Schmitz, 1988; Holmes *et al.*, 2000; Icol *et al.*, 2005). Este hecho también se observa en los trabajos que analizan Sia, simultáneamente, en PL y LH (Carlson, 1986; Neeser *et al.*, 1991; Heine *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2001). Además, en un estudio previo del grupo de investigación (Lacomba *et al.*, 2011a) en el que se determina simultáneamente Sia total en PL y LH se observa que aquellos PL con MFGM se aproximan más a la LH madura. Una vez más, las diferentes formulaciones (porcentaje y tipo de ingrediente) está en la base de estas discrepancias.

5.- Bioaccesibilidad de Sia en leche humana y preparados para lactantes

Los contenidos de Sia total en calostro, LH (1 mes) y PL (con y sin MFGM) utilizados en los ensayos de BA son de 136, 53 y 17-20 mg/100 mL, respectivamente. Tras someter las muestras a un proceso de digestión gastrointestinal simulada se obtienen contenidos en las FB de 131, 38 y 16-19 mg/100 mL, respectivamente. En todos los casos, el orden de abundancia de Sia total es: calostro > LH madura > PL, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los PL con (PL-5 y PL-6) y sin MFGM (PL-2). La BA del Sia en función de la matriz considerada sigue el orden: calostro (96%) > PL (88-93%) > LH madura (72%). El NeuGc solo se detecta en PL y sus fracciones bioaccesibles, siendo su BA ligeramente inferior al Neu5Ac (78-84% vs. 88-94%).

La mayor BA de Sia en el calostro (96 %) respecto a la LH madura (72 %) puede ser debido a que los lípidos se distribuyen, en esta, en glóbulos de pequeño tamaño, con un mayor contenido de MFGM, lo que facilita la lipólisis y digestión (Lopez *et al.*, 2015). Otro factor es la rápida solubilidad e hidrólisis de las proteínas en la fase intestinal, favorecida por el pH neutro de esta fase (Ménard *et al.*, 2014). Además, es conocido que el calostro proporciona mayores contenidos de glicoproteínas y oligosacáridos que contienen Sia en su composición (Martin-Sosa *et al.*, 2003, 2004a) y un mayor contenido de proteínas del suero (suero:caseína 90:10 en calostro vs. 60:40 en LH madura) (Nguyen *et al.*, 2015), las cuales tienen un mayor contenido de Sia unido.

Los oligosacáridos contienen en su mayoría Sia y están presentes en mayor cantidad en calostro (3,72 mmol/L) que en LH madura (1,48 mmol/L) (Wang *et al.*, 2001), lo cual justifica los resultados obtenidos en este trabajo. Estos resisten la hidrólisis del intestino, liberando solamente menos del 3% del Sia posible (Engfer *et al.*, 2000) y llegan al colon del lactante sin absorberse, donde favorecen el crecimiento de la flora bifidógena (Brand-Miller *et al.*, 1998). En cambio, otros estudios confirman que los oligosacáridos, además de resistir la hidrólisis pueden ser absorbidos como tales, siendo eliminados en la orina del lactante (Newburg, 2000).

Los resultados indican que a pesar del menor contenido de Sia en la FB de los PL, la correspondiente BA (88-93%) es mayor que en LH madura (72 %) y similar al calostro (96%). Esto puede atribuirse al proceso de homogenización durante la elaboración de los PL, el cual disminuye el tamaño de los glóbulos grasos facilitando la digestión (Berton *et al.*, 2012; Gallier *et al.*, 2013; Bourlieu *et al.*, 2015a, b). Además, los PL, al igual que el calostro, presentan mayor contenido de Sia unido a proteínas del suero respecto a la LH madura (70 vs. 23,7%) (Wang *et al.*, 2001).

Se observa que la BA de los PL analizados es superior al indicado por Lacomba *et al.* (2011b) para preparados similares (91 vs. 77%). Sin embargo, estos autores indican valores de BA superiores para LH madura (87 vs. 72%). Las diferencias pueden atribuirse a la utilización de un modelo de digestión distinto, principalmente en la fase intestinal. En el presente estudio, junto con la pancreatina (tipo y cantidad similar en ambos estudios) se añaden diferentes enzimas individuales (lipasa, colipasa, fofolipasa A2, colesterol esterasa) y sal de taurocolato que ayudan a la formación de micelas en esta fase. Además, se introduce una etapa salivar con neuraminidasa, no incluida en la digestión de Lacomba *et al.* (2011b). Otro factor que puede influir en los resultados es la propia variabilidad del proceso de digestión.

6.- Evaluación de la ingesta de compuestos bioactivos por el lactante

La estimación de la ingesta se realiza durante los 6 primeros meses de vida, puesto que, a partir de esta edad, los PL y la LH dejan de ser el alimento exclusivo, incluyéndose en la alimentación del recién nacido otras fuentes alimentarias que también puedan aportar compuestos bioactivos (colesterol, LP, Sia y GG). Se calculan las ingestas de acuerdo a la metodología indicada en el Anexo VI, basada en la recopilación de datos bibliográficos sobre los volúmenes de PL y LH ingeridos por los lactantes y los contenidos de los compuestos bioactivos analizados en este trabajo.

Los datos sobre ingesta de los compuestos bioactivos analizados en lactantes alimentados con PL o LH en el periodo de 0 a 6 meses son escasos o inexistentes y solo existen ingestas dietéticas recomendadas para colina (125 mg/día) (IOM, 2006).

Ingestas a partir de PL

Las ingestas más altas de colesterol, LP totales, LP con colina (PC y SM) y GG corresponden a los PL que incorporan MFGM (PL-5, PL-6 y PL-9) en su formulación. Además, en consonancia con los contenidos en colesterol y Sia total, indicados anteriormente, el PL-1 (adicionado de grasa láctea) y el PL-13 (sin MFGM) proporciona contenidos altos de estos componentes, respectivamente.

Independientemente del PL utilizado en la alimentación del lactante, las ingestas medias de todos los compuestos bioactivos estudiados aumentan progresivamente desde los 0,5 a los 2 meses, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) para el Sia. Las ingestas se estabilizan durante los 3 meses siguientes, mostrando un ligero aumento en el 5° mes, solamente estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para los LP totales y aquellos lípidos con colina como la PC y SM. Este aumento puede ser debido al mayor volumen consumido por el lactante (ver Anexo VI), ya que su capacidad estomacal con el paso del tiempo incrementa. Posteriormente, disminuye significativamente ($p < 0,05$) hasta llegar a los 6 meses, donde se introduce la alimentación complementaria.

Solo se dispone de datos bibliográficos sobre ingestas de colesterol, GG y Sia total a partir de PL. En general, las ingestas de colesterol y GG obtenidas son del orden de lo observado por Wong *et al.* (1993) en el primer mes (11-39 mg colesterol/día) y Lacomba *et al.* (2011a) en el periodo de 0-6 meses (91-407 μ g ASUL/kg/día), con excepción del PL-6 que para GG obtiene ingestas mayores que Lacomba *et al.* (2011a). Sin embargo, las ingestas de Sia total son superiores a las indicadas por Lacomba *et al.* (2011a) en los 6 primeros meses de vida (16-33 mg Sia/kg/día).

Ingestas a partir de LH

Las ingestas para LP y Sia total, a partir de LH difiere de lo indicado en PL a lo largo de la lactancia. Independientemente de la zona geográfica, en los primeros 15 días las ingestas (mg/día) aumentan significativamente ($p < 0,05$) (LP totales: 104-278; Sia total: 360-520). Posteriormente se produce una ligera disminución hasta los 6 meses (LP totales: 264-242; Sia total: 361-238); incluso en el caso de los LP hasta los 12 meses, siendo estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para el Sia en el periodo de 15 días a 3 meses. Además, se observa que el perfil de ingestas de PC y SM es similar al de los LP totales, oscilando en todo el periodo de lactancia de 14 a 40 mg PC/día y de 35 a 90 mg SM/día. La menor ingesta en los primeros 5 días (calostro) está relacionada con la baja capacidad estomacal del lactante, mientras que el descenso producido a partir de los primeros 15 días puede justificarse por la mayor capacidad del lactante para sintetizar estos compuestos, principalmente Sia.

En el caso de la LH, solo existen datos relativos a ingestas de LP totales (Giuffrida *et al.*, 2014) y SM (García *et al.*, 2012), cuyos valores para lactantes de 1 mes son menores (140 mg LP totales/día) y del orden (62 mg SM/día para LH madura) que los del presente trabajo. Debe destacarse que los volúmenes utilizados para su cálculo son ligeramente mayores (600 mL/día y 800 mL/día, respectivamente) a los aplicados en esta tesis. En el caso de las ingestas de Sia aportadas por la LH de transición (123 mg Sia/kg/día), son menores que las indicadas por Carlson (1985) (210 mg Sia/kg/día). Sin embargo, son similares a las indicadas

para lactantes entre 1-6 meses (31-134 mg Sia/kg/día) (Carlson, 1985; Lacomba *et al.*, 2011a).

Ingestas de PL vs. LH

Puesto que en este trabajo no se han analizado esteroles en LH y sus correspondientes ingestas, se toman como referencia los valores de ingestas de colesterol proporcionados por la LH madura (75-150 mg/día) (Boersma *et al.*, 1991; Kallio *et al.*, 1992; Wong *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1995; Jensen, 1999), no existiendo datos bibliográficos para EV. Las ingestas de colesterol calculadas a partir de los PL analizados (8,9-50,5 mg/día) son menores que las ingestas de EV (19,4-49,5 mg/día) y no alcanzan el 50% de la proporcionada por la LH (Boersma *et al.*, 1991; Kallio *et al.*, 1992; Wong *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1995; Jensen, 1999). Un contenido alto de colesterol al inicio de la vida puede favorecer el desarrollo cerebral y crecimiento del lactante (Dewettinck *et al.*, 2008) y a largo plazo, podría ayudar a la salud cardiovascular (Owen *et al.*, 2008; Koletzko *et al.*, 2011). Por su parte, altas ingestas de EV pueden inhibir la absorción del colesterol en el intestino compitiendo por el espacio micelar (Owen *et al.*, 2008). En el caso de los PL analizados con MFGM estas diferencias entre ingestas de colesterol y EV son menores y se asemejan más a las correspondientes a la LH. Por tanto, la adición de MFGM a los PL puede ser una solución para minimizar estas diferencias.

Por su parte, las ingestas de LP totales obtenidas a partir de ambos tipos de alimentación no muestran diferencias hasta el primer mes, momento a partir del cual las ingestas de LP totales proporcionadas por PL son superiores a la LH. Esta tendencia es similar en el caso de las ingestas de PC; mientras que las ingestas de SM a partir de PL alcanzarían las proporcionadas por la LH a partir del 3º mes.

La cantidad de colina ingerida a través de los PL (PC+SM) oscila de 9-31 mg/día y representa entre el 7-25% de la ingesta dietética recomendada, siendo mayor en los PL con MFGM (17,7-31 mg/día). Esta cantidad es mayor que la proporcionada por la LH (17 mg/día), la cual representa entre el 6-15% de la ingesta dietética recomendada. Como se ha comentado anteriormente, teniendo en cuenta que la

colina es aportada también a través de otros compuestos (colina libre, fosfocolina y glicerofosfocolina) (Holmes *et al.*, 2000), en los PL a los que se les adiciona MFGM puede reducirse la cantidad de colina añadida, al considerar la aportada por los LP, principalmente PC y SM.

Las ingestas de Sia total a partir de LH en los primeros 15 días (520 mg/día) son superiores a las aportadas con los PL (118,6 mg/día). Estas diferencias disminuyen a lo largo de la lactancia y a partir del quinto mes, 2/3 de los PL analizados (PL-3, 4, 5, 8, 10, 11, 12, y 13) alcanzan los valores de ingestas de LH. Solo el PL-13, a partir del segundo mes, proporciona ingestas similares a la LH (226±8 vs. 255±38 mg/día).

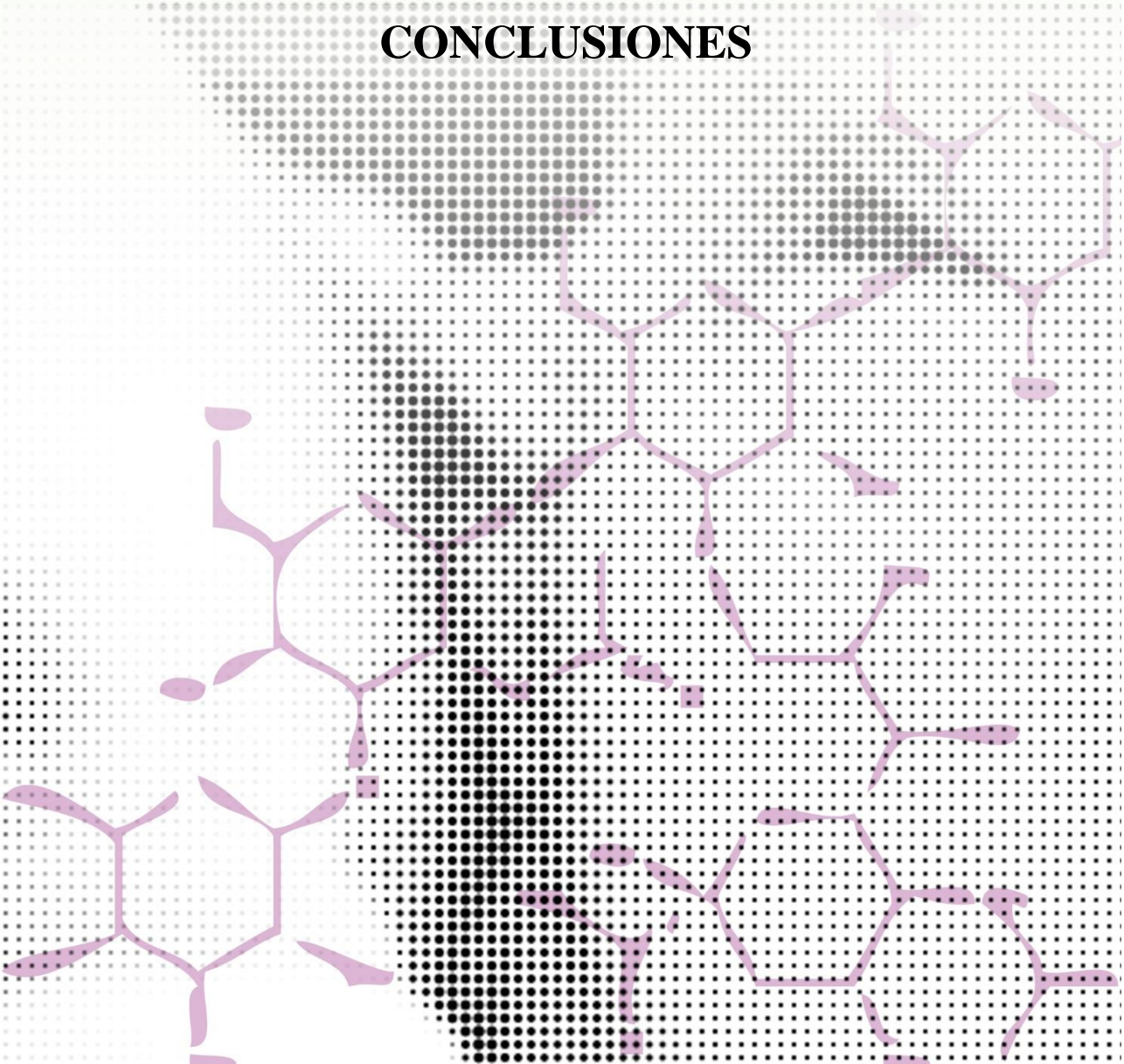
De la comparación de las ingestas de GG aportadas por los PL con las proporcionadas por la LH (datos bibliográficos (Takamizawa *et al.*, 1986), al no ser realizados en esta tesis) se concluye que la mayor diferencia se produce en el segundo mes de lactancia (166,5 µg ASUL/kg/día para PL vs. 795,5 µg ASUL/kg/día para LH). Estas diferencias se reducen al considerar los PL elaborados con MFGM (PL-5, PL-6 y PL-9), pero solo la ingesta de GG a partir del PL-6, en el 6º mes se aproxima a la proporcionada por la LH (309,5±23,0 vs. 359,4±26,7 µg ASUL/kg/día).

Ingestas de Sia a partir de fracción bioaccesible

Las ingestas diarias de Sia total, teniendo en cuenta la fracción de compuesto que es bioaccesible, son: calostro (399±31 mg/día), LH madura de 1 mes (248±16 mg/día) y los PL (108±9 – 176±15 mg/día). Las ingestas a partir de calostro y PL son similares a las obtenidas en estas mismas muestras sin digerir. Sin embargo, en LH madura la ingesta de Sia a partir de la FB disminuye un 28% (355 vs. 248 mg/día). La ingesta diaria de Sia de los PL solo alcanza el 54±5% de la ingesta proporcionada por la FB de la LH madura.

No existen datos previos sobre ingestas de Sia total a partir de FB en la literatura.

CONCLUSIONES



De los resultados obtenidos en los ingredientes analizados, puede afirmarse que:

1) Los ingredientes ricos en membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM-1 y MFGM-2) son los que aportan mayores contenidos de colesterol, ácido siálico y gangliósidos, seguido del concentrado de lípidos polares > β -suero > mazada > natas, a excepción del aporte alto de colesterol por las natas, solo superado por la membrana del glóbulo graso de la leche. En el caso de los lípidos polares, totales e individuales, el concentrado de lípidos polares y el β -suero son los que presentan mayores contenidos.

2) La principal diferencia de aporte en los compuestos bioactivos estudiados entre MFGM-1 y MFGM-2 corresponden a los contenidos de gangliósidos, siendo en el primero 1,8 veces superior.

3) Todos los ingredientes estudiados presentan el mismo perfil de lípidos polares: fosfatidiletanolamina > esfingomielina > fosfatidilcolina > fosfatidilserina > fosfatidilinositol. El concentrado de lípidos polares, β -suero y membrana del glóbulo graso de la leche son los que proporcionan mayores contenidos de esfingomielina y fosfatidilcolina, fuentes de colina.

Del estudio de composición de la leche humana se concluye que:

4) Los contenidos de lípidos polares totales y ácido siálico total disminuye a lo largo de la lactancia (0 a 12 meses). Los lípidos polares totales presentan su mayor concentración en leche humana de transición, mientras que la mayor concentración de ácido siálico total es en calostro.

5) Los contenidos de lípidos polares individuales siguen el mismo comportamiento que los lípidos polares totales, siendo el mayoritario la esfingomielina, seguido de fosfatidiletanolamina > fosfatidilcolina > fosfatidilserina > fosfatidilinositol.

6) Los contenidos significativamente mayores de lípidos polares totales, lípidos minoritarios (fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol) y ácido siálico total,

en la zona litoral respecto a la zona centro, no tiene relevancia nutricional para el lactante.

Del estudio de composición, en los preparados para lactantes se concluye que:

7) El método validado de determinación de esteroides en preparados para lactantes por CG-FID presenta una buena sensibilidad, precisión y exactitud. Por primera vez se valida la determinación de desmosterol, brasicasterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol y sitostanol en preparados para lactantes.

8) Los preparados para lactantes que incluyen membrana del glóbulo graso de la leche presentan los mayores contenidos de colesterol, lípidos polares totales e individuales y gangliósidos, no influyendo este ingrediente en el contenido de ácido siálico, ni en el perfil de lípidos polares (fosfatidiletanolamina > esfingomielina > fosfatidilcolina > fosfatidilserina > fosfatidilinositol), ni en el de esteroides vegetales (β -sitosterol > campesterol > estigmasterol > brasicasterol > sitostanol). La relación de esteroides animales/esteroides vegetales superior a 1 en estos preparados con membrana del glóbulo graso de la leche es más similar a la leche humana.

9) Solo los preparados para lactantes con membrana del glóbulo graso de la leche alcanzan los contenidos de lípidos polares totales, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol obtenidos en calostro, leche humana de transición y leche humana madura analizadas en este estudio. Sus contenidos de esfingomielina se asemejan a los del calostro y leche humana madura.

10) La bioaccesibilidad del ácido siálico es similar en los preparados para lactantes y calostro, siendo mayor a la bioaccesibilidad de leche humana madura. No obstante, la cantidad de ácido siálico presente en la fracción bioaccesible de los preparados para lactantes no alcanza los contenidos presentes en las correspondientes al calostro y leche humana madura.

Del estudio de ingestas a partir de leche humana y preparados para lactantes se concluye que:

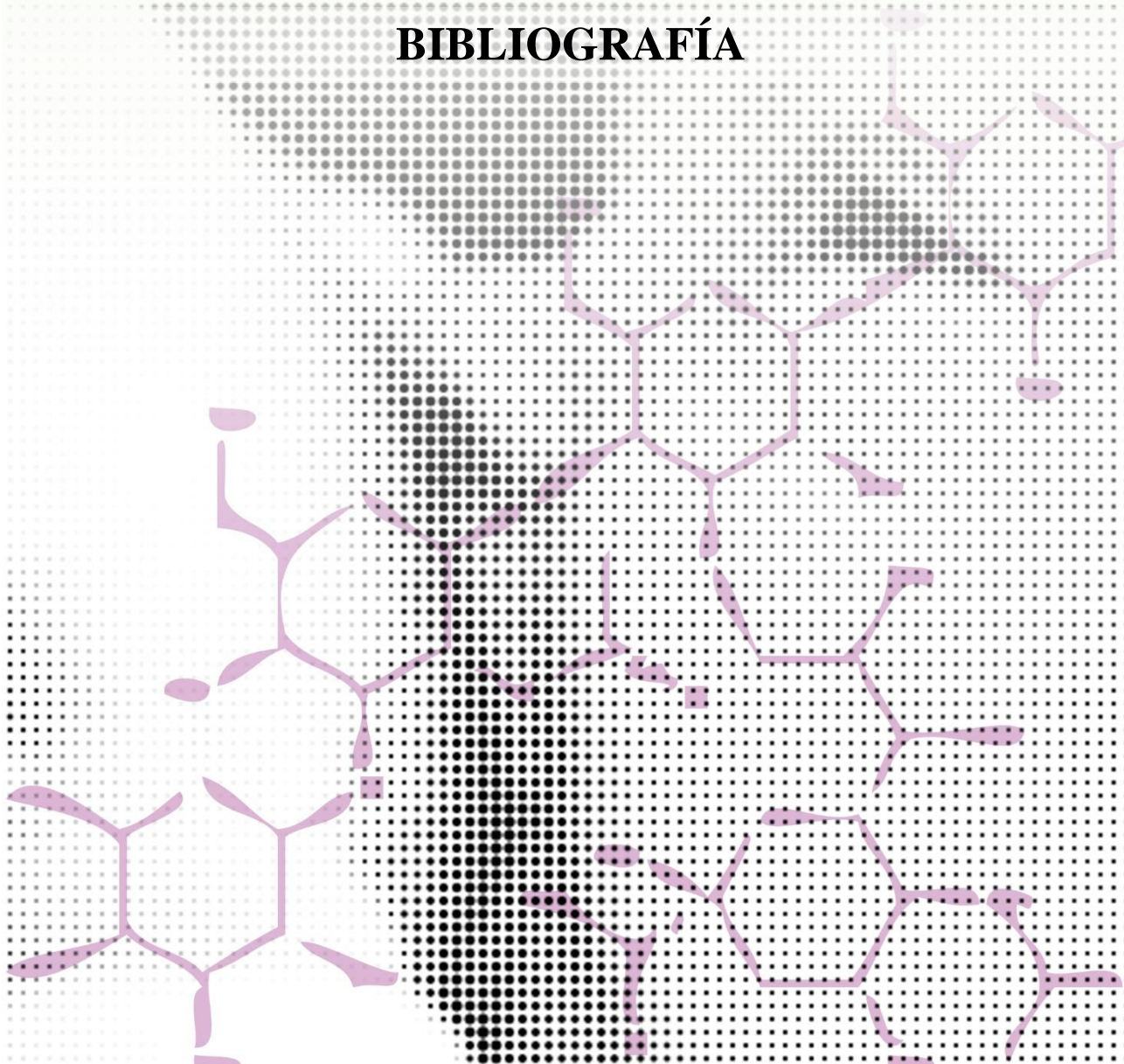
11) Las ingestas de los compuestos bioactivos (lípidos polares totales, fosfatidilcolina, esfingomielina, ácido siálico) entre 0 y 6 meses obtenidas a partir de leche humana son máximas a los 15 días y disminuyen a lo largo de los 6 meses de lactancia, estabilizándose a los 3 meses en el caso de ácido siálico total.

12) Las ingestas de los compuestos bioactivos estudiados entre los 15 días y los 6 meses, obtenidas a partir de los preparados para lactantes son mínimas a los 15 días y máximas a los 5 meses.

13) Las ingestas de lípidos polares totales y fosfatidilcolina en preparados para lactantes superan las de la leche humana a partir del primer mes de lactancia, sin embargo, las correspondientes a esfingomielina son superiores a partir del tercer mes.

14) Destaca la diferencia existente entre las ingestas de ácido siálico total a partir de leche humana y preparados para lactantes en los primeros 15 días, disminuyendo ésta en el transcurso de la lactancia y llegando a equipararse en el quinto mes en la mayoría de los preparados para lactantes analizados. Estas ingestas calculadas a partir de las fracciones bioaccesibles siguen el orden: calostro > leche humana madura > preparados para lactantes.

BIBLIOGRAFÍA



- AAP (American Academy of Pediatrics. Section of breastfeeding) (2005). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 115, 496-506.
- Abad-Rodríguez, J. & Robotti, A. (2007). Regulation of axonal development by plasma membrane gangliosides. *Journal of Neurochemistry*, 103, 47-55.
- Adams, J.S. & Hollis, B.W. (2002). Vitamin D: Synthesis, metabolism and clinical measurement. En Coe, F.L. & Favus, M.J. (Eds.), *Disorders of bone and mineral metabolism* (2nd edition, pp. 157-174). Philadelphia, United States: Lippincott Williams & Wilkins.
- Agostoni, C., Riva, E., Scaglioni, S., Marangoni, F., Radaelli, G. & Giovannini, M. (2000). Dietary fats and cholesterol in Italian infants and children. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 1384s-1391s.
- Ahn, J.H., Jeong, I.S., Kwak, B.M., Leem, D., Yoon, T., Yoon, C., Jeongb, J., Park, J.M. & Kim, J.M. (2012). Rapid determination of cholesterol in milk containing emulsified foods. *Food Chemistry*, 135, 2411-2417.
- Akobeng, A.K., Ramanan, A.V., Buchan, I. & Heller, R.F. (2006). Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Archives of Disease in Childhood*, 91, 39-43.
- Alegría, A., García-Llatas, G. & Cilla, A. (2015a). Static digestión models: General introduction. En Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D. & Wichers, H. (Eds.), *The impact of food bioactives on gut health. In vitro and in vivo models* (pp.3-12). New York: Springer Open.
- Alegría, A., García-Llatas, G. & Barberá, R. (2015b). Determining calcium bioavailability using caco-2 cells. In Preedy, V.R. (Ed.), *Food and Nutritional components in Focus* (pp.179-200). Reino Unido: The Royal Society of Chemistry.
- Aleman-Costa, L., González-Larena, M., García-Llatas, G., Alegría, A., Barberá, R., Sánchez-Siles, L. M. & Lagarda, M.J. (2012). Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources. *Food Research International*, 48, 265-270.
- Álvarez-Sala, A., García-Llatas, G., Barberá, R. & Lagarda, M.J. (2015). Determination of cholesterol in human milk: an alternative to chromatographic methods. *Nutrición hospitalaria: Organo oficial de la Sociedad española de nutrición parenteral y enteral*, 32, 1535-1540.
- Amara, S., Patin, A., Giuffrida, F., Wooster, T. J., Thakkar, S. K., Bénarouche, A., Poncin, I., Robert, S., ... & Gaussier, H. (2014). In vitro digestion of citric acid esters of mono-and diglycerides (CITREM) and CITREM-containing infant formula/emulsions. *Food & Function*, 5, 1409-1421.
- Anand, B.S., Romero, J.J., Sanduja, S.K. & Lichtenberger, L.M. (1999). Phospholipid association reduces the gastric mucosal toxicity of aspirin in human subjects. *The American Journal of Gastroenterology*, 94, 1818-1822.
- Anderson, J.W., Johnstone, B.M. & Remley, D.T. (1999). Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 525-535.
- Angata, T. & Varki, A. (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: An evolutionary perspective. *Chemical Reviews*, 102, 439-469.
- AOAC. 2012. Guidelines for single-laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Official methods of analysis of AOAC International (19th ed.). Appendix K, Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- Armstrong, J. & Reilly, J.J. (2002). Breastfeeding and lowering the risk of childhood obesity. *The Lancet*, 359, 2003-2004.
- Avalli, A. & Contarini, G. (2005). Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *Journal of Chromatography A*, 1071, 185-190.

- Bachrach, V.R.G., Schwarz, E. & Bachrach, L.R. (2003). Breastfeeding and the risk of hospitalization for respiratory disease in infancy: a meta-analysis. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 157, 237-243.
- Baenke, F. Peck, B. Miess, H. & Schulze, A. (2013). Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease Models & Mechanisms*, 6, 1353-1363.
- Bayley, T.M., Alasmi, M., Thorkelson, T., Jones, P.J., Corcoran, J., Krug-Wispe, S. & Tsang, R.C. (2002). Longer term effects of early dietary cholesterol level on synthesis and circulating cholesterol concentrations in human infants. *Metabolism*, 51, 25-33.
- Beaudry, M., Dufour, R. & Marcoux, S. (1995). Relation between infant feeding and infections during the first six months of life. *The Journal of Pediatrics*, 126, 191-197.
- Bedoya Mejía, O., Posada, S.L. & Rosero Noguera, R. (2012). Composición de la leche de cabra y factores nutricionales que afectan el contenido de sus componentes. En Garcés Giraldo, L.F. (Ed.), *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia* (pp. 93-110). Itagüí, Colombia: Artes y Letras S.A.S
- Ben, X.M., Li, J., Feng, Z.T., Shi, S.Y., Lu, Y.D., Chen, R. & Zhou, X.Y. (2008). Low level of galacto-oligosaccharide in IF stimulates growth of intestinal *Bidobacteria* and *Lactobacilli*. *World Journal of Gastroenterology*, 14, 6564-6568.
- Benoit, B., Fauquant, C., Daira, P., Peretti, N., Guichardant, M. & Michalski, M.C. (2010). Phospholipid species and minor sterols in French human milks. *Food Chemistry*, 120, 684-691.
- Berton, A., Rouvellac, S., Robert, B., Rousseau, F., Lopez, C. & Crenon, I. (2012). Effect of the size and interface composition of milk fat globules on them in vitro digestion by the human pancreatic lipase: native versus homogenized milk fat globules. *Food Hydrocolloids*, 29, 123-134.
- Bhandari, N., Bahl, R., Mazumdar, S., Martinez, J., Black, R.E., Bhan, M.K. & other members of the Infant Feeding Study Group. (2003). Effect of community-based promotion of exclusive breastfeeding on diarrhoeal illness and growth: a cluster randomised controlled trial. *The Lancet*, 361, 1418-1423.
- Bitman, J., Wood, L., Hamosh, M., Hamosh, P. & Mehta, N.R. (1983). Comparison of the lipid composition of breast milk from mothers of term and preterm infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 38, 300-312.
- Bitman, J., Wood, D.L., Mehta, N.R., Hamosh, P. & Hamosh, M. (1984). Comparison of the phospholipid composition of breast milk from mothers of term and preterm infants during lactation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 40, 1103-1119.
- Blaas, N., Schüürmann, C., Bartke, N., Stahl, B. & Humpf, H.U. (2011). Structural profiling and quantification of sphingomyelin in human breast milk by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6018-6024.
- Blanquet-Diot, S., Soufi, M., Rambeau, M., Rock, E. & Alric, M. (2009). Digestive stability of xanthophylls exceeds that of carotenes as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal system. *The Journal of Nutrition*, 139, 876-883.
- Blaymore Bier, J. A., Oliver, T., Ferguson, A. & Vohr, B. R. (2002). Human milk reduces outpatient upper respiratory symptoms in premature infants during their first year of life. *Journal of Perinatology*, 22, 354-359.
- Blix, G. (1936). Ueber die Kohlenhydratgruppen des Submaxillarismucins. *Hoppe-Seyler's Z Physiological Chemistry*, 240, 43-54.
- Blix, G., Gottschalk, A. & Klenk, E. (1957). Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature*, 179, 1088.
- Blusztajn, J.K. (1998). Choline, a vital amine. *Science*, 281, 794-795.

- Boersma, E.R., Offringa, P.J., Muskiet, F.A., Chase, W.M. & Simmons, I.J. (1991). Vitamin E, lipid fractions, and fatty acid composition of colostrum, transitional milk, and mature milk: an international comparative study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *53*, 1197-1204.
- Bonnaillie, L.M., Qi, P., Wickham, E. & Tomasula, P.M. (2014). Enrichment and purification of casein glycomacropeptide from whey protein isolate using supercritical carbon dioxide processing and membrane ultrafiltration. *Foods*, *3*, 94-109.
- Bourlieu, C., Ménard, O., Bouzerzour, K., Mandalari, G., Macierzanka, A., Mackie, A.R. & Dupont, D. (2014). Specificity of infant digestive conditions: some clues for developing relevant in vitro models. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*, 1427-1457.
- Bourlieu, C., Bouzerzour, K., Ferret-Bernard, S., Bourgot, C.L., Chever, S., Ménard, O., Deglaire, A., Cuiet, I., Le Ruyet, P., Bonhomme, C., Dupont, D. & Le Huërou-Luron, I. (2015a). Infant formula interface and fat source impact on neonatal digestion and gut microbiota. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *117*, 1500-1512.
- Bourlieu, C., Ménard, O., De La Chevasserie, A., Sams, L., Rousseau, F., Madec, M.N., Roberta, B., Deglaire, A., Pezenneca, S., Bouhallaba, S., Carrière, F. & Dupont, D. (2015b). The structure of infant formulas impacts their lipolysis, proteolysis and disintegration during in vitro gastric digestion. *Food chemistry*, *182*, 224-235.
- Bracco, U., Hidalgo, J. & Bohren, H. (1972). Lipid composition of the fat globule membrane of human and bovine milk. *Journal of Dairy Science*, *55*, 165-172.
- Brand-Miller, J., Bull, S., Miller, J. & Mcveagh, P. (1994). The oligosaccharide composition of human milk: temporal and individual variations in monosaccharide components. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *19*, 371-6.
- Brand-Miller, J.C., McVeagh, P., McNeil, Y. & Messer, M. (1998). Digestion of human milk oligosaccharides by healthy infants evaluated by the lactulose hydrogen breath test. *The Journal of Pediatrics*, *133*, 95-98.
- Brandner, C. (2002). Perinatal choline treatment modifies the effects of a visuo-spatial attractive cue upon spatial memory in naive adult rats. *Brain Research*, *928*, 85-95.
- Braun, M., Flück, B., Cotting, C., Monard, F. & Giuffrida, F. (2010). Quantification of phospholipids in infant formula and growing up milk by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector. *Journal of AOAC International*, *93*, 948-955.
- Britten, M., Lamothe, S., & Robitaille, G. (2008). Effect of cream treatment on phospholipids and protein recovery in butter-making process. *International Journal of Food Science & Technology*, *43*, 651-657.
- Buchheim, W. (1986). Membranes of milk fat globules, ultrastructural, biochemical and technological aspects. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, *38*, 227-246.
- Cabezas, J.A., Reglero, A., García-Alonso, J., Rodrigo, M., Martínez-Zorzano, V.S., Cabezas-Delamare, M., Fitt, H. & Hueso, P. (1989). Gangliósidos: datos recientes sobre sus características, funciones y aplicaciones terapéuticas. *Jano*, *870*, 43-49.
- Cabezas Fernández del Campo, J.A. (2011). The N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid: Its relation with the biodiversity and immune and infection processes (Review). En *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, *77*. Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/viewFile/1171/1227>. Consultado en septiembre 2016.
- Cano-Ruiz, M.E. & Richter, R.L. (1997). Effect of homogenization pressure on the milk fat globule membrane proteins. *Journal of Dairy Science*, *80*, 2732-2739.
- Carlson, S.E. (1985). N-acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *41*, 720-726.

- Carlson, S.E., Montalto, M.B., Ponder, D.L., Werkman, S.H. & Korones, S.B. (1998). Lower incidence of necrotizing enterocolitis in infants fed a preterm formula with egg phospholipids. *Pediatric Research*, *44*, 491-498.
- Castro-Gómez, P., Garcia-Serrano, A., Visioli, F. & Fontecha, J. (2015). Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *101*, 41-51.
- Catchpole, O.J., Tallon, S.J., Grey, J.B., Fletcher, K. & Fletcher, A. J. (2008). Extraction of lipids from a specialist dairy stream. *The Journal of Supercritical Fluids*, *45*, 314-321.
- Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M.G. & Zweibaum, A. (1988). Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer research*, *48*, 1936-1942.
- Chouraqui, J.P., Grathwohl, D., Labaune, J.M., Hascoet, J.M., de Montgolfier, I., Leclaire, M., Giarre, M. & Steenhout, P. (2008). Assessment of the safety, tolerance, and protective effect against diarrhea of infant formulas containing mixtures of probiotics or probiotics and prebiotics in a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *87*, 1365-1373.
- Chulada, P.C., Arbes, S.J., Dunson, D. & Zeldin, D.C. (2003). Breast-feeding and the prevalence of asthma and wheeze in children: analyses from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *111*, 328-336.
- Cilla, A., Diego-Quintaes, K., Barberá, R. & Alegría, A. (2016). Phospholipids in human milk and infant formulas: benefits and needs for correct infant nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*, 1880-1892.
- Cilleruel, M.L. & Calvo, C. (2004). Fórmulas adaptadas para lactantes y modificaciones actuales de éstas. *Anales de Pediatría Continuada*, *2*, 325-338.
- Clark, R.M., Ferris, A.M., Fey, M., Brown, P.B., Hundrieser, K.E. & Jensen, R.G. (1982). Changes in the lipids of human milk from 2 to 16 weeks postpartum. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *1*, 311-316.
- Clark, R.M., Fey, M.B., Jensen, R.G. & Hill, D.W. (1983). Desmosterol in human milk. *Lipids*, *18*, 264-266.
- Collins, S. E., Jackson, M. B., Lammi-Keefe, C. J. & Jensen, R. G. (1989). The simultaneous separation and quantitation of human milk lipids. *Lipids*, *24*, 746-749.
- Contarini, G. & Povolò, M. (2013). Phospholipids in milk fat: composition, biological and technological significance, and analytical strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*, 2808-2831.
- Costa, M.R., Elias-Argote, X.E., Jiménez-Flores, R. & Gigante, M.L. (2010). Use of ultrafiltration and supercritical fluid extraction to obtain a whey buttermilk powder enriched in milk fat globule membrane phospholipids. *International Dairy Journal*, *20*, 598-602.
- Crews, H.M., Burrell, J.A. & McWeeny, D.J. (1983). Preliminary enzymolysis studies on trace element extractability from food. *Journal of Science Food Agricultural*, *34*, 997-1004
- Cruz, A.M.L, Wong, W.W., Mimouni, F., Hachey, D.L., Setchell, K.D.R., Klein, P.D. & Tsang, R.C. (1994). Effects of infant nutrition on cholesterol synthesis rates. *Pediatric Research*, *35*, 135-140.
- Da Costa, T.H.M., Haisma, H., Wells, J.C.K., Mander, A.P., Whitehead, R.G. & Bluck, L.J. (2010). How much human milk do infants consume? Data from 12 countries using a standardized stable isotope methodology. *Journal of Nutrition*, *140*, 2227-2232.
- Dall'Asta, C., Florio, P., Lammardo, A. M., Prandi, B., Mazzeo, T., Budelli, A. & Pellegrini, N. (2015). Development of an in vitro digestive model for studying the peptide profile of breast milk. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *66*, 409-415.

- Deglaire, A., Bos, C., Tomé, D., & Moughan, P.J. (2009). Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human. *British journal of nutrition*, 102, 1752-1759.
- Delplanque, B. & Baudry, C. (2015). Dairy fat in infant formula. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 1487-1488.
- Der, G., Batty, G.D. & Deary, I.J. (2006). Effect of breast feeding on intelligence in children: prospective study, sibling pairs analysis, and meta-analysis. *British Medical Journal*, 333, 945-951.
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T.T., Messens, K. & Van Camp, J. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 18, 436-457.
- Dewey, K.G., Heinig, M.J. & Nommsen-Rivers, L.A. (1995). Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants. *The Journal of Pediatrics*, 126, 696-702.
- Dickson, J.J. & Messer, M. (1978). Intestinal neuraminidase activity of suckling rats and other mammals. Relationship to the sialic acid content of milk. *Biochemical Journal*, 170, 407-413.
- Dietschy, J.M. & Turley, S.D. (2004). Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *Journal of Lipid Research*, 45, 1375-1397.
- Directiva 2006/141/CE de la Comisión, de 22 de diciembre relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 401, 1-33.
- Directiva 2013/46/UE de la Comisión, de 28 de agosto de 2013 por la que se modifica la Directiva 2006/141/CE con respecto a los requisitos sobre proteínas de los preparados para lactantes y preparados de continuación. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 230, 16-19.
- Dupont, D., Mandalari, G., Molle, D., Jardín, J., Léonil, J., Faulks, R.M., Wickham, M.S.J., Mills, E.N.C & Mackie, A.R. (2010). Comparative resistance of food proteins to adult and infant in vitro digestion models. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 767-780.
- EFSA, Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. (2009a). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to sialic acid and learning and memory (ID 1594) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006 on request from the European Commission. *The EFSA Journal*, 7, 1277-1285.
- EFSA, Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. (2009b). Scientific Opinion DHA and ARA and visual development. Scientific substantiation of a health claim related to docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA) and visual development pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, 941, 1-14.
- EFSA, Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. (2009c). Scientific Opinion DHA and support of the visual development of the unborn child and breastfed infant. Scientific substantiation of a health claim related to DHA and support of the visual development of the unborn child and breastfed infant pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, 1006, 1-12.
- EFSA, Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. (2009d). Scientific Opinion DHA and support of the cognitive development of the unborn child and breastfed infant Scientific substantiation of a health claim related to DHA and support of the cognitive development of the unborn child and breastfed infant pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, 1007, 1-14.
- El-Loly, M. (2011). Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61, 7-32.

- Elling, J.L., Duncan, S.E., Keenan, T.W., Eigel, W.N. & Boling, J. (1996). Composition and microscopy of reformulated creams from reduced-cholesterol butteroil. *Journal of Food Science*, 61, 48-53.
- Engfer, M.B., Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G. & Daniel, H. (2000). Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1589-1596.
- ESPGHAN (European Society of Pediatrics Gastroenterology, Hepatology and Nutrition). (2009). Committee on nutrition. Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49, 112-125.
- Etcheverry, P., Grusak, M.A. & Fleige, L.E. (2012) Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in Physiology*, 3, 1-21.
- Fauquant, C., Briard-Bion, V., Leconte, N., Guichardant, M. & Michalski, M. C. (2007). Membrane phospholipids and sterols in microfiltered milk fat globules. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 1167-1173.
- Fernández, C., Martín, M., Gómez-Coronado, D. & Lasunción, M.A. (2003). Efecto de los fitosteroles sobre la biosíntesis de colesterol y la proliferación en células humanas. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 15, 175-183.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I. & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29, 751-760.
- Fischer, L.M., Da Costa, K.A., Galanko, J., Sha, W., Stephenson, B., Vick, J. & Zeisel, S.H. (2010). Choline intake and genetic polymorphisms influence choline metabolite concentrations in human breast milk and plasma. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 92, 336-346.
- Fleith, M. & Clandinin, M.T. (2005). Dietary PUFA for preterm and term infants: review of clinical studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 205-229.
- Fong, B.Y., Norris, C.S. & MacGibbon, A.K. (2007). Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *International Dairy Journal*, 17, 275-288.
- Fong, B., Norris, C. & McJarrow, P. (2011). Liquid chromatography-high-resolution electrostatic ion-trap mass spectrometric analysis of GD₃ ganglioside in dairy products. *International Dairy Journal*, 21, 42-47.
- Fong, B., Ma, L. & Norris, C. (2013). Analysis of phospholipids in infant formulas using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 858-865.
- Fontecha, J., Rodriguez-Alcala, L.M., Calvo, M.V. & Juárez, M. (2011). Bioactive milk lipids. *Current Nutrition & Food Science*, 7, 155-159.
- Gallier, S., Gragson, D., Cabral, C., Jiménez-Flores, R. & Everett, D.W. (2010). Composition and fatty acid distribution of bovine milk phospholipids from processed milk products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10503-10511.
- Gallier, S., Cui, J., Olson, T.D., Rutherford, S.M., Ye, A., Moughan, P.J. & Singh, H. (2013). In vivo digestion of bovine milk fat globules: Effect of processing and interfacial structural changes. I. Gastric digestion. *Food chemistry*, 141, 3273-3281.
- Gallier, S., Vocking, K., Post, J.A., Van De Heijning, B., Acton, D., Van Der Beek, E.M. & Van Baalen, T. (2015). A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 329-339.
- Garcia, C., Millet, V., Coste, T.C., Mimoun, M., Ridet, A., Antona, C., Simeoni, U. & Armand, M. (2011). French mothers' milk deficient in DHA contains phospholipid species of potential interest for infant development. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 53, 206-212.

- García, C., Lutz, N.W., Confort-Gouny, S., Cozzone, P.J., Armand, M. & Bernard, M. (2012). Phospholipid fingerprints of milk from different mammals determined by ^{31}P NMR: towards specific interest in human health. *Food Chemistry*, 135, 1777-1783.
- García, C. & Innis, S. (2013). Structure of the human milk fat globule. *Lipid Technology*, 25, 223-226.
- García-Llatas, G. & Rodríguez-Estrada, M.T. (2011). Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 607-624.
- García-Llatas, G., Vidal, C., Cilla, A., Barberá, R. & Lagarda, M.J. (2012). Simultaneous quantification of serum phytosterols and cholesterol precursors using a simple gas chromatographic method. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 520-526.
- García-Onieva, M. (2007). Lactancia artificial: técnica, indicaciones, fórmulas especiales. *Pediatría Integral*, 11, 318-326.
- Gardocki, M.E., Jani, N. & Lopes, J.M. (2005) Phosphatidylinositol biosynthesis: bio-chemistry and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1735, 89-100.
- Gassi, J.Y., Famelart, M.H. & Lopez, C. (2008). Heat treatment of cream affects the physicochemical properties of sweet buttermilk. *Dairy Science and Technology*, 88, 369-385.
- Gassi, J. Y., Blot, M., Beaucher, E., Robert, B., Leconte, N., Camier, B., Rousseau, F., Bourlieu, C., Jardin, J., Briard-Bion, V., Lambert, S., Gésan-Guiziou, G., Lopez, C. & Gaucheron, F. (2016). Preparation and characterisation of a milk polar lipids enriched ingredient from fresh industrial liquid butter serum: combination of physico-chemical modifications and technological treatments. *International Dairy Journal*, 52, 26-34.
- Giuffrida, F., Cruz-Hernandez, C., Flück, B., Tavazzi, I., Thakkar, S.K., Destaillets, F. & Braun, M. (2013). Quantification of phospholipids classes in human milk. *Lipids*, 48, 1051-1058.
- Giuffrida, F., Elmelegy, I.M., Thakkar, S.K., Marmet, C. & Destaillets, F. (2014). Longitudinal Evolution of the concentration of gangliosides GM3 and GD3 in human milk. *Lipids*, 49, 997-1004.
- Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B., & Blázquez-García, S. (2007). In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 102, 641-648.
- Guan, J., MacGibbon, A., Fong, B., Zhang, R., Liu, K., Rowan, A. & McJarrow, P. (2015). Long-term supplementation with beta serum concentrate (BSC), a complex of milk lipids, during post-natal brain development improves memory in rats. *Nutrients*, 7, 4526-4541.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S. & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30, 591-600.
- Guo, Z., Vikbjerg, A.F. & Xu, X. (2005). Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnology Advances*, 23, 203-259.
- Gurnida, D. A., Rowan, A. M., Idjradinata, P., Muchtadi, D. & Sekarwana, N. (2012). Association of complex lipids containing gangliosides with cognitive development of 6-month-old infants. *Early Human Development*, 88, 595-601.
- Haile, Y., Haastert, K., Cesnulevicius, K., Strummeyer, K. & Timmer, H. (2007). Culturing of glial and neuronal cells on polysialic acid. *Biomaterials*, 28, 1163-1173.
- Haisma, H., Coward, W.A., Albermaz, E., Visser, G.H., Wells, J.C.K., Wright, A. & Victora, C.G. (2003). Breast milk and energy intake in exclusively, predominantly, and partially breast-fed infants. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 1633-1642.
- Harit, D., Faridi, M. M. A., Aggarwal, A. & Sharma, S. B. (2008). Lipid profile of term infants on exclusive breastfeeding and mixed feeding: a comparative study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62, 203-209.

- Harrison, R. (2004). Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug metabolism reviews*, 36, 363-375.
- Harrison, R. (2006). Milk xanthine oxidase: Properties and physiological roles. *International Dairy Journal*, 16, 546-554.
- Harzer, G., Haug, M., Dieterich, I. & Gentner, P. (1983). Changing patterns of human milk lipids in the course of the lactation and during the day. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 37, 612-621.
- Heid, H.W. & Keenan, T.W. (2005). Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *The European Journal of Cell Biology*, 84, 245-58.
- Heine, W., Wutzke, K.D. & Radke, M. (1993). Sialic acid in breast milk and infant formula food. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 141, 946-950.
- Hester, S.N., Hustead, D.S., Mackey, A.D., Singhal, A. & Marriage, B.J. (2012). Is the macronutrient intake of formula-fed infants greater than breast-fed infants in early infancy? *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012, 1-13.
- Holmes, H.C., Snodgrass, G.J.A.I. & Iles, R.A. (2000). Changes in the choline content of human breast milk in the first 3 weeks after birth. *European Journal of Pediatrics*, 159, 198-204.
- Holmes-McNary, M.Q., Cheng, W.L., Mar, M.H., Fussell, S. & Zeisel, S.H. (1996). Choline and choline esters in human and rat milk and in infant formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 64, 572-576.
- Hopper, K.E. & McKeinze, H.A. (1973). Minor components of bovine α -lactalbumin A and B. *BBA - Protein Structure*, 295, 352-363.
- Huisman, M., Van Beusekom, C.M., Lanting, C.I., Nijeboer, H.J., Muskiet, F.A. & Boersma, E.R. (1996). Triglycerides, fatty acids, sterols, mono- and disaccharides and sugar alcohols in human milk and current types of infant formula milk. *European Journal of Clinical Nutrition*, 50, 255-260.
- Hundrieser, K. & Clark, R.M. (1988). A method for separation and quantification of phospholipid classes in human milk. *Journal of Dairy Science*, 71, 61-67.
- Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A. & McClements, D.J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1-12.
- Hurum, D.C. & Rohrer, J.S. (2012). Determination of sialic acids in infant formula by chromatographic methods: A comparison of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and ultra-high-performance liquid chromatography methods. *Journal of Dairy Science*, 95, 1152-1161.
- ICH (International Conference on Harmonization) (2005) Validation of analytical procedures: Text and methodology. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Disponible en: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>. Consultado en septiembre 2016.
- Idler, D.T. & Wiseman, P. (1970). Sterols in red algae (*Rhodophyceae*): Variation in the desmosterol content of dulce (*Rhodomenia palmata*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 35, 679-687.
- Iicol, Y.O., Ozbek, R., Hamurtekin, E. & Ulus, I.H. (2005). Choline status in newborns, infants, children, breast-feeding women, breast-fed infants and human breast milk. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 489-499.
- Innis, S.M. (1991). Essential fatty acids in growth and development. *Progress in lipid research*, 30, 39-103.
- Innis, S. M. (2007). Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *The Journal of Nutrition*, 137, 855-859.
- IOM (2006). Dietary reference intakes: The essential guide to nutrients requirements for folate, thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington,

- DC, USA: Institute of Medicine and National Academy of Sciences. Disponible en: <https://www.nap.edu/read/11537/chapter/23>. URL: National Academy Press. Consultado en febrero 2016.
- IUPAC-IUB. (1997). Joint Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of glycolipids. *Glycoconjugate Journal*, 16, 1-6.
- Iwamori, M., Takamizawa, K., Momoeda, M., Iwamori, Y. & Taketani, Y. (2008). Gangliosides in human, cow and goat milk, and their abilities as to neutralization of cholera toxin and botulinum type A neurotoxin. *Glycoconjugate Journal*, 25, 675-683.
- Jensen, R. G., Lammi-Keefe, C. J., Ferris, A. M., Jackson, M. B., Couch, S. C., Capacchione, C. M., Ahn, H.S & Murtaugh, M. (1995). Human milk total lipid and cholesterol are dependent on interval of sampling during 24 hours. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 20, 91-94.
- Jensen, R.G. (1996). The lipids in human milk. *Progress in Lipid Research*, 35, 53-92.
- Jensen, R.G. (1999). Lipids in human milk. *Lipids*, 34, 1243-1271.
- Jeong, I.S., Kwak, B.M., Ahn, J.H., Leem, D., Yoon, T., Yoon, C., Jeong, J., Park, J.M. & Kim, J.M. (2012). A novel sample preparation method using rapid nonheated saponification method for the determination of cholesterol in emulsified foods. *Journal of Food Science*, 77, C1042-C1046.
- Kallio, M.J., Siimes, M.A., Perheentupa, J., Salmenperä, L. & Miettinen, T.A. (1989). Cholesterol and its precursors in human milk during prolonged exclusive breast-feeding. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 50, 782-785.
- Kallio, M. J., Salmenperä, L., Siimes, M. A., Perheentupa, J. & Miettinen, T. A. (1992). Exclusive breast-feeding and weaning: effect on serum cholesterol and lipoprotein concentrations in infants during the first year of life. *Pediatrics*, 89, 663-666.
- Kallio, M. J., Salmenperä, L., Siimes, M. A., Perheentupa, J., Gylling, H. & Miettinen, T. A. (1997). Apoprotein E phenotype determines serum cholesterol in infants during both high-cholesterol breast feeding and low-cholesterol formula feeding. *Journal of Lipid Research*, 38, 759-764.
- Kamelska, A.M., Pietrzak-Fiećko, R. & Bryl, K. (2011). Cholesterol content as an infant formulas quality determinant. *University of Economics in Poznan Scientific Papers*, 196, 38-45.
- Kamelska, A.M., Pietrzak-Fiećko, R. & Bryl, K. (2012). Variation of the cholesterol content in breast milk during 10 days collection at early stages of lactation. *Acta Biochimica Polonica*, 59, 243-247.
- Kamelska, A.M., Pietrzak-Fiećko, R. & Bryl, K. (2013). Determination of cholesterol concentration in human milk samples using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Applied Spectroscopy*, 80, 148-152.
- Keenan, T.W. (1974). Composition and synthesis of gangliosides in mammary gland and milk of the bovine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 337, 255-270.
- Klein, J., Köppen, A. & Löffelholz, K. (1998). Regulation of free choline in rat brain: dietary and pharmacological manipulations. *Neurochemistry International*, 32, 479-485.
- Klenk, E. (1941). Neuraminsäure, das Spaltprodukt eines neuen Gehirnlipids. *Hoppe-Seyler's Z Physiological Chemistry*, 268, 50-58.
- Koletzko, B., Rodriguez-Palmero, M., Demmelmair, H., Fidler, N., Jensen, R. & Sauerwald, T. (2001). Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development*, 65, S3-S18.
- Koletzko, B., Agostoni, C., Bergmann, R., Ritzenthaler, K. & Shamir, R. (2011). Physiological aspects of human milk lipids and implications for infant feeding: a workshop report. *Acta Paediatrica*, 11, 1405-1415.
- Kolter, T. (2012). Ganglioside biochemistry. *ISRN biochemistry*, 2012, 1-36.

- Kramer, M.S., Guo, T., Platt, R.W., Sevkovskaya, Z., Dzikovich, I., Collet, J.P., Shapiro, S., Chalmers, B., Hodnett, E., Vanilovich, I., Mezen, I., Ducruet, T., Shishko, G. & Bogdanovich, N. (2003). Infant growth and health outcomes associated with 3 compared with 6 mo of exclusive breastfeeding. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 291-295.
- Krebs, N.F., Jacobson, M.S. & American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. (2003). Prevention of pediatric overweight and obesity. *Pediatrics*, 112, 424.
- Kuhn, R. & Brossmer, R. (1954). Über die Prothetische Gruppe der Mucoproteine des Kuhcolostrums. *Chemische Berichte*, 87, 123-125.
- Kvistgaard, A. S., Pallesen, L. T., Arias, C. F., Lopez, S., Petersen, T. E., Heegaard, C. W., & Rasmussen, J. T. (2004). Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *Journal of Dairy Science*, 87, 4088-4096.
- Kynast, G. & Schmitz, C. (1988). Determination of the phospholipid content of human milk, cow's milk and various infant formulas. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 27, 252-265
- Labbok, M.H. (2001). Effects of breastfeeding on the mother. *Pediatric Clinics of North America*, 48, 143-158.
- Lacomba, R., Salcedo, J., Alegría, A., Lagarda, M.J., Barberá, R. & Matencio, E. (2010). Determination of sialic acid and gangliosides in biological samples and dairy products: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 346-357.
- Lacomba, R., Salcedo, J., Alegría, A., Barberá, R., Hueso, P., Matencio, E. & Lagarda, M.J. (2011a). Sialic acid (N-acetyl and N-glycolylneuraminic acid) and ganglioside in whey protein concentrates and infant formulae. *International Dairy Journal*, 21, 887-895.
- Lacomba, R., Salcedo, J., Alegría, A., Barberá, R., Hueso, P., Matencio, E. & Lagarda, M.J. (2011b). Effect of simulated gastrointestinal digestion on sialic acid and gangliosides present in human milk and infant formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5755-5762.
- Laegreid, A., Otnaess, A.B.K. & Fuglesang, J. (1986). Human and bovine milk: comparison of ganglioside composition and enterotoxin-inhibitory activity. *Pediatric Research*, 20, 416-421.
- Lagarda, M.J., García-Llatas, G., & Farré, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1486-1496.
- Laitinen, K., Isolauri, E., Kaipiainen, L., Gylling, H. & Miettinen, T.A. (2009). Plant stanol ester spreads as components of a balanced diet for pregnant and breast-feeding women: evaluation of clinical safety. *British Journal of Nutrition*, 101, 1797-1804.
- Lammi-Keefe, C.J., Ferris, A.M. & Jensen, R.G. (1990). Changes in Human Milk at 0600, 1000, 1400, 1800, and 2200 h. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 11, 83-88.
- Larsen, T. (2012). Enzymatic-fluorometric quantification of cholesterol in bovine milk. *Food Chemistry*, 135, 1261-1267.
- Lasekan, J.B., Jacobs, J., Reisinger, K.S., Montalto, M.B., Frantz, M.P. & Blatter, M.M. (2011). Lactose-free milk protein-based infant formula: impact on growth and gastrointestinal tolerance in infants. *Clinical Pediatrics*, 50, 330-337.
- Lee, P. S., Miskell, J., Duncan, A. W., Mann, J. A. & Ludan, A. (2004). P0110 PP both human and non-human sialic acids can be found in human breast milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 39, S99.
- Leis, T.R. & Tojo S.R. (2001). Lactancia materna. Guías prácticas sobre nutrición. Alimentación en el lactante. Sociedad española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. *Anales Españoles de Pediatría*, 54, 145-147.
- Levi, C.S., Alvito, P., Andrés, A., Assunção, R., Barberá, R., Blanquet-Diot, S., Bourlieu, C., Brodkorb, A., Cilla, A., Deglaire, A., Denis, S., Dupont, D., Heredia, A., Karakaya, S., Giosafatto, C.V.L., Mariniello, L., Martins, C., Ménard, O., Nehir El, S., Vegarud, G.E., Ulleberg, E. & Lesmes, U. (2016). Extending in vitro digestion models to specific human

- populations: Perspectives, practical tools and bio-relevant information. *Trends in Food Science & Technology*. dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.017.
- Li, H. & Fan, X. (2014). Quantitative analysis of sialic acids in Chinese conventional foods by HPLC-FLD. *Open Journal of Preventive Medicine*, 4, 57-63.
- Li, C., Liu, L., Xie, H & Liu, N. (2015). Determining Neu5Ac in infant formula with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *International Journal of Dairy Technology*, 68, 166-173.
- Lin, Y. T., Wu, S. S., & Wu, H. L. (2007). Highly sensitive analysis of cholesterol and sitosterol in foods and human biosamples by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1156, 280-287.
- Liu, H.X., Adachi, I., Horikoshi, I. & Ueno, M. (1995). Mechanism of promotion of lymphatic drug absorption by milk fat globule membrane. *International Journal of Pharmaceutics*, 118, 55-64.
- Liu, D., Wang, Y., Yu, Y., Hu, J., Lu, N., Regenstein, J. M., Wang, M. & Zhou, P. (2016). Effects of enzymatic dephosphorylation on infant in vitro gastrointestinal digestibility of milk protein concentrate. *Food Chemistry*, 197, 891-899.
- Long, A.C., Kaiser, J.L. & Katz, G.E. (2013). Lipids in infant formulas: Current and future innovations. *Lipid Technology*, 25, 127-129.
- Lopes, G., Sousa, C., Bernardo, J., Andrade, P. B., Valentão, P., Ferreres, F., & Mouga, T. (2011). Sterol profiles in 18 macroalgae of the portuguese coast1. *Journal of phycology*, 47, 1210-1218.
- Lopez, C. (2011). Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16, 391-404.
- Lopez, C. & Ménard, O. (2011). Human milk fat globules: Polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83, 29-41.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Menard, O., Rousseau, F., Pradel, P. & Besle, J.M. (2008). Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5226-5236.
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., Leconte, N & Robert, B. (2011). Fat globules selected from whole milk according to their size: different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chemistry*, 125, 355-368.
- Lopez, C., Cauty, C. & Guyomarc'h, F. (2015). Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. *Dairy Science & Technology*, 95, 863-893.
- Lozoff, B., Beard, J., Connor, J., Felt, B., Georgieff, M. & Schallert, T. (2006). Long-lasting neural and behavioral effects of iron deficiency in infancy. *Nutrition Reviews*, 64, S34-S43.
- Luque, V. (2010). Nutrición temprana: efecto de la ingesta de proteínas durante los primeros meses de vida sobre el tamaño y función renales. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili. Reus, Spain.
- Ma, L., MacGibbon, A.K.H., Mohamed, H.J.B.J., Loy, S., Rowan, A., McJarrow, P. & Fong, B.Y. (2015a). Determination of ganglioside concentrations in breast milk and serum from Malaysian mothers using a high performance liquid chromatography-mass spectrometry-multiple reaction monitoring method. *International Dairy Journal*, 49, 62-71.

- Ma, L., Liu, X., MacGibbon, A.K., Rowan, A., McJarrow, P. & Fong, B.Y. (2015b). Lactational changes in concentration and distribution of ganglioside molecular species in human breast milk from Chinese mothers. *Lipids*, 50, 1145-1154.
- Macías, S.M., Rodríguez, S. & Ronayne de Ferrer, P.A. (2006). Leche materna: composición y factores condicionantes de la lactancia. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 104, 423-30.
- MacKenzie, A., Vyssotski, M., & Nekrasov, E. (2009). Quantitative analysis of dairy phospholipids by 31P NMR. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 757-763.
- Maduko, C.O. & Park, Y. W. (2007). Modification of fatty acid and sterol composition of caprine milk for use as infant formula. *International Dairy Journal*, 17, 1434-1440.
- Maldonado Lozano, J., Gil Campos, M. & Lara Villoslada, F. (2010). Nutrición del lactante. En Gil Hernández, A. (Ed.), *Tratado de Nutrición* (2ª Edición, pp. 207-226). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, S.A.
- Martin, H.M., Hancock, J.T., Salisbury, V. & Harrison R. (2004). Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infection & Immunity*, 72, 4933-4939.
- Martin, R.M., Gunnell, D. & Smith, G.D. (2005). Breastfeeding in infancy and blood pressure in later life: systematic review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, 161, 15-26.
- Martín, M.J., Vázquez, E. & Rueda, R. (2007). Application of a sensitive fluorometric HPLC assay to determine the sialic acid content of infant formulas. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 2943-2949.
- Martin, A.H. & De Jong, G.A.H. (2012). Enhancing the in vitro Fe²⁺ bio-accessibility using ascorbate and cold-set whey protein gel particles. *Dairy science & technology*, 92, 133-149.
- Martínez, O. & Suárez, M.D. (2010). Metabolismo de los hidratos de carbono. En Gil, A. & Sánchez, F. (Eds.), *Tratado de Nutrición: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición (Tomo I)* (2ª Edición, pp. 230- 231). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Martín-Sosa, S., Martín, M.J., García-Pardo, L.A. & Hueso, P. (2003). Sialyloligosaccharides in human and bovine milk and in infant formulas: variations with the progression of lactation. *Journal of Dairy Science*, 86, 52-59.
- Martín-Sosa, S., Martín, M.J., García-Pardo, L.A. & Hueso, P. (2004a). Distribution of sialic acids in the milk of Spanish mothers of full term infants during lactation. *Journal of pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 39, 499-503.
- Martín-Sosa, S., Martín, M. J., Castro, M. D., Cabezas, J. A. & Hueso, P. (2004b) Lactational changes in the fatty acid composition of human milk gangliosides. *Lipids*, 39, 111-116.
- McVeagh, P. & Miller, J.B. (1997). Human milk oligosaccharides: only the breast. *Journal of paediatrics and child health*, 33, 281-286.
- Mellies, M.J., Ishikawa, T.T., Gartside, P., Burton, K., MacGee, J., Allen, K., Steiner, P.M., Brady, D. & Glueck, C.J. (1978). Effects of varying maternal dietary cholesterol and phytosterol in lactating women and their infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 31, 1347-1354.
- Mellies, M.J., Burton, K., Larsen, R., Fixler, D. & Glueck, C.J. (1979). Cholesterol, phytosterols, and polyunsaturated/saturated fatty acid ratios during the first 12 months of lactation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 32, 2383-2389.
- Ménard, O., Cattenoz, T., Guillemin, H., Souchon, I., Deglaire, A., Dupont, D. & Picque, D. (2014). Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chemistry*, 145, 1039-1045.
- Mennella, J.A., Ventura, A.K. & Beauchamp, G.K. (2011). Differential growth patterns among healthy infants fed protein hydrolysate or cow-milk formulas. *Pediatrics*, 127, 110-118.
- Merrill, A.H. (2011). Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chemical Reviews*, 111, 6387-6422.

- Michalski, M. C., Michel, F. & Geneste, C. (2002). Appearance of submicronic particles in the milk fat globule size distribution upon mechanical treatments. *Le Lait*, 82, 193-208.
- Michalski, M.C., Briard, V., Michel, F., Tasson, F. & Poulain, P. (2005). Size distribution of fat globules in human colostrum, breast milk, and infant formula. *Journal of Dairy Science*, 88, 1927-1940.
- Miller, E.R., Parsons, M.J., Ullrey, D.E. & Ku, P.K. (1981). Bioavailability of iron from ferric choline citrate and a ferric copper cobalt choline citrate complex for young pigs. *Journal of Animal Science*, 52, 783-787.
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R. & Huisintveld, J.H.J. (1995). Multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Arla-Alternatives to Laboratory Animals*, 23, 197-209.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W. & Brodtkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Function*, 5, 1113-1124.
- Mora, N. & Rosales, C. (2009). Funciones de receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica. *Revista de Investigación Clínica*, 61, 313-326.
- Morin, P., Britten, M., Jiménez-Flores, R. & Pouliot, Y. (2007a). Microfiltration of buttermilk and washed cream buttermilk for concentration of milk fat globule membrane components. *Journal of Dairy Science*, 90, 2132-2140.
- Morin, P., Jiménez-Flores, R. & Pouliot, Y. (2007b). Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*, 17, 1179-1187.
- Motouri, M., Matsuyama, H., Yamamura, J.I., Tanaka, M., Aoe, S., Iwanaga, T. & Kawakami, H. (2003). Milk sphingomyelin accelerates enzymatic and morphological maturation of the intestine in artificially reared rats. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 36, 241-247.
- Moughan, P.J., Leenaars, M. & Schuttetr, G. (1992). Endogenous amino acid flow in the stomach and small intestine of the young growing pig. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, 437-442.
- Muraro, A., Dreborg, S., Halken, S., Høst, A., Niggemann, B., Aalberse, R., Arshad, S.H., von Berg, A., Carlsen, K-H., Karel Duschén, Eigenmann, P., Hill, D., Jones, C., Mellon, M., Oldeus, G., Oranje, A., Pascual, C., Prescott, S., Sampson, H., Svartengren, M., Vandenplas, Y., Wahn, U., Warner, J.A., Warner, J.O., Wickman, M. & Zeiger, R.S. (2004). Dietary prevention of allergic diseases in infants and small children. *Pediatric Allergy and Immunology*, 15, 291-307.
- Nakano, T., Sugawara, M. & Kawakami, H. (2001). Sialic acid in human milk: composition and functions. *Acta Paediatrica Taiwanica*, 42, 11-17.
- Nakata, D. & Troy, F.A. (2005). Degree of polymerization (DP) of polysialic acid (polySia) on neural cell adhesion molecules (NCAMS): development and application of a new strategy to accurately determine de DP of polySia chains on N-CAMS. *Journal of Biological Chemistry*, 208, 38305-38316.
- Narasinga, B.S. & Prabhavathi, T. (1978). An *in vitro* method for predicting the bioavailability of iron from foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 31, 169-175.
- Narbona, E., Sierra, P. & Contreras, F. (2005). Nutrición del recién nacido a término. En Gil, A., Camarero, E., Culebras, J.M., González, J. & León, M. (Eds.), *Tratado de Nutrición*

- (TomóIII): *Nutrición Humana en el Estado de Salud* (pp. 253- 272). Barcelona: Grupo Acción Médica.
- Neeser, J.R., Golliard, M. & Del Vedovo S. (1991). Quantitative determination of complex carbohydrates in bovine milk and in milk-based infant formulas. *Journal of Dairy Science*, *74*, 2860-2871.
- Nes, W.D. & Nichols, S.D. (2006). Phytosterol biosynthesis pathway in *Mortierella alpina*. *Phytochemistry*, *67*, 1716-1721.
- Neville, M. C., Keller, R., Seacat, J., Lutes, V., Neifert, M., Casey, C., Allen, J. & Archer, P. (1988). Studies in human lactation: milk volumes in lactating women during the onset of lactation and full lactation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *48*, 1375-1386.
- Newburg, D.S., Peterson, J.A., Ruiz-Palacios, G.M., Matson, D.O., Morrow, A.L., Shults, J., Guerrero, M.L., Chaturvedi, P., Newburga, S.O., Scallan, C.D., Taylor, M.R., Ceriani, R.L., Pickering, L.K. & Taylor, M.R. (1998). Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *The Lancet*, *351*, 1160-1164.
- Newburg, D.S. (1999). Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Current Medical Chemistry*, *6*, 117-127.
- Newburg, D.S. (2000). Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *30*, S8-S17.
- Nguyen, T.T., Bhandari, B., Cichero, J. & Prakash, S. (2015). A comprehensive review on in vitro digestion of infant formula. *Food Research International*, *76*, 373-386.
- Nielsen, S.B., Reilly, J.J., Fewtrell, M.S., Eaton, S., Grinham, J. & Wells, J.C.K. (2011). Adequacy of milk intake during exclusive breastfeeding: A longitudinal study. *Pediatrics*, *128*, e907-e914.
- Nilsson, A. & Duan, R.D. (2006). Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. *Journal of Lipid Research*, *47*, 154-171.
- Nimmerjahn, F., Anthony, R.M. & Ravetch, J.V. (2007). Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*, 8433-8437.
- Nöhle, U. & Schauer, R. (1981). Uptake, metabolism and excretion of orally and intravenously administered, ¹⁴C- and ³H labeled N-acetylneuraminic acid mixture in the mouse and rat. *Hoppe Seylers Z. Physiological Chemistry*, *362*, 1495-506.
- Nöhle, U. & Schauer, R. (1984). Metabolism of sialic acids from exogenously administered sialyllactose and mucin in mouse and rat. *Hoppe Seylers Z. Physiological Chemistry*, *365*, 1457-1467.
- Ochonicky, K.L., Donovan, S.M., Kuhlenschmidt, T.B., Jiménez-Flores, R. & Kuhlenschmidt, M.S. (2005). Inhibitory activity of bovine milk fat globule membranes against sialic acid-dependent and independent strains of rotavirus. *Paper presented at the ADSA/ASAS/CSAS Joint Annual Meeting*, Cincinnati, OH, USA.
- Oh, H.I., Shin, T.S. & Chang, E.J. (2001). Determination of cholesterol in milk and dairy products by high-performance liquid chromatography. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *14*, 1465-1469.
- Ohlsson, L., Hertervig, E., Jönsson, B. A., Duan, R. D., Nyberg, L., Svernlöv, R. & Nilsson, Å. (2010). Sphingolipids in human ileostomy content after meals containing milk sphingomyelin. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *91*, 672-678.
- Oles, P., Gates, G., Kensinger, S., Patchell, J., Schumacher, D., Showers, T. & Silcox, A. (1990). Optimization of the determination of cholesterol in various food matrixes. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, *73*, 724-728.
- Oleynik, A., Eliseeva, T. & Vanderhoek, J.Y. (2013). Comparative lipid profiles of milk bank breast milk and infant formulas. *The Open Nutrition Journal*, *7*, 26-31.

- Olmedilla-Alonso, B. & Granado-Lorencio, F. (2008). Componentes bioactivos. En Dirección general de salud pública y alimentación (Ed.), *Alimentos Funcionales. Aproximación a una Nueva Alimentación* (pp. 170-193). Madrid: Instituto de Nutrición y Trastornos Alimentarios.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). Centro de prensa. (2013). Diarrhoeal disease. *Nota descriptiva N° 330*. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>. Consultado en marzo 2016.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). Centro de prensa. (2016). Alimentación del lactante y del niño pequeño. *Nota descriptiva N° 342*. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs342/es/>. Consultado en marzo 2016.
- Ong, E., Nakayama, J., Angata, K., Reyes, L. & Katsuyama, T. (1998). Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. *Glycobiology*, 8, 415-424.
- Ontsouka, E.C. & Albrecht, C. (2014). Cholesterol transport and regulation in the mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 19, 43-58.
- Ostlund Jr, R.E. (2002). Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 22, 533-549.
- Oumesmar, B.N., Vignais, L., Duhamel-Clerin, E., Avellana-Adalid, V., Rougon, G. & Evercooren, A. (1995). Expression of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule during postnatal myelination and following chemically induced demyelination of the adult mouse spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 7, 480-491.
- Owen, C.G., Whincup, P.H., Odoki, K., Gilg, J.A. & Cook, D.G. (2002). Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics*, 110, 597-608.
- Owen, C.G., Whincup, P.H., Gilg, J.A. & Cook, D.G. (2003). Effect of breast feeding in infancy on blood pressure in later life: systematic review and meta-analysis. *British Medical Journal*, 327, 1189-1195.
- Owen, C.G., Whincup, P.H., Kaye, S.J., Martin, R.M., Smith, G.D., Cook, D.G., Bergstrom, E., Black, S., Wadsworth, M.E., Fall, C.H., Freudenheim, J.L., Nie, J., Huxley, R.R., Kolacek, S., Leeson, C.P., Pearce, M.S., Raitakari, O.T., Lisinen, I., Viikari, J.S., Ravelli, A.C., Rudnicka, A.R., Strachan, D.P. & Williams, S.M. (2008). Does initial breastfeeding lead to lower blood cholesterol in adult life? A quantitative review of the evidence. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88, 305-314.
- Palmano, K., Rowan, A., Guillermo, R., Guan, J. & McJarrow, P. (2015). The role of gangliosides in neurodevelopment. *Nutrients*, 7, 3891-3913.
- Pan, L. & Izumi, T. (1999). Chronological changes in the ganglioside composition of human milk during lactation. *Early Human Development*, 55, 1-8.
- Pan, X.L. & Izumi, T. (2000). Variation of the ganglioside compositions of human milk, cow's milk and infant formulas. *Early Human Development*, 57, 25-31.
- Park, E.J., Suh, M., Thomson, B., Ma, D.W., Ramanujam, K., Thomson, A.B. & Clandinin, M.T. (2007). Dietary ganglioside inhibits acute inflammatory signals in intestinal mucosa and blood induced by systemic inflammation of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Shock*, 28, 112-117.
- Park, E.J., Thomson, A.B. & Clandinin, M.T. (2010). Protection of intestinal occluding tight junction protein by dietary gangliosides in lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 50, 321-328.
- Pavón, P., Parra, I., Aparicio, M. & Arroba, M.L. (2007). Alimentación en el lactante sano. En Muñoz, M.T. & Suárez, L (Eds.), *Manual práctico de Nutrición en Pediatría* (1ª edición, pp. 42-60). Madrid, España: Ergon. Disponible en: <http://www.enfermeriaaps.com/portal/wp-content/uploads/2011/09/Manual-Practico-de-Nutricion-Pediatrica-AEP-2007.pdf#page=57>. Consultado en enero 2016.

- Pettus, B.J., Bielawska, A., Subramanian, P., Wijesinghe, D.S., Maceyka, M., Leslie, C.C., Evans, J.H., Freiberg, J., Roddy, P., Hannun, Y.A. & Chalfant, C.E. (2004). Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 11320-11326.
- Pfrieger, F.W. (2003). Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60, 1158-1171.
- Piironen, V., Toivo, J. & Lampi, A.M. (2002). New data for cholesterol contents in meat, fish, milk, eggs and their products consumed in Finland. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 705-713.
- Piper, D.W. & Fenton, B.H. (1965). pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut*, 6, 506-508.
- Pita, M.L., Morales, J., Sánchez-Pozo, A., Martínez-Valverde, J.A. & Gil, A. (1985). Influence of the mother's weight and socioeconomic status on the fatty acid composition of human milk. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 29, 366-373.
- Potter, J.M. & Nestel, P. (1976). The effects of dietary fatty acids and cholesterol on the milk lipids of lactating women and the plasma cholesterol of breast-fed infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 29, 54-60.
- Qiao, Y., Feng, J., Yang, J. & Gu, G. (2013). The relationship between dietary vitamin A intake and the levels of sialic acid in the breast milk of lactating women. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 59, 347-351.
- Rahmann, H. (1995). Brain gangliosides and memory formation. *Behavioural Brain Research*, 66, 105-116.
- Ramvalho, H.M.M., Casal, S. & Oliveira, M.B.P.P. (2011). Total cholesterol and desmosterol contents in raw, UHT, infant formula powder and human milks determined by a new fast micro-HPLC method. *Food Analytical Methods*, 4, 424-430.
- RD 867/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación. *BOE núm. 131*, 25121-25137.
- RD 165/2014, de 14 de marzo, por el que se modifica el Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación. *BOE núm. 64*, 23266-23269.
- Reglamento (CE) nº 109/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de enero, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 1924/2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 39, 14-15.
- Reglamento (UE) nº 440/2011 de la Comisión de 6 de mayo de 2011 sobre la autorización y la denegación de autorización de determinadas declaraciones de propiedades saludables en los alimentos relativas al desarrollo y la salud de los niños. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 119, 4-9.
- Reglamento Delegado (UE) 2016/127 de la Comisión, de 25 de septiembre de 2015, que complementa el Reglamento (UE) nº 609/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a los requisitos específicos de composición e información aplicables a los preparados para lactantes y preparados de continuación, así como a los requisitos de información sobre los alimentos destinados a los lactantes y niños de corta edad. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 25, 1-29.
- Reilly, J.J., Ashworth, S. & Wells, J.C.K. (2005). Metabolisable energy consumption in the exclusively breast-fed infant aged 36 months from the developed world: a systematic review. *British Journal of Nutrition*, 94, 56-63.
- Riccio, P. (2004). The proteins of the milk fat globule membrane in the balance. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 458-461.

- Rodríguez-Alcalá, L.M. & Fontecha, J. (2010). Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction. *Journal of Chromatography A*, *1217*, 3063-3066.
- Rojas, V.E., Valbuena, C.E., Torres, F.G., García, H.A., Piñero, G.M. & Galindo, A.L.M. (2009). Aislamiento y rendimiento del GMP mediante precipitación de lactosuero con ácido tricloroacético. *Revista Científica*, *19*, 295-302.
- Rombaut, R., Camp, J.V. & Dewettinck, K. (2005). Analysis of phospho- and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method. *Journal of Dairy Science*, *88*, 482-488.
- Rombaut, R., Camp, J.V. & Dewettinck, K. (2006). Phospho- and sphingolipid distribution during processing of milk, butter and whey. *International Journal of Food Science & Technology*, *41*, 435-443.
- Rombaut, R. & Dewettinck, K. (2006). Properties, analysis and purification of milk polar lipids. *International Dairy Journal*, *16*, 1362-1373.
- Rosenberg, M. (2007). Global child health: burden of disease, achievements, and future challenges. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, *37*, 338-362.
- Ross, S.A., Lane, J.A., Kilcoyne, M., Joshi, L. & Hickey, R. M. (2015). The milk fat globule membrane: A potential source of health-promoting glycans. In Gupta, V.K., Tuohy, M.G., Lohani, M. & O'Donovan, A. (Ed.), *Biotechnology of bioactive compounds: Sources and applications* (pp. 631-668). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Rozner, S. & Garti, N. (2006). The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *282*, 435-456.
- Rueda, R., Puente, R., Hueso, P., Maldonado, J. & Gil, A. (1995). New data on content and distribution of gangliosides in human milk. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, *376*, 723-728.
- Rueda, R., Maldonado, J., Narbona, E. & Gil, A. (1998a). Neonatal dietary gangliosides. *Early Human Development*, *53*, S135-S147.
- Rueda, R., Sabatel, J.L., Maldonado, J., Molina-Font, J.A. & Gil, A. (1998b). Addition of gangliosides to an adapted milk formula modifies levels of fecal microflora in preterm newborn infants. *Journal of Paediatrics*, *133*, 90-94.
- Rueda, R., Gómez-León, C. & Gil, A. (2002). Ribonucleic acid hydrolysis by intestinal explants of neonatal piglets. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *35*, 685-690.
- Rueda, R. (2007). The role of dietary gangliosides on immunity and the prevention of infection. *British Journal of Nutrition*, *98*, S68-S73.
- Rueda, R. (2014). The role of complex lipids in attaining metabolic health. *Current Cardiovascular Risk Reports*, *8*, 371-379.
- Russo, M., Cichello, F., Ragonese, C., Donato, P., Cacciola, F., Dugo, P. & Mondello, L. (2013). Profiling and quantifying polar lipids in milk by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering and mass spectrometry detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *405*, 4617-4626.
- Sabharwal, H., Sjoblad, S. & Lundblad, A. (1991). Sialylated oligosaccharides in human milk and feces of preterm, full-term, and weaning infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *12*, 480-484.
- Sacchetti, P., Sousa, K.M., Hall, A.C., Liste, I., Steffensen, K.R., Theofilopoulos, S., Parish, C.L., Hazenberg, C., Richter, L.Ä., Hovatta, O., Gustafsson, J.Ä. & Ernest, A. (2009). Liver X receptors and oxysterols promote ventral midbrain neurogenesis in vivo and in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, *5*, 409-419.

- Sakai, K., Yoshino, K., Satter, M.A., OTA, F., Nii, Y., Fukuta, K., Ueda, N., Shimizu, Y. & Yamamoto, S. (2000). Effects of pH variation and NaCl on in vitro digestibility of cow's milk proteins in commercially available infant formulas. *Journal of nutritional science and vitaminology*, *46*, 325-328.
- Sala-Vila, A., Castellote-Bargalló, A.I., Rodríguez-Palmero-Seuma, M. & López-Sabater, M.C. (2003). High-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for determination of phospholipid classes in human milk, infant formulas and phospholipid sources of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of Chromatography A*, *1008*, 73-80.
- Sala-Vila, A., Castellote, A.I., Rodríguez-Palmero, M., Campoy, C. & López-Sabater, M.C. (2005). Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): Changes during lactation. *Nutrition*, *21*, 467-473.
- Salcedo, J., Lacomba, R., Alegía, A., Barberá, R. Matencio, E. & Lagarda, M.J. (2011). Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determining sialic acid in infant formulas. *Food Chemistry*, *127*, 1905-1910.
- Salcedo, J., Barbera, R., Matencio, E., Alegría, A. & Lagarda, M.J. (2013). Gangliosides and sialic acid effects upon newborn pathogenic bacteria adhesion: an in vitro study. *Food Chemistry*, *136*, 726-734.
- Salcedo, J., Gormaz, M., López-Mendoza, M. C., Nogarotto, E. & Silvestre, D. (2015). Human Milk Bactericidal Properties: Effect of Lyophilization and Relation to Maternal Factors and Milk Components. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *60*, 527-532.
- Salvini, F., Riva, E., Salvatici, E., Boehm, G., Jelinek, J., Banderali, G. & Giovannini, M. (2011). A specific prebiotic mixture added to starting infant formula has long-lasting bifidogenic effects. *The Journal of Nutrition*, *141*, 1335-1339.
- Sánchez-Díaz, A., Ruano, M. J., Lorente, F. & Hueso, P. (1997). A critical analysis of total sialic acid and sialoglycoconjugate contents of bovine milk-based infant formulas. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *24*, 405-410.
- Sánchez-Juanes, F., Alonso, J. M., Zancada, L. & Hueso, P. (2009a). Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*, *19*, 273-278.
- Sánchez-Juanes, F., Alonso, J.M., Zancada, L. & Hueso, P. (2009b). Glycosphingolipids from bovine milk and milk fat globule membranes: a comparative study. Adhesion to enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Biological Chemistry*, *390*, 31-40.
- Sandström, O., Lönnerdal, B., Graverholt, G. & Hernell, O. (2008). Effects of α -lactalbumin-enriched formula containing different concentrations of glycomacropeptide on infant nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *87*, 921-928.
- Santos R., Limas E., Sousa M., Castilho M., Ramos F. & Noronha de Silveira M.I. (2007). Optimization of analytical procedures for GC-MS determination of phytosterols and phytosteranols in enriched milk and yogurt. *Food Chemistry*, *102*, 113-117.
- Schauer, R., Srinivasan, G. V., Wipfler, D., Kniep, B. & Schwartz-Albiez, R. (2011). O-Acetylated sialic acids and their role in immune defense. En: Wu, A.M. (Ed.), *The molecular immunology of complex carbohydrates-3* (pp. 525-548). Unites States: Springer.
- Schlamowitz, M. & Peterson, L.U. (1959). Studies on the optimum pH for the action of pepsin on "native" and denatured bovine serum albumin and bovine hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, *234*, 3137-3145.
- Schnabl, K.L., Larsen, B., Van Aerde, J.E., Lees, G., Evans, M., Belosevic, M., Field, C., Thomson, A.B.R. & Clandinin, M. T. (2009). Gangliosides protect bowel in an infant model of necrotizing enterocolitis by suppressing proinflammatory signals. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *49*, 382-392.

- Scholtz, S.A., Gottipati, B.S., Gajewski, B.J. & Carlson, S.E. (2013). Dietary sialic acid and cholesterol influence cortical composition in developing rats. *The Journal of Nutrition*, *143*, 132-135.
- Schröder, C., Nöhle, U., Shukula, A.K. & Schauer, R. (1983). Improved methods for the isolation and structural analysis of trace amounts of new sialic acids – identification of N-glycolylneuraminic acid in man. En *Proceedings of the 7th international symposium on Glycoconjugates, Lund-Roneby*, 162-163.
- Schroten, H., Hanisch, F.G., Plogmann, R., Hacker, J., Uhlenbruck, G., Nobis-Bosch, R. & Wahn, V. (1992). Inhibition of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction. *Infection and Immunity*, *60*, 2893-2899.
- Schroten, H., Plogmann, R., Hanisch, F.G., Hacker, J., Nobis-Bosch, R. & Wahn, V. (1993). Inhibition of adhesion of S-fimbriated *E. coli* to buccal epithelial cells by human skim milk is predominantly mediated by mucins and depends on the period of lactation. *Acta Paediatrica*, *82*, 6-11.
- Scopesi, F., Zunin, P., Mazzella, M., Testa, M., Boggia, R., Evangelisti, F. & Serra, G. (2002). 7-Ketocholesterol in human and adapted milk formulas. *Clinical Nutrition*, *21*, 379-384.
- Séverin, S. & Wenshui, X. (2005). Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, *45*, 645-656.
- Shellhorn, C. & Valdés, V. (1995). La leche humana, composición, beneficios y comparación con la leche de vaca. *Manual de Lactancia para Profesionales de la Salud. Comisión de Lactancia MINSAL, UNICEF. Chile*.
- Shoji, H., Shimizu, T., Kaneko, N., Shino-Hara, K., Shiga, S., Saito, M., Oshida, K., Shimizu, T., Takase, M. & Yamashiro, Y. (2006). Comparison of the phospholipid classes in human milk in Japanese mothers of term and preterm infants. *Acta Paediatrica*, *96*, 996-1000.
- Singhal, A., Farooqi, I.S., O'Rahilly, S., Cole, T.J., Fewtrell, M. & Lucas, A. (2002). Early nutrition and leptin concentrations in later life. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *75*, 993-999.
- Smit, E.N., Martini, I.A., Mulder, H., Boersma, E.R. & Muskiet, F.A.J. (2002). Estimated biological variation of the mature human milk fatty acid composition. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *66*, 549-555.
- Smoczyński, M., Staniewski, B. & Kielczewska, K. (2012). Composition and structure of the bovine milk fat globule membrane-some nutritional and technological implications. *Food Reviews International*, *28*, 188-202.
- Sodini, I., Morin, P., Olabi, A. & Jiménez-Flores, R. (2006). Compositional and functional properties of buttermilk: A comparison between sweet, sour, and whey buttermilk. *Journal of Dairy Science*, *89*, 525-536.
- Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V. & Prinetti, A. (2006). Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*, *17*, 1R-13R.
- Sørensen, L.K. (2006). A liquid chromatography/tandem mass spectrometric approach for the determination of gangliosides GD3 and GM3 in bovine milk and infant formulae. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, *20*, 625-6633.
- Sørensen, L.K. (2010). Determination of sialic acids in infant formula by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, *24*, 1208-1212.
- Souchet, N. & Laplante, S. (2007). Seasonal and geographical variations of sterol composition in snow crab hepatopancreas and pelagic fish viscera from Eastern Quebec. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *147*, 378-386.
- Spichtig, V., Michaud, J. & Austin, S. (2010). Determination of sialic acids in milks and milk-based products. *Analytical Biochemistry*, *405*, 28-40.

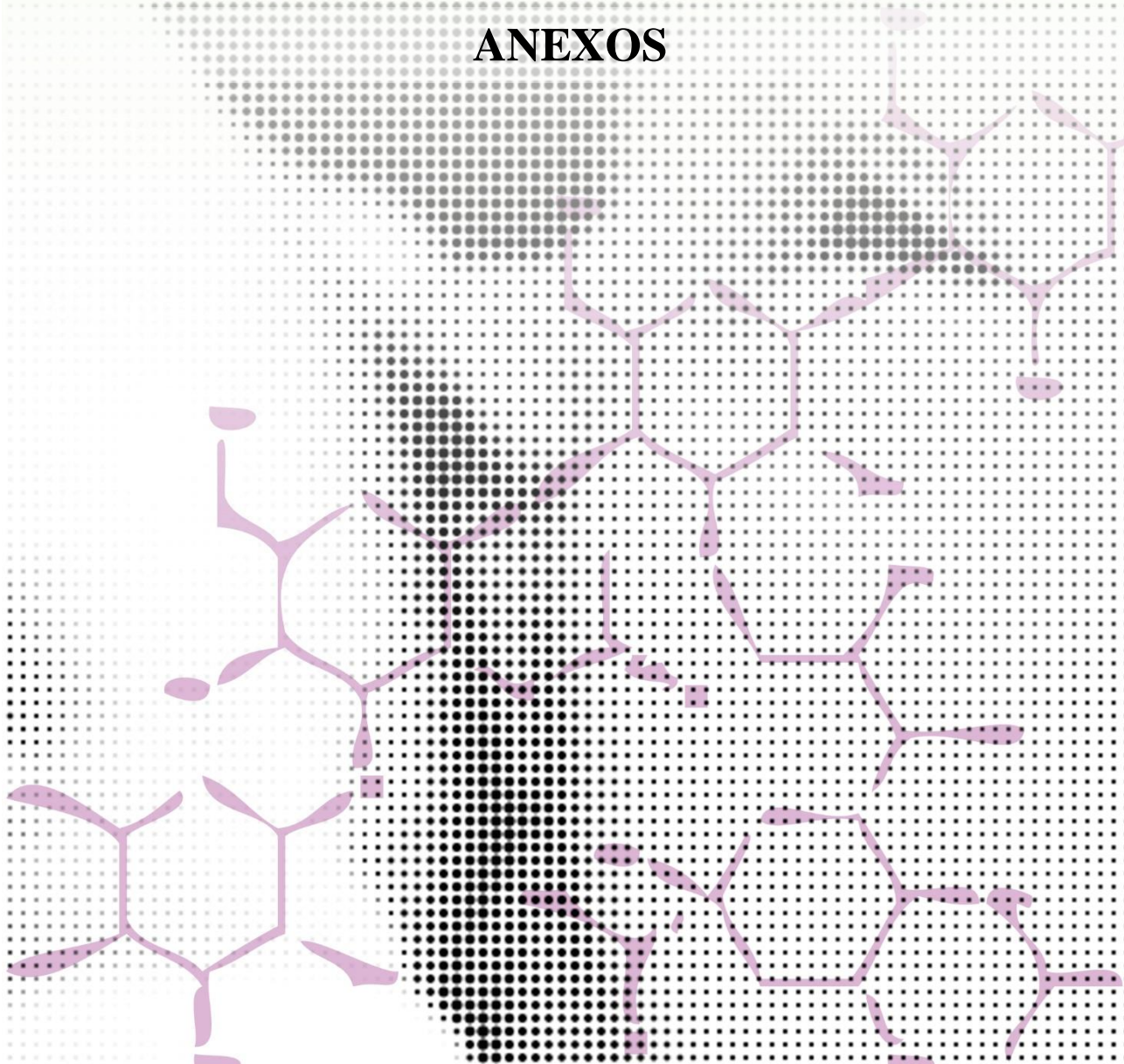
- Spitsberg, V.L. (2005). Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of dairy science*, 88, 2289-2294.
- Sprong, R.C., Hulstein, M.F. & Van der Meer, R. (2001). Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 1298-1301.
- Svennerholm, L. (1958). Quantitative estimation of sialic acids III. An anion exchange resin method. *Acta Chemica Scandinavica*, 12, 547-554.
- Svennerholm, L. (1963). Chromatographic separation of human brain gangliosides. *Journal of Neurochemistry*, 10, 613-623.
- Sweeley C.C., Bentley R., Makita M. & Wells W.W. (1963). Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 2497-2507.
- Takamizawa, K., Iwamori, M., Mutai, M. & Nagai, Y. (1986). Selective changes in gangliosides of human milk during lactation: a molecular indication for the period of lactation. *Biochimica et Biophysica Acta- Lipids and Metabolism*, 879, 73-77.
- Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A. & Muchmore, E. (2003). Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 12045-12050.
- Tettamanti, G. (2004). Ganglioside/glycosphingolipid turnover: New concepts. *Glycoconjugates Journal*, 20, 301-317.
- Thakkar, S.K., Giuffrida, F., Cruz-Hernandez, C., De castro, C.A., Mukherjee, R., Tran, L-A., Steenhout, P. Lee, L.Y. & Destailats, F. (2013). Dynamics of human milk nutrient composition of women from Singapore with a special focus on lipids. *American Journal of Human Biology*, 25, 770-779.
- Timby, N., Domellöf, E., Hernell, O., Lönnerdal, B. & Domellöf, M. (2014). Neurodevelopment, nutrition, and growth until 12 mo of age in infants fed a low-energy, low-protein formula supplemented with bovine milk fat globule membranes: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99, 860-868.
- Timby, N., Hernell, O., Vaarala, O., Melin, M., Lönnerdal, B. & Domellöf, M. (2015). Infections in infants fed formula supplemented with bovine milk fat globule membranes. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 60, 384-389.
- Toca, M.D.C., Tonietti, M. & Vecchiarelli, C. (2015). Nutrición pre y posnatal: impacto a largo plazo en la salud. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 113, 254-259.
- Tram, T.H., Brand-Miller, J.C., McNeil, Y. & McVeagh, P. (1997). Sialic acid content of infant saliva: comparison of breast fed with formula fed infants. *Archives of Disease in Childhood*, 77, 315-318.
- Tzanakakis, G.N., Syrokou, A., Kanakis, I. & Karamanos, N. (2006). Determination and distribution of N-Acetyl- and N-Glycolylneuraminic acids in culture media and cell-associated glycoconjugates from human malignant mesothelioma and adenocarcinoma cells. *Biomedical Chromatography*, 20, 434-439.
- Uauy, R. & Hoffman, D.R. (1991). Essential fatty acid requirements for normal eye and brain development. *Seminars in Perinatology*, 15, 449-55.
- Uauy, R., Mize, C. E. & Castillo-Duran, C. (2000). Fat intake during childhood: metabolic responses and effects on growth. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 1354s-1360s.
- Uchiyama, S.I., Sekiguchi, K., Akaishi, M., Anan, A., Maeda, T. & Izumi, T. (2011). Characterization and chronological changes of preterm human milk gangliosides. *Nutrition*, 27, 998-1001.
- Van Beusekom, C.M., Martini, I.A., Rutgers, H.M., Boersma, E.R. & Muskiet, F.A.J. (1990). A carbohydrate-rich diet not only leads to incorporation of medium-chain fatty acids (6:0-14:0)

- in milk triglycerides but also in each milk-phospholipid subclass. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 52, 326-334.
- Van Biervliet, J.P., Vinaimont, N., Vercaemst, R. & Rosseneu, M. (1992). Serum cholesterol, cholesteryl ester, and high-density lipoprotein development in newborn infants: Response to formulas supplemented with cholesterol and γ -linolenic acid. *The Journal of Pediatrics*, 120, S101-S108.
- Van Campen, D.R. & Glahn, R.P. (1999). Micronutrient bioavailability techniques: accuracy, problems and limitations. *Field Crops Research*, 60, 93-113.
- Van Hooijdonk, A.C., Kussendrager, K.D. & Steijns, J.M. (2000). In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *British Journal of Nutrition*, 84, 127-134.
- Vance, D.E. (2002). Chapter 8-Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. En Vance, D.E. & Vance, J.E. (Eds.), *Biochemistry of lipids. Lipoproteins and membranes* (5th edition, pp. 213-216). San Diego: Elsevier Science B.V.
- Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C. & Blecker, C. (2010). Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14, 485-500.
- Varki, A. (2001). N-glycolylneuraminic acid deficiency in humans. *Biochimie*, 83, 615-622.
- Varki, A. (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 14, 351-360.
- Veereman-Wauters, G., Staelens, S., Rombaut, R., Dewettinck, K., Deboutte, D., Brummer, R. J., Boone, M. & Le Ruyet, P. (2012). Milk fat globule membrane (INPULSE) enriched formula milk decreases febrile episodes and may improve behavioral regulation in young children. *Nutrition*, 28, 749-752.
- Versantvoort, C.H., Oomen, A.G., Van de Kamp, E., Rempelberg, C.J. & Sips, A.J. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 31-40.
- Vesper, H., Schmelz, E.V., Nikolova-Karakashian, M.N., Dillehay, D.L., Lynch, D.V. & Merrill Jr, A.H. (1999). Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *The Journal of Nutrition*, 129, 1239-1250.
- Vestman, N.R., Timby, N., Holgerson, P.L., Kressirer, C.A., Claesson, R., Domellöf, M., Öhman, C., Tanner, A.C.R., Hernell, O. & Johansson, I. (2013). Characterization and in vitro properties of oral lactobacilli in breastfed infants. *BMC Microbiology*, 13, 193-204.
- Vias, A. & Schnaar, R. (2001). Brain gangliosides: functional ligands for myelin stability and control of nerve regeneration. *Biochimie*, 83, 677-682.
- Vituro, E., Meyer, H.H., Gissel, C. & Kaske, M. (2010). Rapid method for cholesterol analysis in bovine milk and options for applications. *Journal of Dairy Research*, 77, 85-89.
- Wada, Y. & Lönnerdal, B. (2015). Bioactive peptides released from in vitro digestion of human milk with or without pasteurization. *Pediatric research*, 77, 546-553.
- Walker, A. (2010). Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *The Journal of Pediatrics*, 156, S3-S7.
- Wang, B. (2009). Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annual Review of Nutrition*, 29, 177-222.
- Wang, B. & Brand-Miller, J. (2003). The role and potential of sialic acid in human nutrition, *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 1351-1369.
- Wang, B., Brand-Miller, J., McVeagh, P. & Petocz P. (2001). Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 510-515.

- Wang, B., McVeagh, P., Petocz, P. & Brand-Miller, J. (2003). Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants. *The American journal of clinical nutrition*, 78, 1024-1029.
- Wang, B., Downing, J.A., Petocz, P., Brand-Miller, J. & Bryden, W.L. (2007a). Metabolic fate of intravenously administered Nacetylneuraminic acid-⁶⁻¹⁴C in newborn piglets. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 110–15.
- Wang, B., Yu, B., Karim, M., Hu, H., Sun, Y., McGreevy, P., Petocz, P., Held, S. & Brand-Miller, J. (2007b). Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets. *The American journal of clinical nutrition*, 85, 561-569.
- Wang, L., Shimizu, Y., Kaneko, S., Hanaka, S., Abe, T., Shimasaki, H., Hisaki, H. & Nakajima, H. (2000). Comparison of the fatty acid composition of total lipids and phospholipids in breast milk from Japanese women. *Pediatrics International*, 42, 14-20.
- Wang, L., Chen, W., Feng, Y., Ren, Y., Gu, Z., Chen, H., Wang, H., Thomas, M.J., Zhang, B., Berquin, I.M., Li, Y., Wu, J., Zhang, H., Song, Y., Liu, X., Norris, J.S., Wang, S., Du, P., Shen, J., Wang, N., Yang, Y., Wang, W., Feng, L., Ratledge, C., Zhang, H. & Chen, Y.Q. (2011). Genome characterization of the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. *PLoS one*, 6, e28319.
- Weizman, Z. & Alsheikh, A. (2006). Safety and tolerance of a probiotic formula in early infancy comparing two probiotic agents: a pilot study. *Journal of the American College of Nutrition*, 25, 415-419.
- Wells, J.C., Jonsdottir, O.H., Hibberd, P.L., Fewtrell, M.S., Thorsdottir, I., Eaton, S., Lucas, A., Gunnlaugsson, G. & Kleinman, R.E. (2012). Randomized controlled trial of 4 compared with 6 mo of exclusive breastfeeding in Iceland: Differences in breast-milk intake by stable isotope probe. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96, 73-79.
- Wienk, K.J.H., Marx, J.J.M. & Beynen, A.C. (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. *European Journal of Nutrition*, 38, 51-75.
- Wolters, M.G., Schreuder, H.A., Van den Heuvel, G., Van Lonkhuijsen, H.J., Hermus, R.J. & Voragen, A.G. (1993). A continuous in vitro method for estimation of the bioavailability of minerals and trace elements in foods: application to breads varying in phytic acid content. *British Journal of Nutrition*, 69, 849-861.
- Wong, W.W., Hachey, D.L., Insull, W., Opekun, A.R. & Klein, P.D. (1993). Effect of dietary cholesterol on cholesterol synthesis in breast-fed and formula-fed infants. *Journal of Lipid Research*, 34, 1403-1411.
- Xu, X.H., Li, R.K., Chen, J., Chen, P., Ling, X.Y. & Rao, P.F. (2002). Quantification of cholesterol in foods using non-aqueous capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 768, 369-373.
- Xu, X.Z., & Zhu, T.C. (2005). Effect of ganglioside in repairing the neurological function of children with cerebral palsy: analysis of the curative efficacy in 2230 cases. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 9, 122-123.
- Yao, Y., Zhao, G., Zou, X., Huang, L. & Wang, X. (2015). Microstructural and lipid composition changes in milk fat globules during milk powder manufacture. *RSC Advances*, 5, 62638-62646.
- Yao, Y., Zhao, G., Yan, Y., Mu, H., Jin, Q., Zou, X. & Wang, X. (2016a). Milk fat globules by confocal Raman microscopy: Differences in human, bovine and caprine milk. *Food Research International*, 80, 61-69.
- Yao, Y., Zhao, G., Yan, Y., Chen, C., Sun, C., Zou, X., Jin, Q. & Wang, X. (2016b). Effects of freeze drying and spray drying on the microstructure and composition of milk fat globules. *RSC Advances*, 6, 2520-2529.

- Yao, Y., Zhao, G., Xiang, J., Zou, X., Jin, Q. & Wang, X. (2016c). Lipid composition and structural characteristics of bovine, caprine and human milk fat globules. *International Dairy Journal*, *56*, 64-73.
- Yolken, R.H., Peterson, J.A., Vonderfecht, S.L., Fouts, E.T., Midthun, K. & Newburg, D.S. (1992). Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *Journal of Clinical Investigation*, *90*, 1984.
- Zancada, L. (2008). Estudio del contenido de oligosacáridos, glicolípidos y fosfolípidos de la leche de oveja. Participación en la defensa del recién nacido frente a infecciones. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. Salamanca. España
- Zavaleta, N., Kvistgaard, A. S., Graverholt, G., Respicio, G., Guija, H., Valencia, N. & Lönnerdal, B. (2011). Efficacy of an MFGM-enriched complementary food in diarrhea, anemia, and micronutrient status in infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *53*, 561-568.
- Zeisel, S.H., Char, D. & Sheard, N.F. (1986). Choline, phosphatidylcholine and sphingomyelin in human and bovine milk and infant formulas. *Journal Nutrition*, *116*, 50-58.
- Zhang, J., Ren, Y., Huang, B., Tao, B., Ransborg Pedersen, M. & Li, D. (2012). Determination of disialoganglioside GD3 and monosialoganglioside GM3 in infant formulas and whey protein concentrates by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, *35*, 937-946.
- Zilliken, F., Braun, G.A., Gyorgy, P. (1955). Gynaminic acid. A naturally occurring from a neuraminic acid in human milk. *Archives of Biochemistry. Biophysics*, *54*, 567-570.
- Zou, X., Guo, Z., Huang, J., Jin, Q., Cheong, L., Wang, X. & Xu, X. (2012). Human milk fat globules from different stages of lactation: a lipid composition analysis and microstructure characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 7158-7167.
- Zunin, P., Calcagno, C. & Evangelisti, F. (1998). Sterol oxidation in infant milk formulas and milk cereals. *Journal of Dairy Research*, *65*, 591-598.

ANEXOS



ANEXO I-Composición de los preparados para lactantes (RD 165/2014 y Reglamento Delegado 2016/127)

		RD 165/2014	Reglamento 2016/127*
Energía (kcal/100ml)		60-70	60-70
Proteínas (g/100kcal)	Leche vaca o cabra	1,8-3,0	1,8-2,5
	Hidrolizados	1,8-3,0	1,86-2,8
	Soja con o sin leche vaca o cabra	2,25-3,0	2,25-2,8
Aminoácidos (mg/100kcal)	Taurina	máx. 12	máx. 12
	Colina	7-50	25-50
Grasas (g/100kcal)		4,4-6,0	4,4-6
	Laurico y mirístico (% ctmg)	máx. 20	-
	Trans (% ctmg)	máx. 3	máx. 3
	Erúcido (% ctmg)	máx. 1	máx. 1
	Linoléico (mg/100kcal)	300-1200	500-1200
	α -linolénico (mg/100kcal)	mín. 50	50-100
	Linoleico: α - linolénico	5-15	-
	PCL n-3 (% ctmg)	máx. 1	-
	PCL n-6 (% ctmg)	máx. 2	máx. 1
	Fosfolípidos (g/L)	máx 2	máx 2
Hidratos de Carbono (g/100kcal)		9-14	9-14
	Lactosa (g/100kcal)	mín. 4,5	mín. 4,5
	Sacarosa, fructosa, miel (% ctmc)	-	máx. 20
	Almidón pretostado o gelatinizado (g/100 mL)	máx. 2	máx. 2
	FOS y GOS (g/100 mL)	máx. 0,8	máx. 0,8
	Inositol (mg/100kcal)	4-40	4-40

		RD	Reglamento
		165/2014	2016/127
Minerales (mg/100kcal)	Sodio	20-60	25-60
	Potasio	60-160	80-160
	Cloro	50-160	60-160
	Calcio	50-140	50-140
	Fósforo	25-90	25-90
	Magnesio	5-15	5-15
	Hierro	0,3-1,3	0,3-1,3
Minerales (µg/100kcal)	Zinc	0,5-1,5	0,5-1,5
	Cobre	35-100	60-100
	Yodo	10-50	15-29
	Selenio	1-9	3-8,6
	Manganeso	1-100	1-100
	Flúor	máx. 100	-
	Vitaminas (µg/100kcal)	Vitamina A (ER)	60-180
Vitamina D		1-2,5	2-3
Tiamina		60-300	40-300
Riboflavina		80-400	60-400
Niacina		300-1500	400-1500
Ácido pantoténico		400-2000	400-2000
Vitamina B6		35-175	20-175
Biotina		1,5-7,5	1-7,5
Ácido fólico		10-50	15-47,6
Vitamina B12		0,1-0,5	0,1-0,5
Vitamina C		10-30	4-30
(mg/100Kcal)			
Vitamina K		4-25	1-25
Vitamina E		0,5-5	0,6-5
(mg ET/100kcal)			
Nucleotidos (mg/100kcal)		máx. 5	máx. 5

cthc: contenido total en hidratos de carbono; ctmg: contenido total en materia grasa; ER: equivalente de todo trans retinol; ET: equivalente de D-tocoferol; FOS: fructooligosacaridos; GOS: galactooligosacaridos; PCL: poliinsaturados de cadena larga.

*Entrada en vigor: octubre del 2015. Será aplicable a partir del 22 de febrero del 2020.

ANEXO II-Metodología

A) DETERMINACIÓN DE ESTEROLES

1. Extracción grasa

A 2 mL de PL reconstituido (homogenizado previamente con polytron (PT2000, Kinematica) durante 1 min) o a un peso de ingrediente conteniendo 60-80 mg de grasa se le añaden 40 mL de una disolución de cloroformo:metanol (1:1, v/v) con BHT (hidroxitolueno butilado, 99%, Sigma) al 0,05% (m/v), se homogeneiza con el polytron durante 3 min a 19800 rpm y se mantiene en estufa (Heraeus Instruments) a 60 °C, 20 min. Posteriormente se añaden 20 mL de cloroformo (Merck) y tras homogeneizar de nuevo con el polytron durante 3 min, se filtra con un embudo y papel de filtro plegado Whatman nº 2V previamente impregnado con cloroformo, lavando el residuo dos veces con 10 ml de cloroformo. El líquido filtrado se trasvasa a una botella Pyrex ® de 250 mL, se añaden 20 mL de KCl 1M y se agita muy fuerte durante 1 min. Seguidamente, la muestra se mantiene en refrigeración (4°C) durante toda la noche.

2. Separación de la fracción lipídica

Se transfiere la muestra a un embudo de decantación y, tras la separación de las fases de diferente naturaleza, se recoge la fase orgánica. Se le añade la cantidad suficiente de Na_2SO_4 anhidro para eliminar el agua y se mantiene en refrigeración durante 2 h agitando cada 30 min. La muestra se filtra (con papel plegado Whatman nº 2V previamente impregnado con cloroformo) sobre un matraz de fondo redondo y se seca, inicialmente con evaporador rotatorio (baño a 40°C, refrigerante 8°C aproximadamente) y finalmente bajo corriente de N_2 hasta peso constante. Posteriormente, se deja 1h en el desecador y se pesa en balanza analítica (Kern, ABT-5DM) obteniendo la cantidad de grasa extraída.

El extracto se disuelve con aproximadamente 10 mL de hexano:isopropanol (Hx:Ip) (4:1, v/v) y se guarda en congelación (-20°C).

3. Hidrólisis alcalina

El disolvente de la fracción grasa se evapora bajo corriente de nitrógeno y se le añaden 20 µg de epicoprostanol (5 β-cholestan-3α-ol; 95-96%, Sigma) como patrón interno y 2,5 mL de disolución etanólica (90%) de KOH 2N (Santos *et al.*, 2007). La grasa se disgrega con vórtex (20 segundos) y con el baño de ultrasonidos (Ultrason, P-Selecta) durante 1-2 min de modo que la grasa quede bien dispersa. A continuación, se purga 30 segundos con N₂ y se calienta a 65°C durante 1 hora en el baño de agua, agitando a los 30 min (con vórtex 10 segundos). Transcurrido ese tiempo, se deja enfriar a temperatura ambiente.

4. Extracción de la fracción insaponificable con disolventes orgánicos

La muestra se transfiere a un embudo de decantación lavando el tubo con 5 mL de agua Milli-Q (2 + 3 mL) y después con 10 mL de éter etílico (Merck) (2 + 3 + 5 mL) agitando tras la adición. Se deja reposar y se recoge la fase acuosa en el mismo tubo y la fase orgánica en un Erlenmeyer. La fase acuosa se lava otras dos veces con éter etílico (2 x 5 mL). Las fases etéreas se reúnen, se lavan 2 veces con 2 mL de KOH 0,5 N (disolución acuosa) y, finalmente, 2-3 veces con 5 mL de cloruro sódico al 20% (p/v) hasta conseguir que el pH sea neutro (medido con papel indicador). La fase orgánica se deseca con Na₂SO₄ anhidro en exceso y, tras mantenerla en refrigeración (4°C durante 2 h), se filtra (Whatman n° 2V plegado) y se evapora el disolvente bajo corriente de nitrógeno. El insaponificable se disuelve con 10 mL de Hx:Ip (4:1, v/v), se coloca en un tubo troncocónico previamente tratado con el reactivo silanizante (BSTFA+1%TMCS (Sigma):Piridina (Fluka), 10:3, v/v) y se mantiene en congelación (-20°C), hasta su derivatización. La mezcla silanizante se prepara semanalmente y se guarda en nevera a 4°C, protegida de la luz.

5. Derivatización en compuestos trimetilsililéteres

Se realiza siguiendo el modo operatorio descrito por Sweeley *et al.* (1963), para la obtención de trimetilsililéteres. Tras evaporación del disolvente bajo corriente de nitrógeno, se añaden 200 µL aproximadamente de reactivo silanizante, se purga 30 segundos con N₂, se vortea a 2500 rpm y se calienta en bloque calefactor a 65 °C

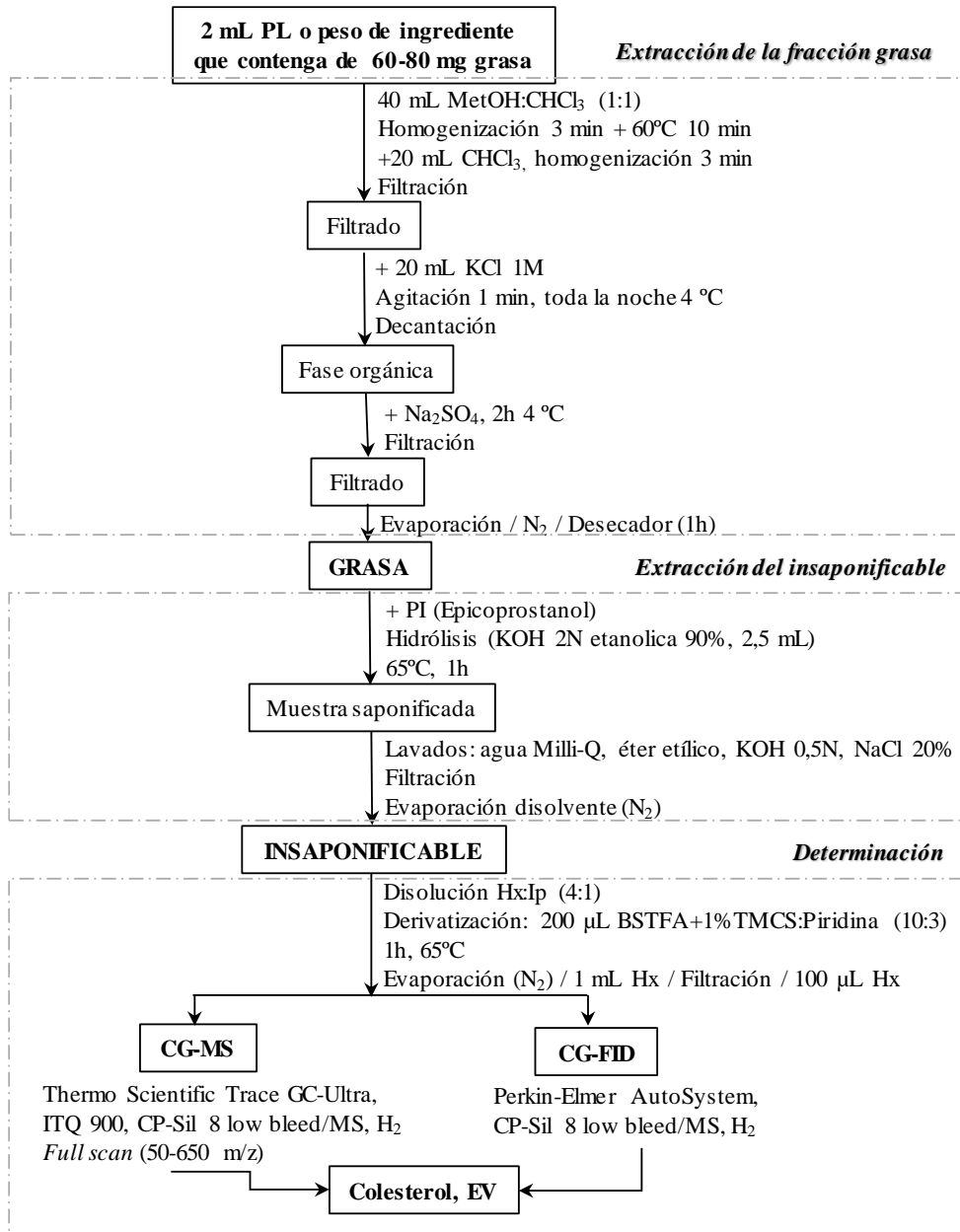
durante 1h agitando a los 30 min. Posteriormente, la muestra se atempera (5-10min) y se deseca bajo corriente de N₂. Se redisuelve con 1 mL de hexano y, tras agitación ultrasónica, se filtra con los filtros Millex® FH (4 mm, 0,45 µm), previamente activados sobre otro tubo troncocónico, con objeto de eliminar los residuos de reactivo derivatizante.

6. Identificación y cuantificación

La muestra se evapora bajo corriente de N₂ y se disuelve en 100 µL de hexano (Scharlab), inyectándose 1 µL en CG-FID y en CG-MS.

La identificación de los esteroides se realiza mediante comparación de su tiempo de retención con el de los patrones en CG-FID, así como contrastando los espectros obtenidos por CG-MS. Las condiciones cromatográficas en CG-FID son: equipo Perkin-Elmer AutoSystem XL provisto de una columna capilar: CP-Sil 8 low bleed/MS (50 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (5% fenil-95% dimetilpolisiloxano, Varian®). El hidrógeno con un flujo de 1,5 mL/min (19 psi) es el gas portador, el método de inyección es en split 1:10 usando un liner de vidrio de 2 mm diámetro con lana de vidrio silanizada en su interior (Supelco), la atenuación de -5 y la temperatura del inyector y del detector son 280 y 300°C, respectivamente. La temperatura inicial del horno (150°C) se mantiene durante 3 min, elevándola a 280°C con una rampa de 30°C/min y se mantiene durante 28 min. Finalmente, la temperatura asciende a 295°C con una rampa de 10°C y se mantiene durante 10 min, obteniendo un tiempo total del cromatograma de 47 min. Para la CG-MS, se utiliza un cromatógrafo Thermo Scientific Trace GC-Ultra, provisto de la misma columna y método de inyección (T^a inyector: 280°C) con liner PTV metal de 2 mm diámetro (2,75x120) (Thermo Scientific). La fuente emite una corriente de -70 eV, siendo la temperatura de la transfer line y de la fuente iónica de 310 °C y 250 °C, respectivamente. El flujo del gas portador es de 1 mL/min, siendo la relación del split la misma que en el CG-FID. El detector, en método full scan (50-650 m/z), está provisto de una trampa iónica (ITQ 900). Adjunto se presenta el esquema de determinación de esteroides.

Esquema de determinación de esterolés.



Los intervalos de concentraciones de las curvas de calibrado utilizadas para la cuantificación de los esteroides detectados por CG-FID son colesterol (5-Cholesten-3 β -ol; 99%, Sigma) (20-317 μ g); desmosterol (Cholesta-5,24-dien-3 β -ol; 84%, Sigma) (1,7-227 μ g); lanosterol (5 α -Cholest-7en-3 β -ol; 99%, Sigma) (1,48-24,75 μ g); brasicasterol (5,22-Cholestadien-24 β -methyl-3 β -ol; 98,6%, Steraloids) (1-6 μ g); campesterol (5-cholesten-24 α -methyl-3 β -ol; 98,6%, Steraloids) (0,1-39 μ g); estigmasterol (Stigmasta-5,22-dien-3 β -ol; 95%, Sigma) (2-15 μ g); β -sitosterol (Stigmast-5-en-3-ol; 98%, Sigma) (0,5-78 μ g) y sitostanol (estigmastanol; 97-97,4%, Sigma) (0,24-6 μ g).

B) DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS POLARES

1. Extracción de lípidos

En un tubo Pyrex se pesan 3 g de ingrediente polvo o 3 mL de PL reconstituido, LH o ingrediente líquido y se añaden 22,5 mL de diclorometano:metanol (2:1, v/v). Se vortea 1 min (agitador de tubos Vórtex MS2, Minishaker IKA) y se agita durante 30 min en agitador circular (Stuart rotator SB3) a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifuga (3200 rpm, 5 min, 0°C). Tras centrifugar se observan 3 fases diferenciadas en muestras líquidas: fase clorofórmica (inferior), interfase sólida con las proteínas de color blanquecino, y la fase acuosa metanólica (superior) o 2 fases diferenciadas en muestra sólidas: fase líquida clorofórmica/acuosa metanólica y fase sólida con las proteínas de color blanquecino.

La fase clorofórmica se recoge y al sobrenadante (fase acuosa-metanólica e interfase en muestras líquidas o fase sólida en muestras en polvo) se le adicionan 18 mL de diclorometano:metanol (2:1, v/v), se vortea durante 1 min y se agita durante 30 min en agitador circular. Después, se centrifuga (3200 rpm, 5 min, 0°C) y, tras centrifugar se observan 2 fases diferenciadas, capa blanquecina en el fondo con las proteínas y fase cloroformica-metanolica. El sobrenadante líquido (fase clorofórmica) se trasvasa y reúne con el de la primera extracción. A continuación, se añaden 4,5 mL de una solución acuosa de 0,8% NaCl, se vortea durante 1 min y se deja en reposo durante toda la noche a 4°C (cámara de refrigeración).

Posteriormente se centrifuga (3200 rpm, 5 min, 0°C) y la fase clorofórmica se filtra (PVDF 0.45 µm, 17mm), eliminando previamente la fase acuosa. Para evitar cualquier resto de agua se coloca sulfato anhidro en el interior de la jeringa. El filtrado se recoge en matraz de fondo redondo y se evapora en rotavapor a vacío con baño de agua a 45°C (El sistema rotavapor consta de: rotavapor, R200 y baño, B480 (Büchi); bomba, M7-2C (Vacuumbrand); sistema recirculación de refrigerante, F12 (Julabo)). Se pesa el balón de fondo redondo (previamente tarado) obteniéndose el peso del residuo de grasa.

2. Identificación y cuantificación

El residuo de grasa extraído se resuspende en 1 mL diclorometano (Scharlau) y, a partir de esta disolución, se preparan dos disoluciones de 5 mg materia seca grasa/mL y de 30 mg materia seca grasa/mL para determinar el perfil lipídico en general o los lípidos polares (fosfolípidos y esfingolípidos).

La identificación y separación de los lípidos se realiza mediante comparación de su tiempo de retención con el de patrones y se confirma con un material de referencia (mazada) en HPLC (Agilent Technologies, model 1200) acoplado a un detector ELSD (SEDERE. SEDEX 85 model, Alfortville Cedex, France), y las condiciones cromatográficas son: aire comprimido como gas nebulizador (nitrógeno) a una presión de 3,5 bar, una temperatura de 60°C y una ganancia de 3. La temperatura del tubo de deriva es de 90°C. Volumen de inyección 50 µL. Para la determinación se usan dos columnas en serie Zorbax Rx-SIL (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) de 250 mm × 4,5 mm con un tamaño de partícula de 5 µm y una pre-columna con el mismo empaquetamiento y un gradiente que se detalla en la tabla adjunta. Los disolventes utilizados para la fase móvil se preparan diariamente.

Sistema de elución en gradiente requerido para la determinación de lípidos y la reactivación de la columna.

Tiempo (min)	%Disolventes				Flujo (mL/min)
	A	B	C	D	
0	0	0	100	0	1,4
5	0	0	100	0	1,4
5,1	5	0	95	0	0,5
9,5	9,2	0	90,8	0	0,5
13,5	85	0	15	0	0,5
19,49	100	0	0	0	0,5
19,5	100	0	0	0	1
25	75	25	0	0	1
45	0	100	0	0	1
45,5	0	0	0	100	1
46	0	0	0	100	1
46,5	0	0	100	0	1
47	0	0	100	0	1,4
53	0	0	100	0	1,4

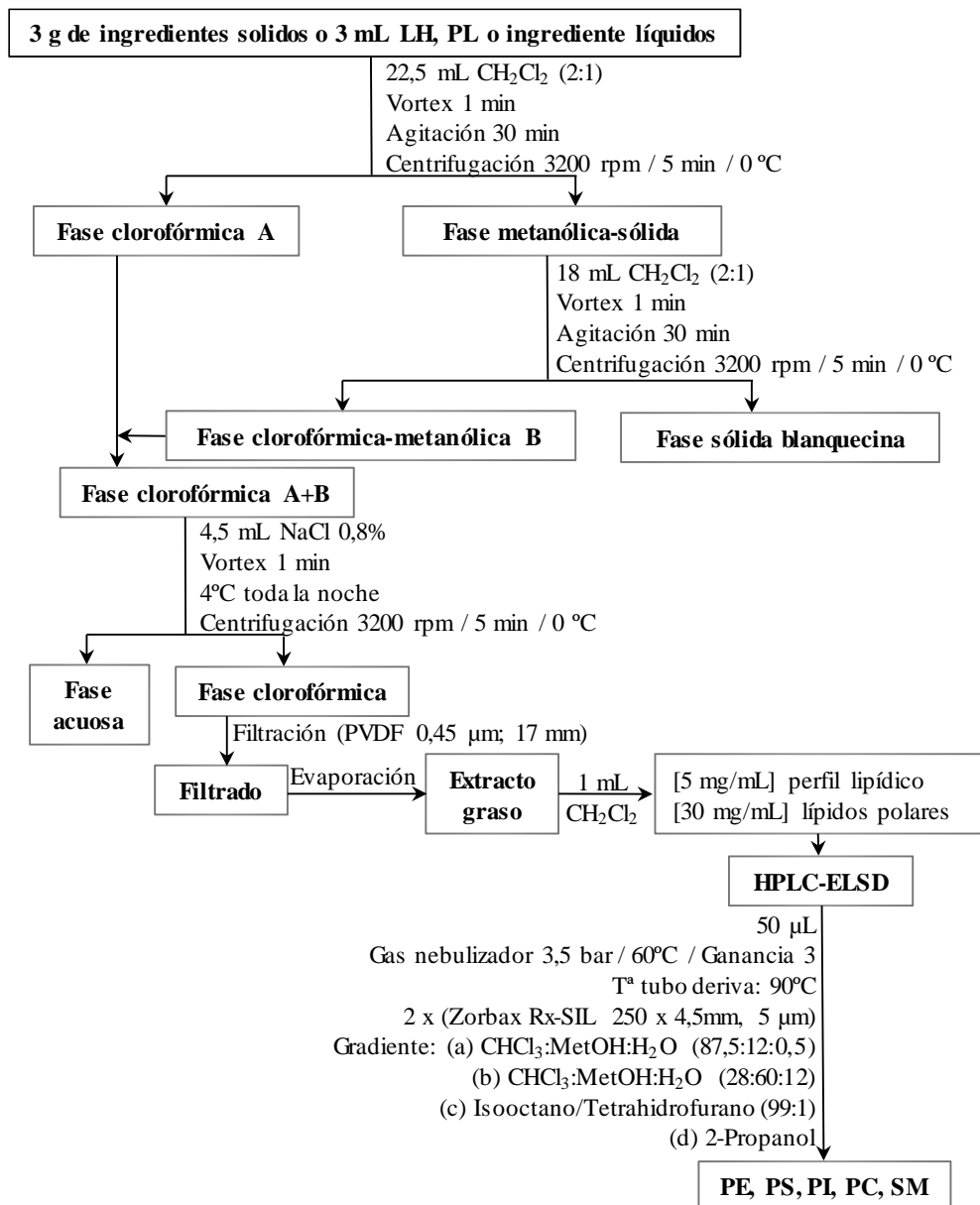
(A)Cloroformo/metanol/agua (ácido fórmico 1 M; trietilamina, pH 3). 87,5:12:0,5 (v/v/v).

(B)Cloroformo/metanol/agua (ácido fórmico 1 M; trietilamina, pH 3). 28:60:12 (v/v/v).

(C)Isooctano/Tetrahidrofurano, 99:1 (v/v). (D) 2-Propanol

Para la cuantificación se realizaron curvas de calibrado a diferentes concentraciones: fosfatidilcolina de yema de huevo (99%, Sigma) (9,5-706,2 $\mu\text{g/mL}$), fosfatidietanolamina de cerebro bovino (99%, Sigma) (9,2-1019,7 $\mu\text{g/mL}$), fosfatidilinositol de soja (99,5%, Sigma) (9-663,7 $\mu\text{g/mL}$), fosfatidilserina de cerebro bovino (97,6%, Sigma) (8,8-651,0 $\mu\text{g/mL}$), esfingomielina de yema de huevo de pollo (100%, Sigma) (9,3-687,0 $\mu\text{g/mL}$). El esquema de determinación de LP se muestra en el esquema adjunto.

Esquema de determinación de lípidos polares.



C) DETERMINACIÓN DE ÁCIDO SIÁLICO

1. Hidrólisis

La muestra en polvo (o liofilizada con liofilizador CoolSafe, Scanvac) procedente de los PL, LH o ingredientes (0,75 g) y FB liofilizada (0,4 g) se disuelve en 10 y 5 mL de agua desionizada, respectivamente. Se toman 0,9 mL de esta disolución y se procede al hidrólisis con 2,1 mL de H_2SO_4 0,05M, calentando a 80°C durante 1 hora en un bloque calefactor. Tras la hidrólisis, las muestras se atemperan para continuar con el análisis, o pueden conservarse a 4°C. Para asegurar la identificación de la forma Neu5Gc, el tiempo de almacenamiento no deberá superar las 24 horas.

2. Purificación

El método de purificación utiliza una resina Dowex 1x8 (400 mesh, Fluka), que inicialmente se debe activar. Para la activación: 5 g de resina se resuspenden en 30 mL de HCl 2N, se calientan al baño maría durante 30 min, se deja enfriar y se descarta el sobrenadante (se repite el mismo proceso 4 veces más). A continuación, se lava la resina dos veces con 60 mL de agua desionizada durante 10 min cada vez. Sobre la resina tratada se añaden 60 mL de formiato sódico 2N y se mantienen 10 min, se descarta el sobrenadante y se repite el proceso 3 veces más. Para concluir, se adicionan 60 mL de ácido fórmico 1N, manteniéndolos hasta que sedimente la resina, se elimina el sobrenadante y se vuelve a repetir la operación una vez más. La resina activada se resuspende en 30 mL de agua desionizada para su conservación a 4°C hasta su uso (en estas condiciones puede mantenerse hasta dos meses). Para la regeneración (hasta cinco veces): a 2 mL de resina se pasan sucesivamente y por el siguiente orden, 10 mL de NaOH (2N), agua destilada, formiato sódico (2N) y ácido fórmico (0,1N). La resina regenerada se conserva a 4°C.

La muestra hidrolizada se centrifuga (1000xg, 10 min, 4°C), y el sobrenadante se pasa por una columna de policarbonato conteniendo 2 mL de resina, por la que previamente se han pasado 20 mL de ácido fórmico 0,1N. Seguidamente se lava la columna con 20 mL de agua, y el Sia se eluye con 20 mL de ácido fórmico 1N.

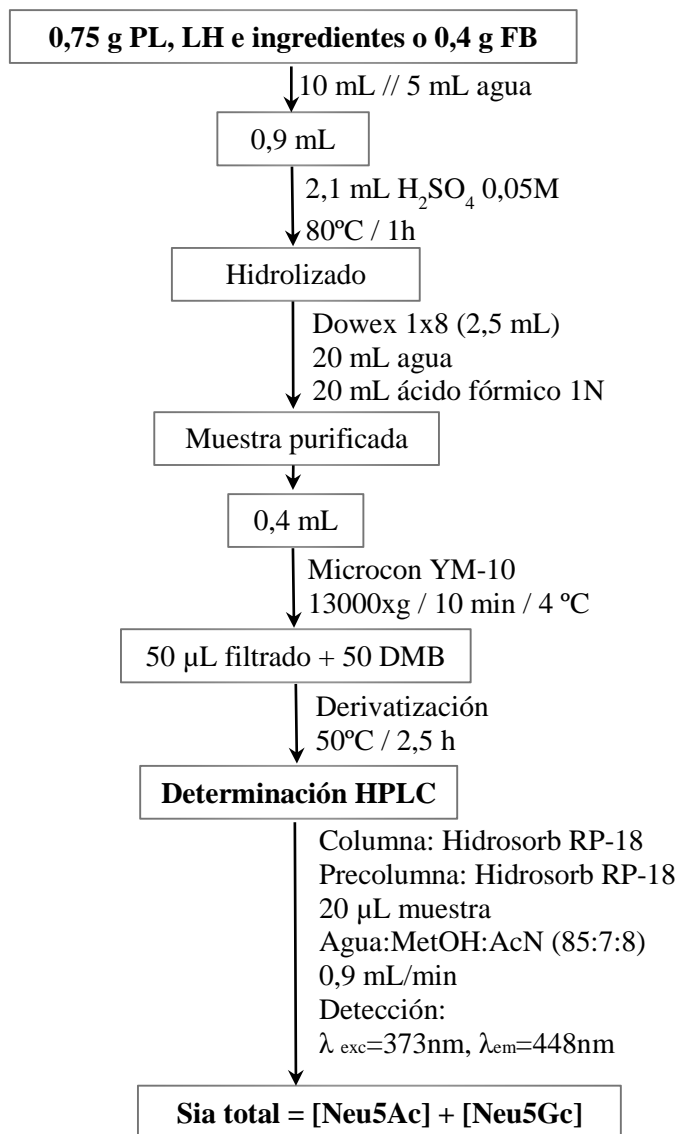
3. Determinación por HPLC

Este método permite diferenciar dos formas de Sia, el Neu5Ac y el Neu5Gc. La muestra hidrolizada y purificada (400 μL) se pasa a través de filtros Microcon-Ultracel YM-10 (Millipore) y se centrifuga (13000xg, 10 min, 4°C). A 50 μL del filtrado, se añaden 50 μL de reactivo derivatizante DMB (se mezclan 90 μL de 1,2-diamino-4,5-metilendioxi-benceno dihidrocloruro (DMB) (Sigma) 44,42 mM, 43 μL de ácido acético glacial, 50 μL de hidrosulfito sódico 140 mM, 28 μL de β -mercaptoetanol y 289 μL de agua Milli-Q) y se calientan a 50°C 2,5 horas en bloque calefactor, protegido de la luz.

Se inyectan 40 μL en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC, Shimadzu) formado por: dos bombas modelo LC-10AD. Detector UV-visible modelo SPD-10AV. Detector de fluorescencia modelo Waters 474. Horno modelo CTO-6AS. Inyector manual de volumen variable Rheodyn modelo 7725. Módulo de comunicación modelo CBM-20. Ordenador procesador Core, Windows 2007. Sistema de adquisición y procesado de datos cromatográficos Shimadzu LC-Solution versión 1.25. Como fase móvil se utiliza una mezcla agua:metanol (J.T.Baker):acetonitrilo (J.T.Baker) (85:7:8) (v/v/v), con un flujo de 0,9 mL/min. La columna cromatográfica (Hidrosorb RP-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) y precolumna Hidrosorb RP-18 (5 μm) de Merck) se mantiene a 30°C. La detección se realiza a $\lambda_{\text{exc}}= 373 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}= 448 \text{ nm}$, ganancia 1, atenuación 64 y respuesta 5s.

En la figura siguiente se esquematiza el método de determinación de Sia por HPLC- UV-visible.

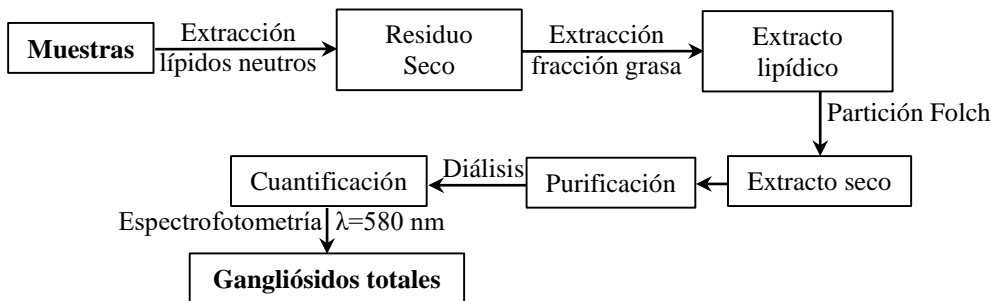
Esquema de determinación de ácido siálico.



D) DETERMINACIÓN DE GANGLIÓSIDOS

El estudio de los gangliósidos comprende varias etapas: extracción, purificación y determinación que se esquematizan en la figura adjunta.

Determinación general de gangliósidos.



1. Extracción de gangliósidos

La extracción de gangliósidos, a partir de muestra en polvo o liofilizada se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Lacomba *et al.* (2011a) que consta de tres pasos sucesivos como se explica a continuación:

1.1. Extracción de lípidos neutros

Se comienza con la eliminación de los lípidos neutros, fundamentalmente TAG, utilizando acetona (Merck) fría (-20°C) en la que son solubles los lípidos neutros. Para ello, se pesa aproximadamente 5 g de muestra y se resuspende en 10 volúmenes de acetona fría (-20°C) por gramo de muestra, es decir 50 mL. La muestra resuspendida se homogeniza con un homogenizador (Polytron PT2000, Kinematica) con el que se aplican tres pulsos de un minuto de duración separados por espacios de 1 minuto, aproximadamente, en baño de hielo. A continuación, la mezcla resultante se mantiene en agitación, con agitador magnético, a 4°C, durante 45 min. Transcurrido este tiempo se filtra a través de filtros de fritas cerámicas (tamaño de poro 3, Ø 5 cm, Vidrafoc), y se procede a una nueva extracción del sólido. El residuo sólido obtenido tras la segunda filtración se mantiene a temperatura ambiente hasta eliminar completamente la acetona obteniéndose de esta forma el “extracto acetónico seco”.

1.2. Extracción de los lípidos polares

El extracto acetónico se homogeniza en 10 volúmenes de cloroformo:metanol 1:1 (v/v), por gramo de muestra (50 mL), mediante tres pulsos con el homogenizador como se explica anteriormente y se deja en agitación, con agitador magnético (Bibby Stuart), durante toda la noche a 4°C.

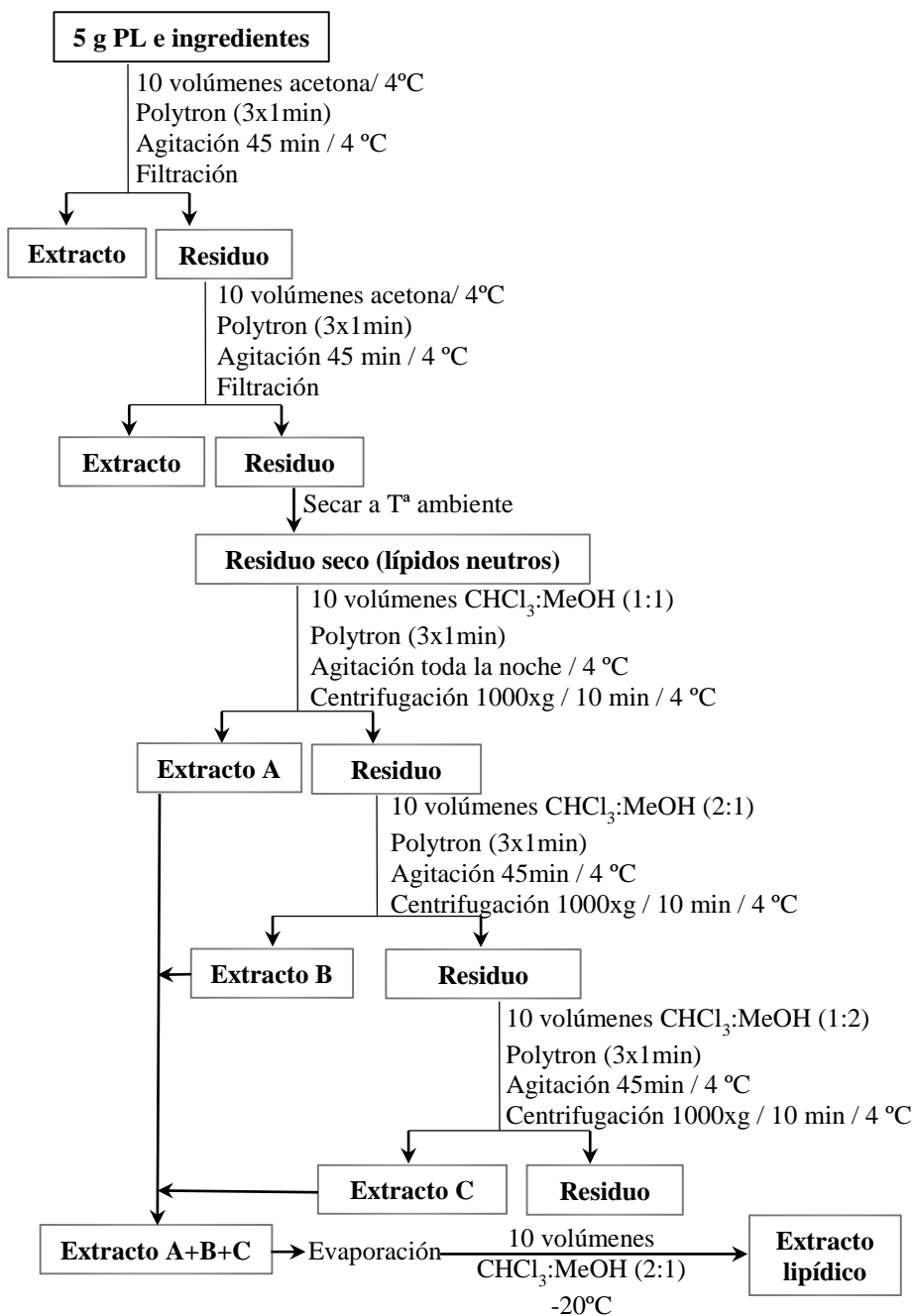
A continuación, se centrifuga a 1000xg, 4°C, 10 min y se recoge el sobrenadante manteniéndolo a 4°C. El residuo se extrae dos veces más, con mezclas de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y 1:2 (v/v), con ayuda del homogeneizador como se explica anteriormente y con agitador magnético durante 45 min a 4°C. Después de las tres extracciones, el residuo sólido obtenido, que contiene proteínas y oligosacáridos, se desecha, mientras que los sobrenadantes se reúnen y se evaporan hasta sequedad utilizando rotavapor (baño a 40°C y vacío) (extracto A+B+C), obteniendo así un “extracto lipídico” que contiene todos los lípidos polares: gangliósidos, otros glicoesfingolípidos, fosfolípidos, etc.

El extracto lipídico se resuspende en 10 volúmenes por gramo de muestra (50 mL), de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y se conserva a -20°C durante 4 horas.

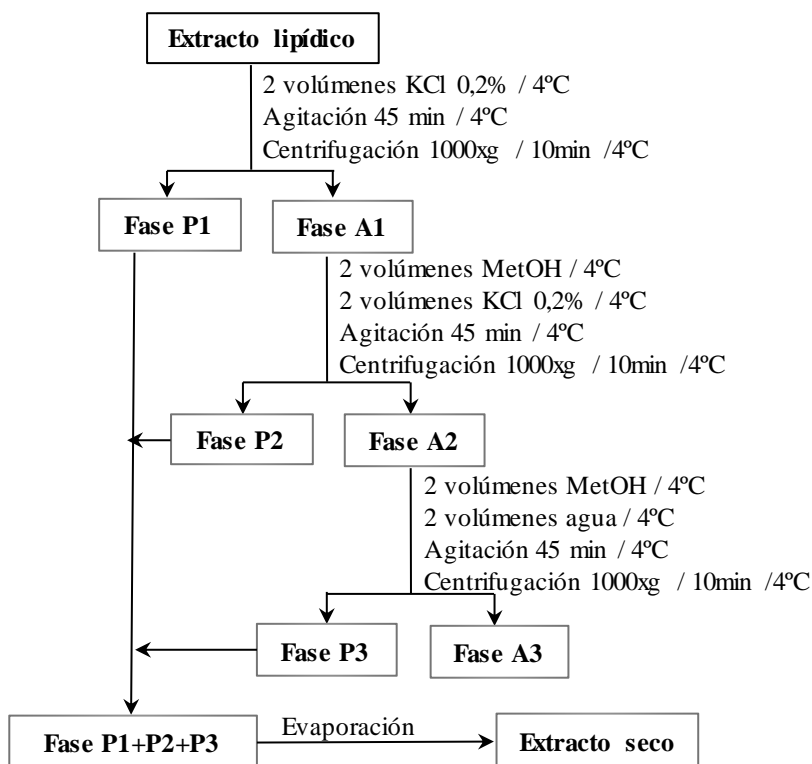
1.3. Partición de Folch

El extracto graso se centrifuga a 1000xg, 4°C, 10 min. Al sobrenadante se le añaden 2 volúmenes, por gramo de muestra (10 mL), de KCl al 0,2% frío (almacenado a 4°C), se agita durante 45 min a 4°C y se centrifuga a 1000xg durante 10 min a 4°C. La fase superior acuosa, que contiene los gangliósidos se recoge; y la fase inferior orgánica, en la que se encuentran los demás lípidos se extrae nuevamente con 2 volúmenes de MetOH y 2 volúmenes de KCl 0,2% (ambos a 4°C); y posteriormente con 2 volúmenes de MetOH y 2 volúmenes de agua destilada (ambos a 4°C). Tras esta última centrifugación se desecha la fase inferior y la fase superior se reúne con las obtenidas en las centrifugaciones anteriores y se evaporan con ayuda de rotavapor hasta sequedad total (baño a 50°C y vacío) (Fase P1+P2+P3) (ver Figuras adjuntas).

Determinación de gangliósidos: Extracción de la fracción grasa.



Determinación de gangliósidos: Partición de Folch.



2. Purificación

2.1. Diálisis

El extracto seco obtenido se somete a un proceso de diálisis con el fin de eliminar sales, oligosacáridos y demás compuestos de pequeño tamaño molecular. Para ello, el extracto se resuspende en una pequeña cantidad de agua destilada (2-4 ml) a 4°C, se introduce en una membrana de diálisis (3500 MWCO, 45 mm anchura, 29 mm ϕ (SpectraPor)) y se dializa frente a agua destilada durante dos días, realizando cambios del agua de la diálisis, cada 8 horas. Se trabaja a 4°C para favorecer la agregación de los gangliósidos y evitar su difusión fuera de la membrana. Transcurrido este tiempo, el contenido de dentro de la membrana de diálisis se recoge y se liofiliza.

La mezcla de GG liofilizada obtenida se resuspende en 1 mL de CHCl₃:MeOH (2:1) (v/v) y se conserva a -20°C hasta el análisis.

3. Determinación del contenido total

La muestra purificada se centrifuga (1000xg, 4°C, 10 min). 10 µL del sobrenadante se transfieren a un tubo y se evaporan con N₂ hasta sequedad. Se redisuelve en 500µL de agua y se le añaden 500µL de reactivo de resorcinol (10 mL de disolución resorcinol 2% (2 g a 100 mL), 80 mL de ácido clorhídrico fumante y 0,25 mL de sulfato de cobre pentahidratado 0,1 M (24,7 g a 1L con agua desionizada) se llevan a 100 mL con agua desionizada).

Se incuba la muestra en bloque calefactor a 100°C durante 15 min, protegiéndola de la luz. La reacción se detiene sumergiendo los tubos en un baño de agua-hielo (5 min). A la muestra se le adiciona 1mL de alcohol N-amílico (Merck), se centrifuga (1000xg, 10 min, 4°C) y se mide la absorbancia de la fase orgánica a 580nm en un espectrofotómetro (Lamba 2 de Perkin Elmer).

Paralelamente, se preparan 2 blancos y tres patrones de Neu5Ac a partir de la disolución madre de 1 µg/µL, de 5, 10 y 15 µg. La suma de las absorbancias obtenidas con estos patrones corresponde a 30 µg, y esta relación es la que se utiliza para cuantificar los GG presentes en las muestras. Los resultados se expresan como ácido siálico unido a lípidos (µg ASUL/L) y son calculados según un procedimiento usado en biología: la suma de las tres cantidades inyectadas y la suma de las tres absorbancias correspondientes son proporcionales. Por tanto, la absorbancia de la muestra se calcula con esta relación.

E) ENSAYOS DE BIOACCESIBILIDAD *IN VITRO*

Se aplica una digestión gastrointestinal micelar en tres etapas (salivar, gástrica e intestinal) con el fin de estimar la BA del Sia en PL y LH (Granado-Lorencio *et al.*, 2007).

Los diferentes jugos utilizados se preparan según se indica a continuación:

-Jugo salivar:

Disolución inorgánica: 1 mL KCl 89,6 g/L, 1 mL KSCN 20 g/L, 1 mL NaH₂PO₄ 88,8 g/L, 0,170 mL NaCl 175,3 g/L, 0,180 mL NaOH 40 g/L y se llevan a 50 mL con agua estéril.

Disolución orgánica: 0,8 mL urea 25 g/L y se llevan a 50 mL con agua estéril. Ambas disoluciones se mezclan y se adicionan: 0,1 mL (20 U) de α -amilasa de saliva humana: tipo XIII-A (EC. 3.2.1.1) (Sigma), 1 mL de la disolución de ácido úrico (37,5 mg se llevan a 25 mL de tampón fosfato) y 1 mL de la disolución de mucina de estómago porcino tipo II (25 mg se llevan a 5 mL de tampón fosfato). Se ajusta el pH a 6,5 con HCl y NaOH, según proceda.

-Jugo gástrico:

Disolución inorgánica: 0,92 mL KCl 89,6 g/L, 0,83 mL HCl 37% (g/g), 0,3 mL NaH₂PO₄ 88,8 g/L, 1,57 mL NaCl 175,3 g/L, 1,8 mL CaCl₂·2H₂O 22,2 g/L, 1 mL NH₄Cl y se lleva a 50 mL con agua estéril.

Disolución orgánica: 0,34 mL urea 25 g/L, 1 mL glucosa 65 g/L (Sigma), 1 mL ácido glucurónico 2 g/L (Sigma), 1 mL glucosamina hidrocloreuro 33g/L (Sigma) y se llevan a 50 mL con agua estéril.

Se mezclan ambas disoluciones y se adicionan: 0,1 g de albumina (BSA, \geq 98%, Sigma), 0,1 g (45200 U) de pepsina de mucosa de estómago porcino (EC.3.4.23.1) (Sigma) y 0,3 g de mucina de estómago porcino tipo II (Sigma). Se ajusta el pH a 4 con el pH-metro (GLP-21, Crison).

-Jugo duodenal:

Disolución inorgánica: 0,63 mL KCl 89,6 g/L, 4 mL NaHCO₃ 84,7 g/L, 1 mL KH₂PO₄ 8 g/L, 4 mL NaCl 175,3 g/L, 1 mL MgCl₂ 5 g/L, 18 μ L HCl 37% (g/g) y se llevan a 50 mL con agua estéril.

Disolución orgánica: 0,4 mL urea 25 g/L (\geq 99%, Afora) se lleva a 50 mL con agua estéril.

Se mezclan ambas disoluciones y se adicionan: 0,9 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 22,2 g/L (Sigma), 0,1 g de BSA y 0,3 g de pancreatina de páncreas porcino (Fluka). El pH se ajusta a 7,8.

-Bilis:

Disolución inorgánica: 3 mL NaCl 175,3 g/L, 6,83 mL NaHCO_3 84,7 g/L, 0,42 mL KCl 89,6 g/L, 20 μL HCl 37% (g/g) y se llevan a 50 mL con agua estéril.

Disolución orgánica: 1 mL urea 25 g/L se lleva a 50 mL con agua estéril.

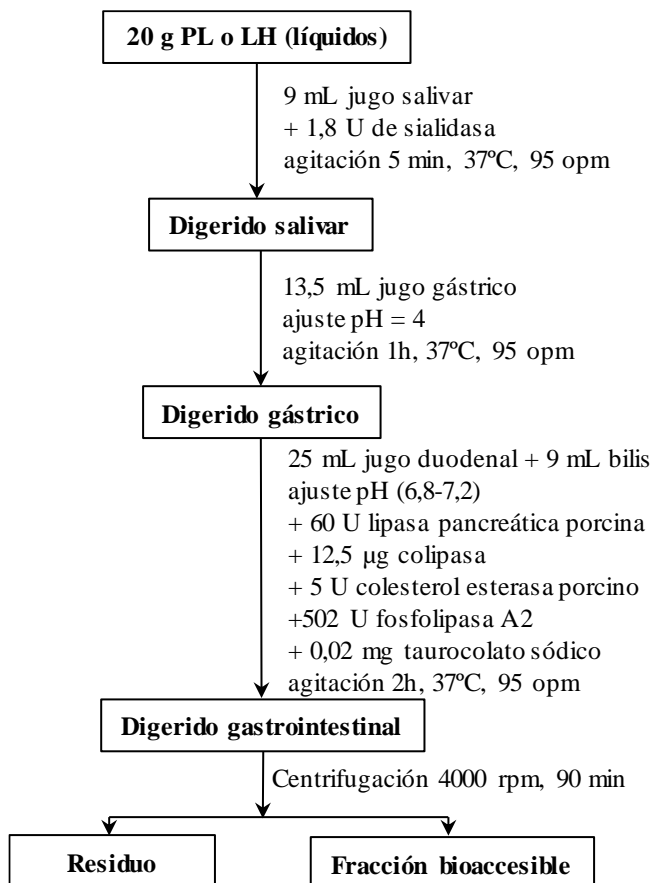
Ambas disoluciones se mezclan y se adicionan: 0,18 g de BSA, 0,6 g de bilis bovina (Sigma) y 1 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 22,2 g/L. El pH se ajusta a 8.

Simulación de la digestión gastrointestinal

Se pesan 20 g de muestra líquida en un matraz Erlenmeyer y se añaden 180 μL (1,8 U) de neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (sialidasa) (EC.3.2.1.18) (Sigma) y 9 mL de disolución salivar. El erlenmeyer tapado se incuba en un baño de agua (Afora) con agitación constante durante 5 min (37°C, 95 opm). Seguidamente, se añaden 13,5 mL de jugo gástrico incubando la disolución durante una hora a 37°C en baño de agua (95 opm). A continuación, se adicionan 25 mL de jugo duodenal y 9 mL de bilis. El pH de esta disolución final se neutraliza (6,8-7,2) con HCl y NaOH, según proceda y seguidamente, se adicionan: 60 U de lipasa de páncreas porcino (EC.3.1.1.3) (Sigma), 12,5 μg de colipasa de páncreas porcino (Sigma), 5 U de colesterol esterasa de páncreas porcino (EC.3.1.1.13) (Sigma), 502 U de fosfolipasa A2 de páncreas porcino (EC.3.1.1.4) (Sigma) y 0,02 mg de taurocolato sódico (Sigma), y se incuba durante 2 horas (37°C, 95 opm).

Trascurrido este tiempo, se retira del baño y el volumen final de la digestión se centrifuga a 4000 rpm durante 1 h 30 min (centrífuga 3K15, Sigma). El sobrenadante (FB) se separa por decantación (ver Figura adjunta). Las distintas FB se mantienen en congelación (-20°C) hasta su análisis.

Esquema de la digestión gastrointestinal *in vitro* (Granado-Lorecio *et al.*, 2007).



ANEXO III: Protocolo de recogida de leche humana

“ESTUDIO DE COMPONENTES BIOACTIVOS DE LA FRACCIÓN GRASA DE LA LECHE DE MUJER Y DE INGREDIENTES UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DE PREPARADOS DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN DEL LACTANTE”

TOMA DE MUESTRA

Criterios de inclusión:

Madres lactantes sanas.

Edad 18-40 años.

Gestación > 37 semanas.

Peso al nacer > 2500 g

No fumadoras.

Criterios de exclusión:

Diabetes gestacional.

Diabetes tipo 1 y tipo 2.

Obesidad.

Hipertensión.

Dieta vegetariana.

Prematuridad.

Parto múltiple.

Fumadoras durante la lactancia.

Tratamiento con antibióticos

Periodos de toma de muestras:

Con una con $n \geq 25$ madres lactantes por periodo y un volumen de al menos 20 - 40 ml de cada madre (interesa llegar a un volumen de 1000 mL).

Calostro (Desde el 1º hasta el 5º día); *transición* (Desde el 6 día hasta el día 15); al mes; a los 3 meses; a los 6 meses; a los 9 meses; a los 12 meses

Procedimiento de extracción

A) *Utilizando sacaleches (de elección)*

Lavar las manos antes de proceder a la extracción.

Masajear el pecho para provocar un efecto parecido al provocado por el reflejo de succión del lactante. Para ello, debe friccionar con las yemas de los dedos desde la base del pecho hacia la areola.

B) *Extracción manual*

Lavar las manos antes de proceder a la extracción.

Masajear el pecho para provocar un efecto parecido al provocado por el reflejo de succión del lactante. Para ello, debe friccionar con las yemas de los dedos desde la base del pecho hacia la areola.

Colocar la mano en el pecho en forma de “C” apoyando el dedo pulgar en la parte superior del pecho a unos 3 cm de la areola y la palma de la mano en la parte inferior.

Hacer un movimiento de “ordeño”, es decir, friccionar el pecho hacia atrás (como hundiendo el pecho) y hacia adelante a la vez que se presiona como si se quisiera juntar los dedos.

Este movimiento se tiene que repetir pausada y rítmicamente alternando ambos pechos cada 5-10 min, de manera que resulte cómodo, ya que una extracción manual, puede durar entre 20-30 min. Esta técnica requiere práctica, por lo que, si al principio se extrae poca leche, no se desanimen, poco a poco saldrá cada vez mejor.

Datos a controlar en la toma de muestra:

Código del Pool:								
Muestra (Iniciales madre)	Edad de la madre	Fecha de parto	Fecha de toma de muestra	Hora	Volumen (mL) Aproximado		Tipo de extracción	
					Antes	Después	Sacaleches	Manual

Procedimiento de almacenamiento

La leche debe conservarse en el recipiente DE PLÁSTICO (no pvc) proporcionado.

Es conveniente guardarla en pequeñas cantidades (50-100cc).

Se colocará una etiqueta en el recipiente con la fecha, la hora de extracción de la leche y el mes o días de lactancia al que corresponde la muestra y las iniciales de nombre y apellidos de la madre (posteriormente se procederá a su codificación).

Iniciales de la madre y edad:

Meses o días de lactancia:

Fecha de parto:

Fecha de extracción:

Ciudad:

El recipiente se guardará en el congelador (-18°C). Se avisará a la persona de contacto facilitada para la recogida de la muestra.

El transporte se realizará, lo antes posible (anotando el momento) en neveras con placas de hielo hasta la Facultad de Farmacia, donde se almacenarán a -80°C hasta su posterior descongelación.

**D^a. CRISTINA AVENDAÑO SOTÁ, SECRETARIA DEL COMITÉ ETICO
DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL LINIVERSITARIO
PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA DE MADRID**

CERTIFICA

Que dicho Comité ha evaluado el proyecto de investigación titulado:

**“ESTUDIO DE COMPONENTES BIOACTIVOS DE LA FRACCIÓN
GRASA DE LA LECHE DE MUJER Y DE INGREDIENTES UTILIZADOS
EN LA ELABORACIÓN DE PREPARADOS DESTINADOS A LA
ALIMENTACIÓN DEL LACTANTE.”**

Se considera que su planteamiento global es correcto desde el punto de vista metodológico y ético y el proyecto queda aprobado para su realización en el Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda por el Dr. Fernando Granado como investigador principal. Acta nº 281 de fecha 29/10/12.

En Majadahonda, a 29 de octubre de 2012



Fdo.: Dra. Avendaño Solá
Secretaria del CEIC



**Hospital Universitario
Puerta de Hierro Majadahonda**

Comunidad de Madrid



La Comisión de Lactancia Materna ha valorado el “Estudio de componentes bioactivos de la fracción grasa de la leche de mujer y de ingredientes utilizados en la elaboración de preparados destinados a la alimentación del lactante” y ha confirmado que no interfiere con la política de apoyo de la lactancia materna en el Hospital ni con el cumplimiento del Código Internacional de Comercialización de Sucedáneos de la Leche Materna, por lo que está de acuerdo con su realización.

Madrid, 29 Octubre de 2012

Fdo. Carmen Muñoz Labián
Servicio de Pediatría- Neonatología
Secretaria de la Comisión de Lactancia Materna

HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE

La leche materna (LH) es considerada como el alimento más completo y adecuado durante las primeras etapas de vida, ya que además de satisfacer las necesidades del lactante le proporciona otros efectos beneficiosos como protección frente a infecciones o disminución del riesgo de posteriores alergias. La ESPGHAN (2009) y la OMS (2001) recomiendan la alimentación exclusiva de los recién nacidos con lactancia materna por lo menos hasta los 6 meses. Sin embargo, cuando esto no es posible, por falta de secreción láctea, patologías de la madre, rechazo del niño, opción personal o cuando esta alimentación resulta insuficiente, se recurre a la alimentación mediante preparados a base de leche de vaca o soja, cuya composición debe parecerse lo más posible a la de la leche de mujer.

La fracción correspondiente a la grasa en la leche materna y de los preparados para lactantes tiene importancia no sólo por la contribución al valor energético, sino también por el efecto de sus componentes sobre el desarrollo, estructura y función de órganos, en especial de la mucosa intestinal, del sistema inmune y nervioso del recién nacido.

Por todo ello se considera de gran interés caracterizar la composición grasa de la LH, en especial de compuestos minoritarios, como son los fosfolípidos, esteroles vegetales, gangliósidos, así como vitaminas con el fin de incrementar la información disponible sobre componentes bioactivos de la LH con la finalidad de mejorar la alimentación del lactante.

Para poder saber cuál es el patrón de grasa de la leche humana es por lo que solicitamos su permiso en la donación de una muestra de su leche en diferentes periodos de la lactancia. Esta leche será analizada exhaustivamente, no sólo en cuanto a sus componentes mayoritarios, sino también en cuanto a componentes minoritarios (que están en cantidades muy pequeñas), pero que poseen un gran valor en cuanto elementos que influyen en la maduración y desarrollo del lactante.

Le informamos que los datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de 13 de diciembre.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Dña: _____
_____ de _____ años de edad y con DNI nº _____, manifiesta que ha sido informada sobre los beneficios que podría suponer el análisis de mi leche para llevar a cabo la investigación **“ESTUDIO DE COMPONENTES BIOACTIVOS DE LA FRACCIÓN GRASA DE LA LECHE DE MUJER Y DE INGREDIENTES UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DE PREPARADOS DESTINADOS A LA ALIMENTACIÓN DEL LACTANTE”**

He sido también informada de que mis datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de 13 de diciembre.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a:

- Análisis de mi leche
- Y que sea utilizado para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

Valencia, a _____ de _____ de 201

Fdo. D/Dña

ANEXO IV: Muestras de leche humana

En la siguiente tabla se detalla el volumen total de LH obtenido (mL) y el número de mujeres participantes (indicado entre paréntesis) en cada periodo de lactación. Los volúmenes utilizados de cada donante, para realizar la correspondiente mezcla fueron semejantes.

	Zona geográfica		
	Centro	Litoral	
	Madrid	Valencia	Murcia
Colostro (0 meses; 0 – 5 días)	335 (25)		840 (8)
Transición (0,5 meses; 6 – 15 días)	375 (25)		640 (8)
1 mes (16 – 60 días)	325 (24)	930 (4)	1234 (13)
3 meses (61 -135 días)	300 (21)	1145 (10)	930 (11)
6 meses (136 -240 días)	200 (20)	779 (4)	635 (6)
9 meses (241 – 330 días)	-		520 (5)
12 meses (331 - 420 días)	-		865 (8)

ANEXO V

A) Ingredientes declarados en la etiqueta de los preparados para lactantes analizados.

PL	País	Ingredientes
1	España	Lactosa, lípidos lácteos, leche desnatada, aceites vegetales (colza, girasol, girasol con oleico), proteínas del suero lácteo, aceite de pescado (DHA), aceite de <i>Mortierella Alpina</i> (ARA), emulsionantes (lecitina de soja), vitaminas, cloruro de colina, antioxidantes, taurina, fermentos lácteos.
2		Suero lácteo desmineralizado, leche desnatada, aceites vegetales (palma, colza, coco, girasol y aceite de <i>Mortierella alpina</i>), lactosa, minerales, aceite de pescado, lecitina de soja, vitaminas, nucleótidos, proteínas de la leche, bifidobacterias.
3		Leche desnatada, lactosa, aceites vegetales (palma, semilla de palma, colza, girasol, girasol alto oleico, de alga (ARA)), FOS, proteína del suero enriquecida con α -lactoalbumina, maltodextrina, sales minerales, emulsionante (lecitina de soja), aceite de pescado (fuente de DHA), vitaminas, nucleótidos, antioxidantes.
4		Lactosa, aceites vegetales (palma, coco, colza, girasol alto oleico y de girasol), leche desnatada, proteínas del suero, GOS, maltodextrina, minerales, lecitinas, aceites de hongos y algas, vitaminas, nucleótidos.
5		Lactosa, aceites vegetales (girasol, colza, palma, coco, aceite unicelular), leche desnatada, GOS, grasa láctea, proteína del suero enriquecida en MFGM, proteína del suero enriquecida en α -lactoalbumina, minerales, lecitina de soja, aceite de pescado, aceites de hongos, vitaminas, nucleótidos, cloruro de colina, inositol, carnitina.
6		Lactosa, aceites vegetales (girasol, colza, palma, coco, aceite unicelular), leche desnatada, grasa láctea, proteína del suero enriquecida en MFGM, proteína del suero enriquecida en α -lactoalbumina, proteínas de la leche, vitaminas, aceite de pescado, aceites de hongos y algas, emulgente (lecitina de soja), minerales, cloruro de colina, taurina.
7	Suecia	Suero lácteo, lactosa, leche desnatada, aceite vegetal (palma, canola, coco, girasol), proteínas de la leche en polvo, maltodextrina, aceite de pescado, emulsionante, aceite de <i>Mortierella Alpina</i> , lecitina de soja, sales minerales, vitaminas, cultivos de bifidobacterias.
8		Leche desnatada orgánica, suero orgánico desmineralizado en polvo, aceites orgánicos vegetales (palma, colza, girasol), GOS, lactosa, aceites poliinsaturados (pescado y vegetales), minerales, emulgente, vitaminas, estabilizador (ácido láctico).

(Continuación)

PL	País	Ingredientes
9	Suecia	Lactosa, aceites vegetales (girasol, de colza, de palma, de coco, aceite unicelular), leche desnatada, GOS, grasa lactea, proteína del suero enriquecida en MFGM, proteína del suero enriquecida en α -lactoalbumin, minerales, lecitina de soja, aceite de pescado y hongos, vitaminas, taurina, nucleótidos, cloruro de colina, inositol, carnitina.
10	Republica Checa	Suero desmineralizado en polvo, aceites vegetales, suero lácteo en polvo, lactosa, leche desnatada en polvo, GOS, minerales, vitaminas, colina, emulgente (lecitina).
11		Suero desmineralizado, aceites vegetales (palma, colza, girasol, coco, microbiológicos (ARA)), lactosa, leche, FOS, GOS, minerales, vitaminas, lecitina de soja, aceites de pescado.
12		Suero desmineralizado (de leche), aceite vegetal, lactosa, leche desnatada, GOS, proteína del suero concentrado (de leche), FOS, aceite de pescado, minerales, vitaminas, nucleótidos, lecitina de soja.
13		Suero hidrolizado, aceites vegetales (palma, colza, coco, girasol, aceites de fuentes microbianas (ARA)), lactosa, leche desnatada en polvo, GOS, FOS, suero lácteo concentrado, minerales, vitaminas, lecitina de soja.

ARA: ácido araquidónico, DHA: ácido docosahexaenoico, FOS: fructooligosacaridos, GOS: galactooligosacaridos, PL: preparado para lactante.

B) Composición indicada en la etiqueta para los preparados para lactantes

PL	País	FR (% p/v)	Energía (Kcal/100g)	Proteínas (g/100g)	Grasa (g/100g)	Hidratos de carbono (g/100g)	Relación suero/caseína
1		13,5	493	9,8	22,3	60,9	68:32
2		12,9	519	9,6	27,7	57,8	70:30
3	España	13,5	499	10	26	53,3	60:40
4		12,9	511	11	27	55,3	60:40
5		12,0	509	10	27	56	62:38
6		11,4	533	11	31	53	71:29
7		12,9	519	9,5	27,7	57,9	70:30
8	Suecia	13,0	510	9,6	27	56,1	70:30
9		13,0	509	10	27	56	62:38
10		12,9	512	10,6	26,4	55	66:34
11	Republica Checa	13,5	485	9,6	25	53,7	60:40
12		13,5	485	9,7	24,7	54,1	60:40
13		13,8	496	10,4	23,2	61,3	50:50

FR: Factor de reconstitución, PL: preparado para lactante.

ANEXO VI: Cálculo de ingestas en función del grupo de edad

La ingesta diaria de los compuestos bioactivos se calcula a partir de: I) El contenido de los compuestos bioactivos a estudio en LH y PL (ver Tablas de resultados). II) La ingesta diaria de LH (g/día) y PL (mL/día), obtenida de estudios bibliográficos, en función de los diferentes grupos de edad que se muestra en los apartados A y B siguientes.

A) Leche humana (ingestas en g/día)

	n	Calostro (0-5 días)	Transición (6-15 días)	1 mes (16-60 días)	3 meses (61-135 días)	6 meses (136-240 días)	9 meses (241-330 días)	12 meses (331-420 días)
Neville et al., 1988	13	309±191	586±44	700±41	722±16	737±90	574±38	403±250
Wong et al., 1993	6	-	-	-	846±31	-	-	-
Haisma et al., 2003	51	-	-	-	792±20	-	-	-
Reilly et al., 2005	1211	-	-	-	795±48	852±80	-	-
Da Costa et al., 2010	737	-	-	650±70	790±40	780±40	865±127	795±163
Nielsen et al., 2011	38	-	-	-	923±122	997±142	-	-
Wells et al., 2012	100	-	-	-	-	859±59	-	-
Total:	2156	309±191	586±44	675±36	811±67	845±99	720±205	599±277

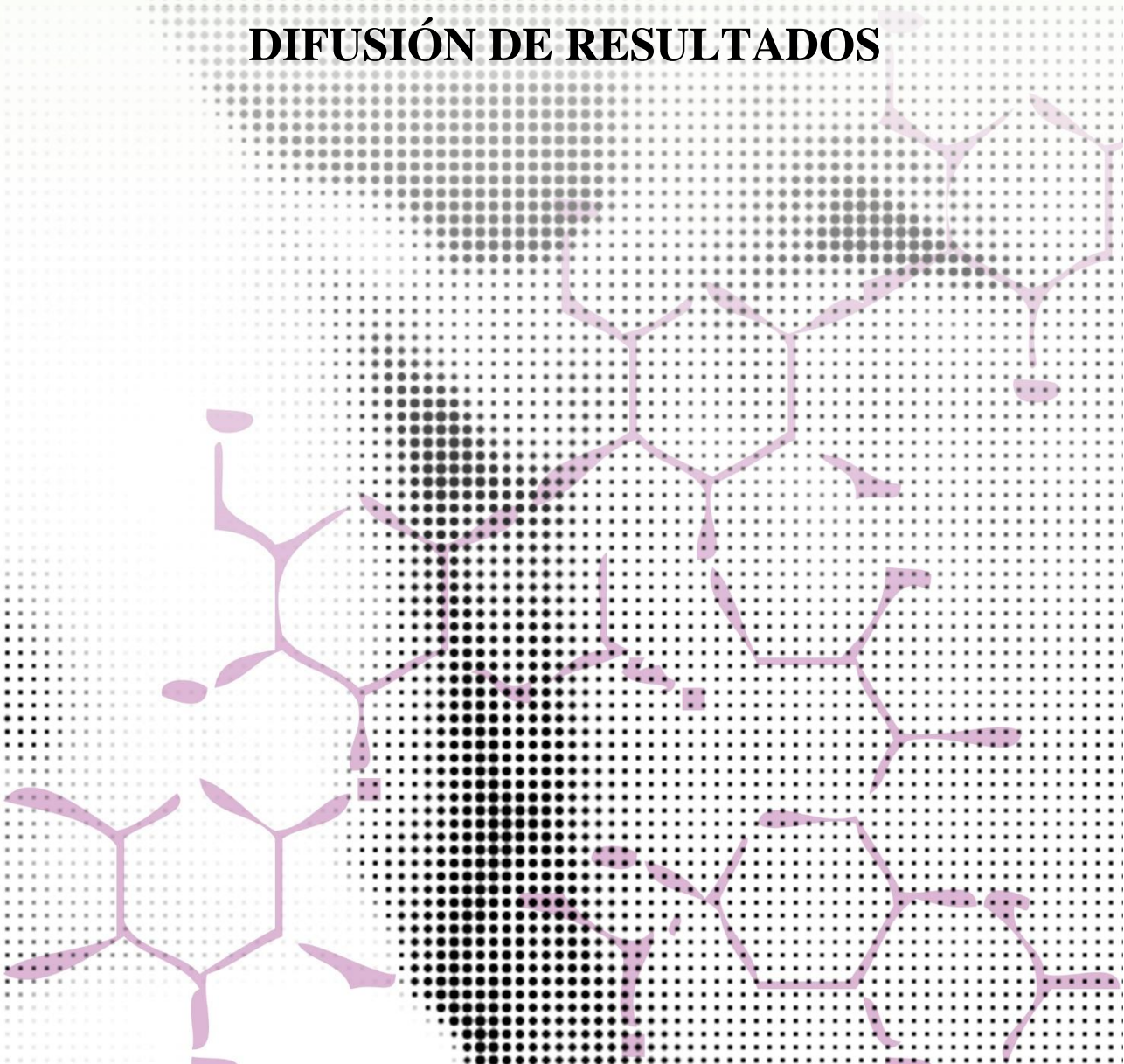
n: número de lactantes

B) Preparados para lactantes (ingestas en mL/día)

	n	0,5 meses	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses
Weizman et al., 2006	59	-	666±86	-	-	-	-	-
Ben et al., 2008	82	-	726±13	922±19	1118±26	-	-	-
Chouraqui et al., 2008	210	585	680	700	730	750	-	-
Sandstrom et al., 2008	62	-	831±45	882±51	920±36	991±67	981±34	883±42
Luque Moreno, 2010	551	-	743±148	798±144	832±150	888±160	1052±246	1168±275
Lasekan et al., 2011	97	629	686	-	-	912	-	-
Mennella et al., 2011	32	-	950	1085	997	1126	937	804
Salvini et al., 2011	20	-	-	-	773±108	-	-	638±229
Total:	1113	607±31	754±112	877±158	895±160	933±157	990±31	873±125

n: número de lactantes

DIFUSIÓN DE RESULTADOS



Sterol Composition in Infant Formulas and Estimated Intake

Lorena Claumarchirant,[†] Esther Matencio,[‡] Luis Manuel Sanchez-Siles,[‡] Amparo Alegría,[†] and María Jesús Lagarda^{*,†}

[†]Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avenida Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

[‡]R+D Department, Hero Group, Avenida Murcia 1, 30820 Alcantarilla, Murcia, Spain

ABSTRACT: Sterol contents in infant formulas (IFs) from the European market were determined, and their intakes by infants between 0 and 6 months were evaluated. Total animal sterols (mg/100 mL) ranged from 1.71 to 5.46, cholesterol being the main animal sterol (1.46–5.1). In general, cholesterol and desmosterol were lower than the human milk (HM) values indicated by other authors. Total plant sterol (mg/100 mL) ranged from 3.1 to 5.0. β -Sitosterol, the most abundant phytosterol, ranged from 1.82 to 3.01, followed by campesterol (0.72–1.15), stigmasterol (0.27–0.53), and brassicasterol (0.14–0.28). Cholesterol intake (mg/day) ranged from 9 to 51 and plant sterol intake (mg/day) from 19 to 50. The sterol profile of IFs is highly dependent on the type and quantity of fats used in their formula. The use of bovine milk fat and milk fat globule membrane in the IFs can approximate the profile of animal sterols to those found in HM, though cholesterol intakes in breastfed infants are still higher than in formula-fed infants.

KEYWORDS: cholesterol, plant sterols, infant formula, intake, milk fat globule membrane, bovine milk fat

■ INTRODUCTION

Breast milk is considered the gold standard of infant nutrition. Human milk (HM) contains an abundance of bioactive components that are highly likely to contribute to the short- and long-term benefits of breastfeeding.¹

Many factors condition variability in human milk, including the lactation period during the course of the day and within each feeding, the diet and nutritional status of the mother, genetics factors, and possibly also infant factors such as sex.² This variability has benefits for infant health and at the same time makes it almost impossible to copy its unique composition.

In HM, the milk fat globule membrane (MFGM) contains many constituents typical of biological membranes such as phospholipids, cholesterol, and glycolipids, among others. Cholesterol is the major sterol in HM, and other animal and plant sterols are also described in the literature.³ The functional benefits of these sterols in infant nutrition are not fully understood. Cholesterol is an essential component of cell membranes, and is the main component of nerve cell membrane lipids. Apart from its role as a structural component, cholesterol is a precursor of bile acids and steroid hormones.⁴ During the past decades, there have been a growing number of papers published in relevant scientific journals attempting to explain the relationship between cholesterol intake from HM and the possible prevention of cardiovascular diseases in adulthood. In this sense, Owen et al.,⁵ in a systematic review of 17 observational studies, concluded that breastfeeding (particularly exclusive breastfeeding) may be associated with lower blood cholesterol in later life. In this regard, the authors considered that higher levels of cholesterol in human milk could explain lower cholesterol concentrations in blood in later life. Similarly, Harit et al.⁶ argued that, in early infancy, the higher serum total cholesterol and LDL-cholesterol contents in

exclusively breastfed infants may be physiological and useful for cognitive development and the programming of lipid metabolism in later life. However, Koletzko et al.⁷ observed discrepancies between the results of different studies regarding the long-term cardiovascular benefits of breastfeeding. These discrepancies have been attributed to the designs of the studies, or to unknown biases introduced in observational studies, as well as to difficulties in assessing exclusive breastfeeding and its duration. The authors therefore concluded that the implications of breastfeeding in relation to cholesterol intake upon cardiovascular health over the long-term remain uncertain.

On the other hand, plant sterols inhibit cholesterol absorption in the gut by competing for space in micelles.⁸ Thus, the tendency to reduce the cholesterol content of IFs should be undertaken with caution, because it could interfere with possible beneficial effects in terms of nutritional programming.⁵

When breastfeeding is not possible, infant milk formulas serve as an adequate substitute for HM. As far as we know, there are few data about the sterol composition of IFs.^{9–14} Considering the above, the present study was carried out to determine the sterol contents (of both animal and plant origin) in several infant formulas found on the European market, and to evaluate the influence of MFGM-rich ingredients in affording the sterol contents present in human milk (gold standard). In addition, the sterol intake by infants fed with these formulas was estimated.

Received: May 28, 2015

Revised: July 29, 2015

Accepted: August 5, 2015

Published: August 5, 2015



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/idaairyj

Addition of milk fat globule membrane as an ingredient of infant formulas for resembling the polar lipids of human milk



Lorena Claumarchirant ^a, Antonio Cilla ^a, Esther Matencio ^b, Luis Manuel Sanchez-Siles ^b, Pilar Castro-Gomez ^c, Javier Fontecha ^c, Amparo Alegría ^a, María Jesús Lagarda ^{a,*}

^a Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

^b Hero Institute of Infant Nutrition, Hero Group, Avda. Murcia 1, 30820 Alcantarilla, Murcia, Spain

^c Institute of Food Science Research (CIAL; CSIC-UAM), Lipid Group, Madrid Autonomous University, c/ Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 March 2016

Received in revised form

8 June 2016

Accepted 8 June 2016

Available online 26 June 2016

ABSTRACT

Polar lipid (PL) contents in human milk (HM) from two different geographic zones in Spain (central and coastal) were determined. These PLs were also analysed in several infant formulas (IFs), three of which contained milk fat globule membrane (MFGM), an ingredient used to resemble the PL profile of HM. Total PL in HM decreased significantly ($p < 0.05$) from transitional milk ($48.62 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$) to 6 months ($28.66 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$). In HM, sphingomyelin was the most abundant PL, followed by phosphatidylethanolamine; in IFs the most abundant PL was phosphatidylethanolamine. Only IFs with MFGM (54.79 – $58.07 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$) could supply the total and individual PL content present in all lactation periods, with the exception of sphingomyelin, which did not match the content in transitional milk. PL intake by infants fed HM or IFs was determined to be 96 – 306 and 152 – 575 mg day^{-1} , respectively.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Human milk (HM) is considered the optimal food for infants during the first 6 months of life (Kramer & Kakuma, 2001). The lipid fraction, in addition to representing almost 50% of the dietary calories, provides bioactive compounds localised in the fat globules as polar lipids (PLs), cholesterol, enzymes, proteins, glycoproteins and glycosphingolipids (cerebrosides and gangliosides) (German & Dillard, 2006).

The PLs phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS) and sphingomyelin (SM) are quantitatively minor constituents of HM fat globules, but they have interesting nutritional properties and are important structural components. Furthermore, they also afford long chain polyunsaturated fatty acids, which play an essential role in the growth and brain development of newborns infants (Wang et al., 2000). Of these PLs, the PC and SM contents are considered to be of great importance for the development of infants, acting as precursors of intracellular messengers such as ceramides and diacylglycerols (Zeisel & Blusztajn, 1994).

Furthermore, approximately 17% of the total choline received by the newborn infant comes from these PLs (PC and SM), while the remaining choline is found in free form as phosphocholine and glycerophosphocholine (Holmes, Snodgrass, & Iles, 2000; Holmes-McNary, Wei-Ling Cheng, Mar, Fussell, & Zeisel, 1996; Ilcol, Ozbek, Hamurtekin, & Ulus, 2005). Choline is an essential nutrient involved in several biological processes, mainly metabolism, but also membrane construction in the brain and nervous tissue (Zeisel, 2000). The choline content is secreted into HM from the maternal circulation, and increases during lactation, because neonates require large amounts of this compound for rapid organ growth and membrane biosynthesis. In this regard, the recommended choline intake in the postnatal period is about 125 and 150 mg day^{-1} at 0–6 months and 6–12 months, respectively (IOM, 2006).

Several authors have reported the PL content in HM in the different stages of lactation in Asian women (Giuffrida et al., 2013; Thakkar et al., 2013; Wang et al., 2000) and in women in northern Europe (García et al., 2012; Harzer, Haug, Dieterich, & Gentner, 1983; Lopez & Ménard, 2011; Zou et al., 2012). Nevertheless, we found only one study in southern Europe focussing on the content and composition of PLs in the different stages of lactation (Sala-Vila, Castellote, Rodríguez-Palmero, Campoy, & López-Sabater, 2005).

* Corresponding author. Tel.: +34 963544909.

E-mail address: m.j.lagarda@uv.es (M.J. Lagarda).

Evaluation of Sialic Acid in Infant Feeding: Contents and Bioavailability

Lorena Claumarchirant,[†] Luis Manuel Sanchez-Siles,[§] Esther Matencio,[§] Amparo Alegría,[†] and María Jesús Lagarda^{*,†}

[†]Nutrition and Food Science Area, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avenida Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot (Valencia), Spain

[§]Hero Institute of Infant Nutrition, Hero Group, Avenida Murcia 1, 30820 Alcantarilla (Murcia), Spain

ABSTRACT: Sialic acid (Sia) contents and bioaccessibility (BA) in human milk (HM) and infant formulas (IFs) were determined, and Sia intakes by infants between 0 and 6 months of age were evaluated. Total Sia contents in HM decreased during lactation from 136.14 to 24.47 mg/100 mL. The total Sia contents in IFs (13.15–25.78 mg/100 mL) were lower than in HM and were not related to the addition of ingredients acting as sources of Sia in their formulation. The Sia intakes derived from IF consumption were lower than in HM, and only one IF reached the intakes provided by HM from the age of 2 months. Despite the lower total Sia content in IFs, the BA of Sia in IFs (88.08–92.96%) was significantly greater than in mature HM (72.51%) and similar to that found in colostrum (96.43%). However, the Sia contents in the available soluble fraction of IFs did not reach those provided by HM.

KEYWORDS: bioaccessibility, human milk, infant formulas, sialic acid

INTRODUCTION

Human milk (HM) is the optimum food during the first months of life of the newborn infant, but when breastfeeding is not possible, many infants are fed infant formulas (IFs). Sialic acids (*N*-acetylneuraminic acid (NeuSAc) and *N*-glycolylneuraminic acid (NeuSGc) being the main representative forms) are found free or mainly conjugated (sialoglycoconjugated) to oligosaccharides, glycoproteins, or glycolipids (gangliosides). Most of the sialic acid (Sia) in mature HM is bound to oligosaccharides (69–76%), a smaller fraction is bound to proteins (21–28%), and only 3% present in the free form and bound to gangliosides.¹ In the case of the IFs, most of the Sia is bound to protein (70%), some is bound to oligosaccharides (27.8%), and only 0.9% is found in the free form.² In HM, NeuSAc is the predominant form of Sia, and NeuSGc is usually absent. In comparison, the Sia contents in IFs depend on the Sia from the bovine or caprine milks used to manufacture these products, which contain approximately 5%³ or 57%⁴ NeuSGc, respectively, and have been shown to contain <25% of the total Sia contents found in mature HM.²

It has been hypothesized from animal studies that due to the immaturity of the metabolic system of newborn infants, they might have a lower capacity for synthesizing *de novo* Sia. Therefore, the intake of this compound is important for correct development during the first stages of life.^{1,3,5} The main roles of Sia are related to cellular recognition and communication, with participation in pathogen adhesion mechanisms, acting as false receptors of viruses and bacteria,^{6,7} and to development of the digestive and nervous systems (improvement of learning and memory).³

Sialic acids are bioactive compounds present in HM (9–155 mg/100 mL)^{2,5,8–16} and in lesser concentrations in IFs (6.5–32.5 mg/100 mL).^{2,4,5,8,10,13,17–22} The differences in Sia concentrations may be related to different factors such as the

stage of lactation of HM, ingredients used in the formulation of IFs, or the analytical methodology used (spectrophotometric and HPLC methods) among others. From nutritional and functional points of view, it is interesting to know not only the Sia contents in infant foods and the intakes but also the bioavailability (i.e., the fraction of an ingested nutrient or bioactive compound that is available for use in physiological functions or for storage). The first step defining bioavailability is bioaccessibility, this being understood as the fraction of a compound that is released from its matrix within the gastrointestinal tract and thus becomes available for intestinal absorption. The determination of the soluble compounds fraction in simulated gastrointestinal digestion allows us to estimate the relative availability of compounds from food, and this constitutes a predictor of potential Sia bioavailability.^{2,3} With regard to the mechanism of absorption of dietic Sia, very little is known. However, in Caco-2 cells, a validated model of intestinal epithelium, absorption via pinocytosis, and specific lysosomal transporter of Sia has been suggested.²⁴ Animal studies show that the ratio of absorption and excretion is dependent on the nature of the molecule to which it is attached and the retention time in the intestine. Sia is absorbed more rapidly (1.5 h earlier) when it is in free form than when it is bound to other structures (oligosaccharides and proteins).²⁵

As far as we know, only one study, conducted by our research group, has examined bioaccessibility in infant foods (IFs, follow-on formulas, and HM) through a simulated digestion model involving only two steps (gastric and intestinal).²⁶ To more closely correlate the digestion process to the *in vivo*

Received: July 22, 2016

Revised: October 14, 2016

Accepted: October 18, 2016

Published: October 18, 2016

Per a: Amparo.Alegria@uv.es
Assumpte: RE:_RE:_RE:_Publicación:_Claumarchirant_et_al
Reply-to: actapediatrica@edicionesmayo.es
De: Mónica_Noguerol <actapediatrica@edicionesmayo.es>
Data: Mon, 9 Jan 2017 15:39:22 +0100

Apreciada Dra. Alegría:

Le comunico que su artículo (MFGM (ingrediente rico en membrana del glóbulo graso de la leche) como fuente de gangliósidos en preparados para lactantes) ha sido definitivamente aceptado en su versión actual para su publicación en *Acta Pediátrica Española*. La fecha aproximada de publicación será el número de marzo de 2017.

Muchas gracias por su colaboración.

Un cordial saludo,

Mónica Noguerol

Coordinadora editorial

EDICIONES MAYO, S.A.

c/ Aribau, 168-170, 5ª planta
08036 Barcelona
T: 93 209 02 55
F: 93 202 06 43
actapediatrica@edicionesmayo.es
www.actapediatrica.es
[image: suscribete] <<http://www.actapediatrica.com/suscribirse.html>>
@actapediatrica

[image: firma email]

22-Jan-2017

Dear Dr Lagarda,

Ref: Sterols in infant formulas: validation of a gas chromatographic method

In view of comments from the referees I am pleased to accept your paper in its current form. The manuscript will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting. The reviewer comments are included at the bottom of this letter.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course.

The publisher also requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for submitting your work to International Journal of Food Sciences and Nutrition and we look forward to receiving further submissions from you.

Kind regards

Daniele Del Rio

The Laboratory of Phytochemicals in Physiology

Department of Food & Drug

University of Parma

Editor in Chief

International Journal of Food Sciences and Nutrition



Sterols in infant formulas: validation of a gas chromatographic method

Journal:	<i>International Journal of Food Sciences and Nutrition</i>
Manuscript ID	CIJF-2016-1095.R1
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Hamdan, Islam; Universidad de Valencia, Nutrición y Bromatología Claumarchirant, Lorena; Universidad de Valencia, Nutrición y Bromatología García-Llatas, Guadalupe; Universidad de Valencia, Nutrición y Bromatología Alegria, Amparo; Universidad de Valencia, Nutrición y Bromatología Lagarda, María Jesús; Universidad de Valencia, Nutrición y Bromatología
Keywords:	Cholesterol, Infant formula, Plant sterols, method validation, Gas chromatography

SCHOLARONE™
Manuscripts

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/cijf> Email: daniele.delrio@unipr.it

Participación en congresos.

♦ Nacionales:

→ Autores: I. Hamdam, **L. Claumarchirant**, G. García-Llatas, M.J. Lagarda.
Título: Esteroles en leche humana y productos destinados a la alimentación del lactante
Congreso: I Nacional de Estudiantes de Ciencia y Tecnología de los Alimentos,
Participación: Póster.
Lugar de realización: Valencia (España), 2 abril 2014

→ Autores: E. Matencio, **L. Claumarchirant**, M.J. Lagarda, R. Barberá, A. Alegría, G. García-Llatas, F. Granado, L.M. Sánchez Siles.
Título: Lípidos bioactivos en fórmulas infantiles y leche materna
Congreso: XIV de la Sociedad Española de Investigación en Nutrición y Alimentación en Pediatría
Participación: Comunicación oral.
Lugar de realización: Madrid (España), 3-4 octubre 2014

→ Autores: M.D. Iniesta, **L. Claumarchirant**, E. Matencio, M.J. Lagarda, M.P. Castro-Gómez, J. Fontecha, A. Alegría, G. García-Llatas, R. Barberá, L.M. Sánchez Siles.
Título: Compuestos lipídicos bioactivos en formulas infantiles vs leche materna. Estudio comparativo
Congreso: XV de la Sociedad Española de Investigación en Nutrición y Alimentación en Pediatría
Participación: Comunicación oral.
Lugar de realización: Madrid (España), 25-26 septiembre 2015

♦ Internacionales:

→ Autores: **L. Claumarchirant**, E. Galán, G. García-Llatas, E. Matencio, A. Alegría, M.J. Lagarda.
Título: Sialic acids in human milk: in vitro accessibility study
Congreso: 20th International of Nutrition
Participación: Póster.
Lugar de realización: Granada (España), 15-20 septiembre 2013.

→ Autores: **Claumarchirant, L.**, Alegría, A., Lagarda. M.J.
Título: Determination of sterols in infant formulas
Congreso: IX Internacional de Nutrición, Alimentación y Dietética
Participación: Póster.
Lugar de realización: Madrid (España), 19-21 marzo 2014

→ Autores: **L. Claumarchirant**, I.J.A. Hamdam, G. García-Llatas, A. Alegría, L.M. Sánchez Siles, E. Matencio, M:J. Lagarda.

Título: Sterol Content and intake estimation from infant formulas

Congreso: 12th Euro Fed Lipid

Participación: Póster.

Lugar de realización: Montpellier (Francia), 14-17 septiembre 2014

→ Autores: **L. Claumarchirant**, I.J.A. Hamdam, G. García-Llatas, M:J. Lagarda.

Título: Validation of a GC method for sterol quantification in infant formulas

Congreso: 12th Euro Fed Lipid

Participación: Póster.

Lugar de realización: Montpellier (Francia), septiembre 2014

→ Autores: I.J.A. Hamdam, **L. Claumarchirant**, G. García-Llatas, M:J. Lagarda

Título: Determination of sterols in human milk and infant formulas: literature review

Congreso: II National & I International student of food science & technology.

Participación: Póster.

Lugar de realización: Valencia (España), 5-6 marzo 2015

→ Autores: L. Perea, **L. Claumarchirant**, G. García-Llatas, M:J. Lagarda

Título: Benefits of breastfeeding: A review of infants epidemiology related with nutrition

Congreso: II National & I International student of food science & technology.

Participación: Póster.

Lugar de realización: Valencia (España), 5-6 marzo 2015

→ Autores: **L. Claumarchirant**, L.M. Sánchez-Siles, E. Matencio, A. Alegría, M.J. Lagarda.

Título: Sialic acid content in infant formulas and the intake estimation in three european countries

Congreso: 48th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition

Participación: Póster.

Lugar de realización: Amsterdam (Holanda), 6-9 mayo 2015

→ Autores: **L. Claumarchirant**, L.M. Sánchez-Siles, E. Matencio, A. Alegría, M.J. Lagarda.

Título: Gangliosides content in infant formulas from three European countries and the intake estimation

Congreso: 48th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition

Participación: Póster.

Lugar de realización: Amsterdam (Holanda), 6-9 mayo 2015

→ Autores: **L. Claumarchirant**, A. Cilla, L.M. Sánchez-Siles, E. Matencio, P. Castro-Gómez, J. Fontecha, A. Alegría.

Título: Phospholipid content in European infant formulas

Congreso: XVIII Euro Food Chem

Participación: Póster.

Lugar de realización: Madrid (España), 13-16 octubre 2015

→ Autores: S.I. Rivas, **L. Claumarchirant**, A. Alegría, M.J. Lagarda

Título: Sialic acids content in human milk and infant formulas

Congreso: III National & II International student of food science & technology.

Participación: Póster.

Lugar de realización: Valencia (España), 3-4 marzo 2016

→ Autores: **L. Claumarchirant**, S.I. Rivas, L.M. Sánchez-Siles, A. Alegría, M.J. Lagarda

Título: Bioaccessibility of sialic acids in human milk and MFGM enriched infant formula

Congreso: 1st Food Chemistry

Participación: Póster

Lugar de realización: Amsterdam (Holanda), 30 octubre-1 noviembre 2016