

DIGESTIÓN *IN VITRO* DE GRASAS EN PACIENTES SOMETIDOS A TERAPIA DE SUSTITUCIÓN ENZIMÁTICA: PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO Y ENSAYOS DE DIGESTIÓN DE LECHE.

Joaquim Calvo Lerma, Ana B Heredia Gutiérrez¹ y Ana M Andrés Grau¹

RESUMEN

El óptimo ajuste de la Terapia de Sustitución Enzimática en pacientes con insuficiencia pancreática sigue siendo un desafío. Actualmente no existen estudios que permitan adaptar las dosis de suplemento enzimático en función del tipo de alimento ingerido, y por ende no es posible establecer recomendaciones basadas en la evidencia que aseguren la efectividad del tratamiento. Como consecuencia, son habituales en estos pacientes los problemas de maldigestión, malabsorción y de estancamiento de peso. A través de este trabajo se ha puesto a punto un protocolo para simular la digestión *in vitro* de matrices alimentarias en individuos sometidos a Terapia de Sustitución Enzimática. Asimismo se ha analizado el efecto de la relación enzima/sustrato utilizada y del pH en la etapa intestinal como factores determinantes en el proceso de digestión de la grasa en leche. Se ha observado que la cinética de reacción se divide en tres etapas: adsorción de las enzimas a la superficie del sustrato, período de plena actividad enzimática o de velocidad de hidrólisis lineal y etapa de velocidad decreciente y se han estimado y modelizado los parámetros característicos que describen cada una de estas etapas. El pH del medio resultó el principal determinante tanto en la cinética como en la extensión de la reacción. Asimismo, es la relación enzima/sustrato y no solo la concentración de enzima, otro de las variables clave para modular y optimizar la digestibilidad de las grasas en pacientes sometidos a Terapia de Sustitución Enzimática.

PALABRAS CLAVE: pancreatina, lipólisis, enzimas encapsulados, digestión *in vitro*, curvas de digestibilidad, suplementación enzimática, insuficiencia pancreática, método pH-stat.

RESUM

L'òptim ajust de la Teràpia de Substitució Enzimàtica en pacients amb insuficiència pancreàtica continua sent un repte. Actualment no existeixen estudis que permeten adaptar la dosi de suplement enzimàtic en funció del tipus d'aliment ingerit, i per tant no és possible establir recomanacions basades en l'evidència que assegurin l'efectivitat del tractament. Com a

¹ Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IU-IAD). Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

conseqüència d'açò, són habituals en estos pacients els problemes de maldigestió, malabsorció i estancament de pes. A través d'este treball s'ha posat a punt un protocol per tal de simular la digestió *in vitro* de matrius alimentàries en individus sotmesos a teràpia de substitució enzimàtica. Així mateix, s'ha analitzat l'efecte de la relació enzim/substrat utilitzada i del pH en l'etapa intestinal com factors determinants en el procés de digestió del greix de la llet. S'ha observat que la cinètica de reacció es divideix en tres trams: adsorció d'enzims a la superfície del substrat, període de plena activitat enzimàtica o de velocitat d'hidròlisi lineal i tram de velocitat decreixent; a més s'han estimat i modelitzat els paràmetres característics que descriuen cadascuna d'aquestes etapes. El pH del medi va resultar ser el principal determinant tant en la cinètica com en l'extensió de la reacció. Així mateix, és la relació enzim/substrat i no solament la concentració d'enzim una altra de les variables clau per modular i optimitzar la digestibilitat dels greixos en pacients sotmesos a Teràpia de Substitució Enzimàtica.

ABSTRACT

The optimal adjustment of the Enzyme Replacement Therapy in patients suffering from pancreatic insufficiency remains a challenge. Currently there are no studies allowing for the adjustment of the enzymatic supplements dosage to the ingested food characteristics, and thus, it is not possible to establish evidence based recommendations that ensure the effectiveness of the treatment. Consequently, maldigestion, malabsorption and weight gain problems are common among these patients. Along the present study, a protocol has been set up for the simulation of food matrices *in vitro* digestions in individuals undergoing the enzyme replacement therapy. Additionally it has been analysed the effect of both different enzyme/substrate ratios and pH in the intestinal stage as determinant factors in the lipids of milk digestion process. It has been observed that kinetics of the reaction is divided into three phases, these being: adsorption of the enzymes to the surface of the substrate, period of full activity of the enzymes or lineal rate hydrolysis period, and decreasing rate phase; also it has been estimated and modeled the characterising parameters that describe each of the three phases. The pH value in the medium resulted the main determinant both in the kinetics and in the extension of the reaction. As well, it is the enzyme/substrate ratio, and not just the enzyme concentration, another key variable for the modulating and optimisation of the fats digestibility in patients following the Enzyme Replacement Therapy.

1. INTRODUCCIÓN

Los pacientes pediátricos que sufren insuficiencia pancreática crónica, presentan maldigestión de los alimentos y malabsorción de nutrientes (Bruno et al., 1995); la malnutrición y el estancamiento de peso solo pueden ser evitados a través de un intensivo seguimiento nutricional más una ajustada terapia de sustitución enzimática (TSE) (Borowitz et al., 2002). Si la dosis de enzimas suministradas en una comida no es la suficiente, la digestión de la grasa no es completa y por tanto, parte de la misma será eliminada junto con las heces. Este hecho puede ir acompañado de dolor abdominal e implica además el arrastre de vitaminas liposolubles impidiendo su absorción (Borowitz et al., 2002).

La terapia de sustitución enzimática (TSE) consiste hoy en día en la ingesta de cápsulas que contienen diferentes dosis de pancreatina. La pancreatina, producida por el páncreas, se compone de amilasa, proteasas y en especial de lipasa. Las enzimas se presentan en formato de gránulos recubiertos por una película de gelatina resistente al pH ácido del estómago, y que se disuelve a pH duodenal más alcalino para que llegados a ese punto las enzimas puedan ejercer su función hidrolítica (Feiker et al., 2011). A nuestro conocimiento no existe actualmente ningún modelo o patrón que permita ajustar de forma personalizada y adaptada a las características de cada comida, la dosis de enzimas que se deben ingerir para una completa digestión de las grasas.

La óptima digestión y absorción de nutrientes sólo se puede conseguir a través de una dosificación adecuada de la suplementación enzimática. Las recomendaciones actuales se basan en evidencia limitada, puesto que no se han realizado estudios para averiguar los factores determinantes en la efectividad de la terapia (Feiker et al., 2011). Las dosis de enzimas óptimas por comida se desconocen y se establece una dosis diaria máxima por kilo de peso del paciente (Feiker et al., 2011). Sin embargo, la realidad es que estas pautas son insuficientes, puesto que factores individuales como el tiempo de vaciado gástrico, condiciones de acidez, tránsito intestinal etc., así como características inherentes a los alimentos como la matriz alimentaria y el tipo de grasa, influyen finalmente en la digestibilidad de las grasas (Borowitz et al., 2013), (Rovner et al., 2013). En individuos con insuficiencia pancreática los factores individuales se caracterizan por una disminución de secreción de bicarbonato sódico y sales biliares al intestino delgado debido a la obstrucción del conducto pancreático por el que acceden (Whitcomb et al., 2010), (Layer y Keller, 2003). En consecuencia, el pH en este tramo del tracto es más ácido que en individuos sanos, aunque el valor de pH estará condicionado por el grado de obstrucción en cada individuo. Adicionalmente, el tránsito intestinal se encuentra acelerado por desajustes hormonales derivados de la maldigestión y el tiempo de vaciado gástrico está aumentado, así como la secreción ácida del mismo (Rovner et al., 2013).

Así pues, como ya han identificado otros autores (Hu et al., 2010), (Feiker et al., 2011), (Li et al., 2011), es necesaria la generación de conocimiento en esta nueva área, que contribuya a la mejora y la adecuación del ajuste de la terapia de suplementación enzimática en individuos con insuficiencia pancreática. Las aportaciones que en este sentido se pueden hacer desde el área de la Tecnología de Alimentos están relacionadas con la influencia que el tipo de alimento (composición y microestructura) y el tipo de grasa tienen en la digestibilidad y en consecuencia, en la eficacia del tratamiento con suplementos enzimáticos.

Los experimentos de digestibilidad *in vitro* suponen una aproximación útil para abordar el estudio de la influencia de los factores implicados en la digestibilidad de la grasa de los alimentos, ya que permiten la reproducción del proceso gastrointestinal fisiológico de forma controlada y reproducible (Hu et al., 2010), (Li et al., 2011). De este modo es posible conocer el estado de la reacción en cada punto del proceso y atribuir los resultados únicamente a las condiciones del análisis. Contrariamente, en los estudios *in vivo*, sólo es posible evaluar el punto final de la reacción sin posibilidad de monitorizar el resto del proceso. Los estudios *in vivo* en este campo, por tanto, serían recomendables únicamente una vez caracterizada la influencia de los factores determinantes en la digestibilidad (Ménard et al., 2014), para dar el siguiente paso hacia el estudio de los factores individuales que también condicionan la pauta y la dosis de administración de los suplementos enzimáticos.

El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo experimental de digestión *in vitro* que simule el proceso digestivo de individuos con insuficiencia pancreática y evaluar, una vez puesto a punto el método, el efecto del pH intestinal y relación enzima: sustrato (R) sobre la digestibilidad de la grasa en un alimento real como es la leche.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material y Equipos

MATERIALES

La matriz alimentaria que se utilizó para la puesta a punto del método y el estudio de digestión *in vitro* fue leche concentrada (Ideal, Nestle); se seleccionó por su alto contenido en grasa (6 % en peso) y por tratarse de una matriz naturalmente emulsionada. Como materiales para la digestión se utilizó pepsina procedente de mucosa gástrica porcina suministrada por Sigma Chemicals y suplementos enzimáticos de pancreatina de origen porcino (Kreon®, Abbott). El suplemento enzimático se presenta en formato de gránulos recubiertos de una película entérica de gelatina, y contenidos en el interior de una cápsula que los vehiculiza. Los suplementos están

disponibles en dos dosificaciones a nivel comercial, de 10.000 y 25.000 unidades de lipasa (UL). Los reactivos utilizados, HCl 2N y NaOH 0.5N, fueron adquiridos en AppliChem Pancreac.

EQUIPOS

Para los estudios de digestibilidad *in vitro* en el estómago e intestino delgado se utilizó el equipo 718 STAT Titrino de la casa Methrom, conectado al software informático Tiamo 1.3. Se trata de un equipo que permite automatizar reacciones ácido-base. Para ello, se introduce la muestra en un vaso analizador conectado a un baño termostatado para conducir la reacción a la temperatura de trabajo deseada. En el vaso analizador se encuentra, a su vez, una sonda de temperatura y pH, y un dosificador automático con el valorante (ácido o base). El software del equipo permite configurar diferentes métodos de trabajo seleccionando el tipo de análisis y parámetros específicos de cada uno, a través de un diagrama de flujo, que ilustra cada una de las etapas y cuyos parámetros se ajustan individualmente. Las funciones que comprende el análisis son “*measure pH*” en la que mide el pH del medio, “*set pH*” para que el equipo añada el volumen de valorante necesario para alcanzar el pH seleccionado como punto de partida y “*pH-stat*” para que el equipo añada valorante cuando se producen cambios de pH en el medio debido a la reacción que está ocurriendo y mantener así siempre el pH constante fijado en “*set-pH*”. A medida que avanza el análisis, el equipo va registrando el consumo de valorante en función del tiempo. Posteriormente el volumen de valorante consumido al final del análisis se correlaciona con la cantidad de producto de reacción liberado. En este caso concretamente, la hidrólisis de los glóbulos grasos del sustrato por acción de la enzima libera ácidos grasos al medio provocando una bajada de pH que se compensa con una adición de NaOH 0.5N (valorante).

2.2. Metodología experimental

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se planteó analizar la influencia de dos factores: pH intestinal y relación enzima/sustrato (R) sobre la cinética de digestión enzimática de la grasa láctea. Para el primer factor se seleccionaron 3 niveles: pH 5, 6 y 7; y para el segundo 6 (**TABLA 1**). Estas relaciones se establecieron en base a 3 concentraciones enzimáticas consideradas en bibliografía como nivel de suplementación bajo, medio y alto (500, 1800 y 4000 UL por gramo de grasa) (Escobar et al., 2005). De acuerdo con esta referencia, las relaciones enzima/sustrato R1, R3 y R5 corresponden a la recomendación, mientras que en las R2, R4 y R6 la dosis de enzimas correspondería a un 75% con respecto a la recomendación. Cada una de las condiciones ensayadas se llevó a cabo por duplicado.

TABLA 1. Relaciones enzima/sustrato con las que se han llevado a cabo los experimentos

	<i>UL</i>	<i>Sustrato (g)</i>	<i>Pancreatina (g)</i>	<i>Relación enzima/sustrato (R)</i>
R1	8400	2	0,1008	0,048
R2	8400	3	0,1008	0,032
R3	3700	2	0,0450	0,021
R4	3700	3	0,0450	0,014
R5	1050	2	0,0126	0,006
R6	1050	3	0,0126	0,004

DIGESTIÓN IN VITRO

La simulación in vitro consistió en emular dos etapas del proceso digestivo: gástrica e intestinal bajo las condiciones descritas a continuación. Durante todo el análisis la muestra se mantuvo en el interior del vaso analizador a temperatura de 37°C y agitación suave (100 rpm), (Lesmes y McClements, 2012).

Etapas gástrica

Para preparar el líquido estomacal simulado (LES) se diluyeron 5.6 mg de pepsina en 10 mL de suero salino fisiológico 0.9% (Gallier et al., 2012) para una completa digestión de las proteínas presentes en la muestra. A continuación, se añadió el LES a la muestra en una relación muestra: LES de 0.38:1 (v/v) y se ajustó el pH a 2.0 con HCl 2N (Gallier et al., 2012). Se fijó la duración de esta etapa en 20 min, ya que, teniendo en cuenta el volumen de la muestra utilizada, se estima que es el tiempo de permanencia del alimento en el estómago (Vu et al., 2000). La función “*measure pH*” se utilizó para comprobar la estabilidad del pH a lo largo de esta etapa.

Etapas intestinal

Transcurrida la etapa anterior, el 718 STAT Titrino ajustó el pH de la muestra adicionando NaOH como valorante hasta el valor deseado (5, 6 o 7) en “*set pH*”. Una vez ajustado el pH, se utilizó la función “*pH-stat*” que permite mantenerlo constante, simulando así el pH intestinal al cual trabajará la enzima. De esta forma, se compensa la disminución de pH debida a la liberación de ácidos grasos libres (AGL) al medio como consecuencia de la hidrólisis de las grasas. La duración de esta etapa fue de 150 minutos, correspondiente al sumatorio de la duración estándar de la fase duodenal (20 min) y el tiempo de tránsito en otros tramos del intestino en el que puede seguir teniendo lugar la hidrólisis enzimática (Vu et al., 2000).

2.3. Tratamiento de resultados

CÁLCULO DEL GRADO DE LIPÓLISIS

El porcentaje de ácidos grasos liberados (AGL) se calculó en base al consumo de NaOH durante la etapa pH-stat, y referido al Ac. Oleico (Ecuación 1).

$$\%AGL = \frac{(V NaOH)(N NaOH)(PM \text{ Ác.oleico})(100)}{m \text{ sustrato}} \quad (1)$$

Donde: $V NaOH$ = volumen de valorante alcanzado en cada punto (mL); $N NaOH$ = concentración utilizada del valorante (N); $PM \text{ Ác. Oleico}$ = peso molecular del ácido oleico; y $m \text{ sustrato}$ = masa de grasa de la muestra (g).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Estandarización del protocolo de digestión *in vitro* en leche

Se realizaron pruebas preliminares seleccionando diferentes valores de los parámetros de análisis en el software del equipo: duración de las etapas, velocidad máxima de adición de valorante, frecuencia de registro de puntos. Además el método se sometió a prueba con diferentes concentraciones de NaOH para utilizar como valorante. Asimismo, se llevaron a cabo pruebas preliminares relacionadas con la liberación de las enzimas en función del pH.

Las decisiones de partida fueron: 1) omitir la etapa oral ya que el sustrato analizado fue una matriz líquida (no requería masticación) y sin contenido en almidón (no requería amilasa salival) y 2) no utilizar sales biliares en la fase intestinal para hacer una aproximación más real a las particularidades digestivas de los pacientes con problemas de maldigestión de las grasas.

INFLUENCIA DEL pH DEL MEDIO EN LA LIBERACIÓN DEL CONTENIDO DE LAS CÁPSULAS

En primer lugar se realizó un experimento para conocer el nivel de acidez al que la cobertura de la cápsula del suplemento se diluye liberando su contenido, es decir, los gránulos con las enzimas. El objetivo fue comprobar las propiedades gastroresistentes del suplemento enzimático, que asegura la liberación de las enzimas en la fase intestinal. Así, se prepararon tres medios con suero salino fisiológico al 0.9% a valores de pH de 2, 5 y 7 respectivamente, en agitación de 100rpm y mantenidos a 37°C. Se adicionó una cápsula en cada uno de los medios y, tras 30 minutos, en aquellos a pH 5 y 7 la cápsula se había hidratado aumentando su tamaño pero no se había producido la rotura mecánica de las paredes, permaneciendo todo el contenido en su interior. En el medio a pH 2, en

cambio, tras 5 minutos de inmersión, la película estaba disuelta y los gránulos liberados. No se apreciaron cambios visuales en el tamaño o forma de los gránulos durante el tiempo de inmersión a este pH. Sin embargo cuando los gránulos de pancreatina fueron añadidos a pH 5 y 7 sin la capsula externa, se observó un hinchamiento y oscurecimiento de los mismos.

Estos resultados indican que a pH ácido la película de gelatina que recubre los gránulos permanece inalterada conservando el contenido, y que a pH ligeramente ácidos o próximos a la neutralidad, la hidratación del material de pared permite la liberación de las enzimas al medio.

ELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL VALORANTE

El valorante elegido para llevar a cabo las determinaciones fue NaOH. Se utilizó inicialmente una concentración de 1N, obteniéndose una velocidad de neutralización adecuada al ritmo de la reacción durante la primera etapa de la digestión intestinal; sin embargo, esta concentración resultaba excesiva para ajustar el pH en la etapa final de ensayo, en la que la velocidad de la reacción va disminuyendo. Por este motivo, se probaron las concentraciones sucesivas decrecientes 0.75N y 0.5N, siendo esta última la de elección ya que permitió que el volumen añadido neutralizara, a cualquier velocidad de la reacción, la acidificación producida.

INFLUENCIA DEL MOMENTO DE ADICIÓN DEL SUPLEMENTO ENZIMÁTICO

De acuerdo a las especificaciones del suplemento, la cobertura entérica de los gránulos es resistente al paso por el estómago, y permite la liberación de las enzimas una vez el pH del medio alcanza valores más próximos a la neutralidad, es decir, en el duodeno, donde ejercen su papel. Se realizó un experimento para comprobar si la actividad enzimática se mantenía o si se veía disminuida tras el paso por la fase gástrica.

Se siguieron dos patrones de adición de las enzimas al proceso, con una relación enzima/sustrato de 0,0115: añadidas en el interior de la cápsula al inicio de la etapa gástrica, o añadidas de forma libre al inicio de la etapa intestinal. Adicionalmente, se comprobó la actividad a pH 6 y 7. Como se aprecia en la **FIGURA 1**, para los dos valores de pH se produce una ligera pérdida de actividad. Las diferencias en el %AGL liberados después de 120 minutos a pH 7, según el momento de adición de las enzimas, fueron prácticamente nulas, obteniéndose valores de 76,3% cuando se añade en la etapa gástrica y de 78,5 % para la adición en etapa intestinal. A pH 6, sin embargo, las diferencias obtenidas fueron mayores: 32,6% y 40,9% respectivamente. Así pues, se decidió incorporar las enzimas al inicio del proceso digestivo utilizando el formato comercial del suplemento, conteniendo la dosis seleccionada para cada experimento. De esta manera

se consigue una aproximación más real a la pauta de ingesta de los suplementos junto con los alimentos.

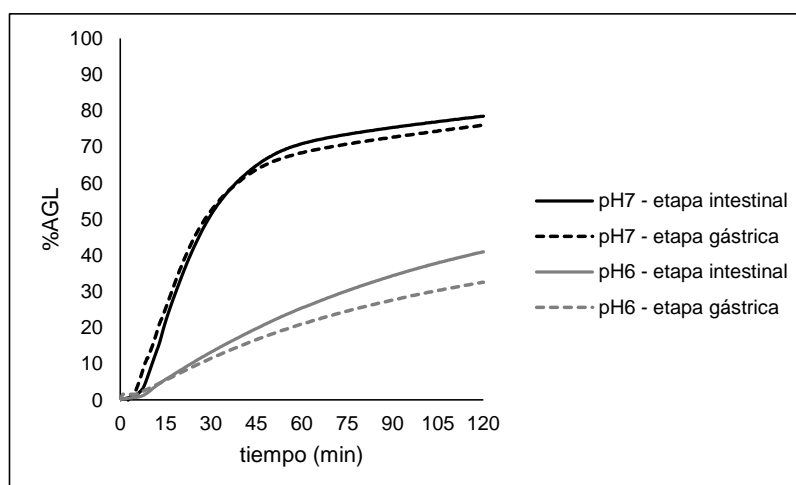


FIGURA 1. Efecto de la adición de las enzimas a la fase gástrica ó intestinal a pH 6 y pH 7 sobre la extensión de la actividad hidrolítica.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Finalmente, el método diseñado con el software constó de 5 pasos (**FIGURA 2**), siendo el primero (Paso 1) únicamente destinado a la adición del sustrato, el LES y las enzimas. Le siguió la simulación de la fase gástrica, en la que el pH fue controlado con “*measure pH*” (Paso 2) para comprobar que su valor se mantenía a pH 2.0. A continuación se seleccionó “*set pH*” (Paso 3) para que el equipo añadiera NaOH 0.5N hasta alcanzar un pH de 6 o 7, simulando de ésta manera la neutralización que ocurre de forma fisiológica por la acción de los jugos pancreáticos a la entrada en el duodeno (Bruno et al., 1995). La siguiente etapa (Paso 4), continuando con la simulación de la fase intestinal, consistió en el registro del consumo de NaOH 0.5N mediante “*stat pH*”. El último paso (Paso 5) consistió en transferir los resultados obtenidos a la base de datos del equipo.

En el Paso 3 se observó que la reacción de hidrólisis se iniciaba al llegar a un valor de pH cercano a 5.4. Adicionalmente se apreció visualmente el cambio estructural de la muestra. Para alcanzar el pH objetivo de forma rápida y poder registrar la actividad del suplemento, se adicionó manualmente el volumen de NaOH 0.5N necesario, minimizando el tiempo de reacción de hidrólisis ocurrida en el tramo de cambio de pH 5.4 a 6 o 7. Esta modificación resulta imprescindible ya que las enzimas pancreáticas se incorporan al inicio de la etapa gástrica y están presentes en el momento de ajustar el pH del medio para simular el inicio de la fase intestinal, lo cual no ocurre en otros protocolos experimentales en los que las enzimas se añaden una vez alcanzado el pH intestinal.

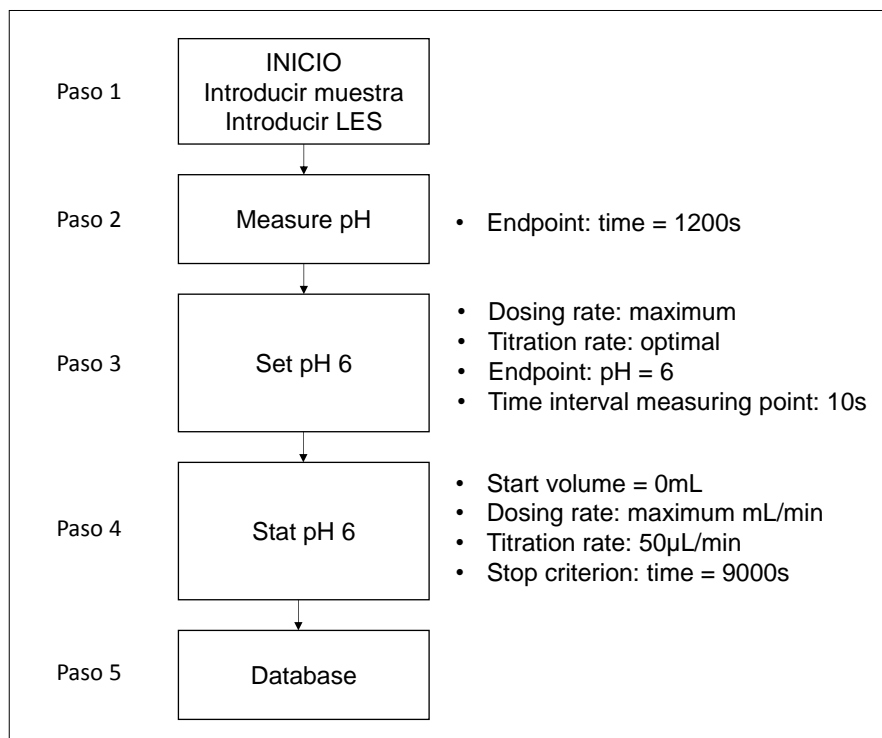


FIGURA 2. Diagrama de las etapas del método de análisis diseñado con el software Tiamo 1.3. y los parámetros seleccionados para cada una de ellas. Se ilustra el método utilizado para pH 6: para pH 7 el método es el mismo, cambiando los valores de pH a 7 en los pasos 3 y 4.

3.2. Aplicación del protocolo en otras matrices

Una vez estandarizado el protocolo para muestras de leche, se aplicó a aceite de oliva virgen extra y leche de almendras con el objetivo de identificar la aplicabilidad del mismo a otras matrices. En ambas muestras se observaron dificultades para la estabilización del pH durante la función “*pH stat*” probablemente como consecuencia de una inadecuada concentración del valorante. A la vista de estas pruebas, se concluye que es imprescindible reajustar la concentración del valorante y la velocidad de titulación para cada matriz que se desee ensayar.

3.3. Influencia del pH y de la relación enzima/sustrato en la digestión in vitro de leche

Las **FIGURAS 3A** y **3B** muestran las curvas de progreso de la lipólisis obtenidas utilizando distintas relaciones enzima/sustrato a pH 6 y 7 respectivamente. En las experiencias en las que se simuló la fase duodenal a pH 5 no se detectó ningún progreso de la lipólisis para ninguna de las relaciones enzima/sustrato ensayadas, lo que indica que el suplemento enzimático utilizado no es activo a este pH. Este resultado tiene importantes implicaciones en cuanto a la eficacia del tratamiento enzimático, que podría verse comprometida en el caso de individuos con obstrucción severa del

conducto pancreático, ya que la secreción de bicarbonato sódico es en estos casos limitada, y el pH duodenal podría no alcanzar los valores adecuados para la liberación y/o activación de la pancreatina.

Tanto la velocidad de la reacción enzimática como la extensión de la digestión de las grasas presentan una fuerte dependencia tanto del pH del medio como de la relación enzima/sustrato utilizada. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la actividad enzimática del suplemento es mucho más eficaz a pH 7, tanto desde el punto de vista cinético, velocidad de la reacción, como desde el punto de vista del alcance de la digestión de la grasa, % de Ácidos Grasos Libres liberados. A pH 6, la mayor parte de la grasa (>45%) permanece sin digerir después de 2 horas, incluso para la relación enzima/sustrato más elevada.

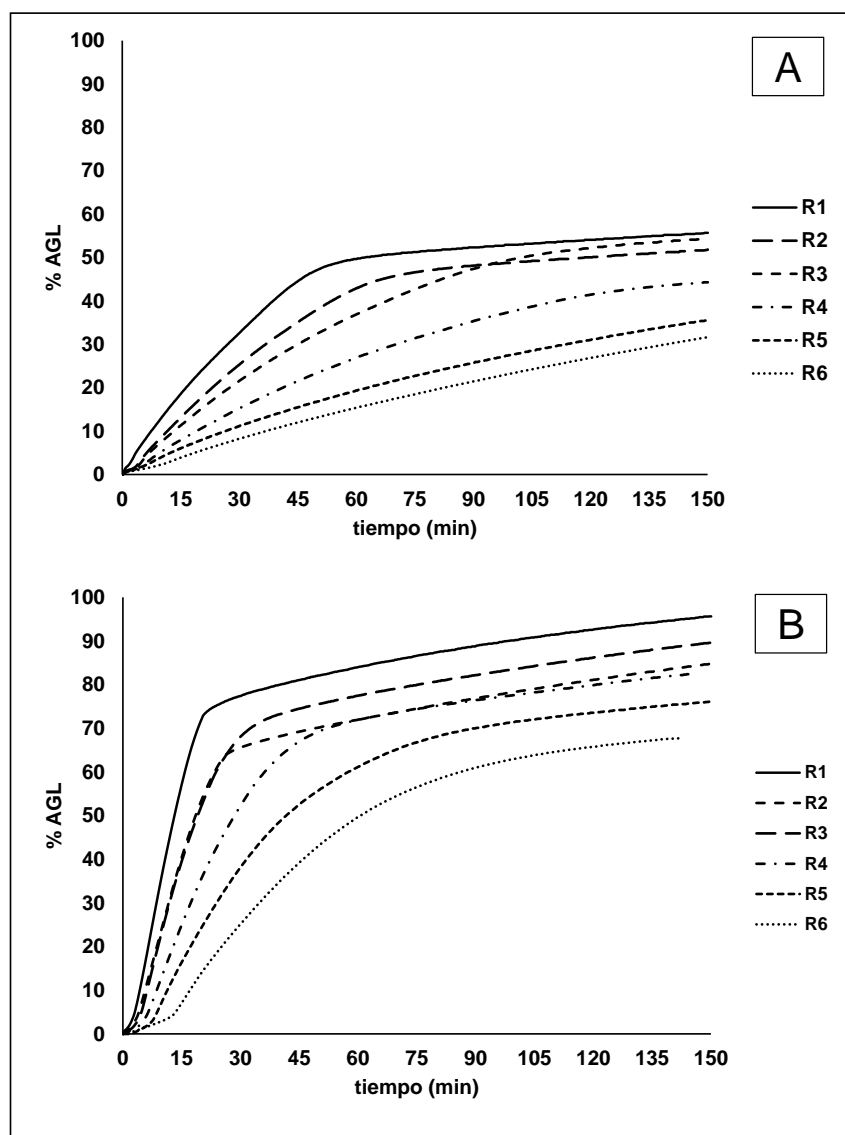


FIGURA 3. Curvas de progreso de la lipólisis. Efecto de la relación enzima/sustrato utilizada y de las condiciones de pH del medio en la fase intestinal: pH 6 (**A**) y pH 7 (**B**). Las relaciones enzima/sustrato sustrato se corresponden con R1 (0.048), R2 (0.032), R3 (0.021), R4 (0.014), R5 (0.006) y R6 (0.004).

En la **FIGURA 4** se ha esquematizado una curva típica de progreso de la lipólisis en la que pueden identificarse 3 etapas; una etapa inicial de activación, seguida de un tramo lineal donde la velocidad de reacción es constante hasta alcanzar un tiempo crítico (t_c) donde la velocidad de reacción decrece alcanzándose una meseta en cuanto al % de liberación de AGL.

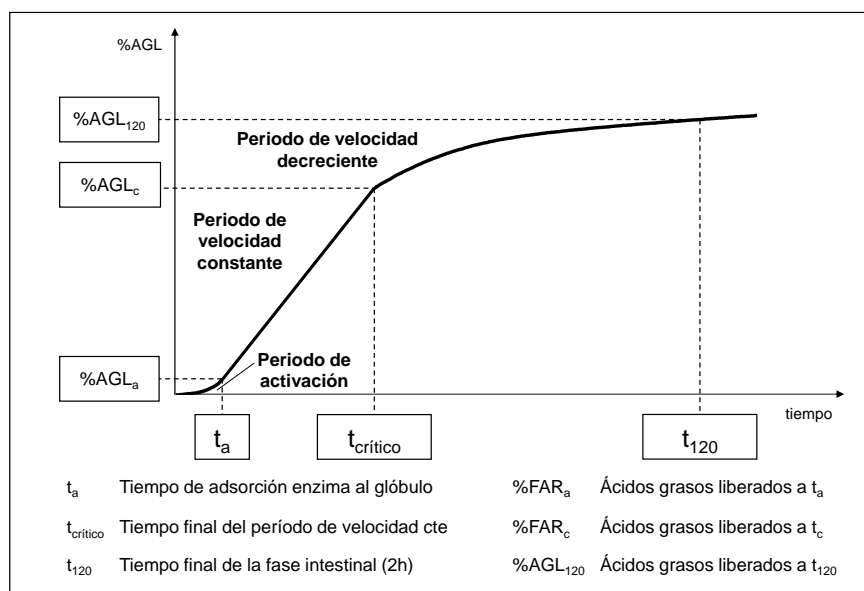


FIGURA 4. Curva modelo del progreso de la lipólisis con los parámetros característicos que definen cada uno de los períodos.

La **TABLA 2** recoge los valores de los parámetros que describen la cinética de la lipólisis para cada una de las condiciones ensayadas.

TABLA 2. Parámetros característicos extraídos de las curvas de digestibilidad de grasa láctea para cada una de las condiciones ensayadas de pH y relación enzima/sustrato.

		t_a (min)	t_c (min)	%AGL _c	$v_r^{(*)}$ (%AGL min ⁻¹)	$r^2^{(**)}$	%AGL ₁₂₀
pH 6	R1	1.7	43.5	43.7 ± 1.3	0.961	0.995	54.1 ± 0.4
	R2	3.7	47.3	36.5 ± 1.3	0.780	0.994	50.1 ± 0.5
	R3	4.0	40.3	27.5 ± 1.3	0.691	0.996	52.2 ± 0.4
	R4	5.4	52.6	24.4 ± 1.2	0.464	0.995	41.4 ± 0.5
	R5	7.7	53.7	17.8 ± 1.2	0.315	0.995	31.0 ± 0.2
	R6	9.7	55.1	14.30 ± 1.18	0.265	0.997	26.85 ± 0.19
pH 7	R1	2.4	20.1	72.04 ± 1.06	4.123	0.995	92.8 ± 0.5
	R2	3.2	24.5	61.63 ± 1.05	2.901	0.993	81.0 ± 0.6
	R3	4.2	24.0	60.49 ± 1.18	2.929	0.993	86.3 ± 0.5
	R4	6.9	32.5	55.8 ± 1.2	1.957	0.993	79.8 ± 0.4
	R5	10.2	39.2	48.0 ± 1.2	1.381	0.993	73.7 ± 0.3
	R6	13.1	46.2	40.1 ± 1.3	1.068	0.995	65.9 ± 0.4

(*) Velocidad de reacción en el tramo lineal que se corresponde con la pendiente en dicho tramo

(**) Coeficiente de regresión del ajuste del tramo lineal

PERIODO DE ACTIVACIÓN

El periodo de Activación se corresponde con el tramo inicial en el que la enzima se adsorbe a la superficie de las gotas de grasa y se abre la tapadera que cubre el centro activo. Su duración (t_a) depende de la concentración de enzima y la liberación de ácidos grasos en esta etapa es muy baja.

Las lipasas pancreáticas son enzimas que requieren de activación interfacial para desplegar la totalidad de su actividad catalítica. Es común para todas las lipasas la presencia de una α -hélice (denominada “tapadera”) cubriendo el centro activo, que se desplaza (se abre) durante la activación interfacial, permitiendo el acceso al centro activo, hasta ese momento inaccesible (Brzozowski et. al, 1991). Durante este proceso de activación superficial, las lipasas compiten por la interfase aceite:agua con los compuestos emulsificantes presentes en el sistema y que rodean las gotas de grasa. En el caso del sistema utilizado en este trabajo (leche), la enzima podría tener que competir con las caseínas para posicionarse en la interfase aceite:agua. Según algunos autores, a muy bajas concentraciones, podría no haber enzima suficiente para desplazar las caseínas y no se establecería el contacto adecuado entre el enzima y el sustrato (Macierzanka et al., 2009). A concentraciones intermedias, equivalentes a las concentraciones más bajas de enzima utilizadas en este trabajo, se observa claramente esta etapa, con una velocidad inicial de liberación de Ácidos Grasos Libres muy baja que puede explicarse en base al tiempo (t_a) que se requiere para que el enzima desplace las caseínas y alcance la interfase del sustrato. A concentraciones altas, estos procesos de desplazamiento y adsorción ocurren muy rápidamente y la digestión de los lípidos empieza casi inmediatamente. La **FIGURA 5** ilustra muy bien la relación logarítmica existente entre los parámetros t_a y R obtenidos para las distintas condiciones ensayadas en este trabajo. Adicionalmente, se observa que a medida que aumenta la relación enzima/sustrato disminuye la dependencia del pH de este parámetro. No obstante, y dado que las curvas de progreso de la lipólisis corresponden a muestras previamente sometidas a digestión gástrica, es posible que la acción de la pepsina y/o la acción de las proteasas de la pancreatina en la fase duodenal modifiquen las condiciones de la interfase de los glóbulos de grasa, e incluso provoquen la coalescencia de los mismos. En este sentido, sería interesante abordar en trabajos futuros el seguimiento del tamaño de los glóbulos y de las características de la interfase durante el proceso de digestión de la leche y tratar de relacionarlos con el proceso de lipólisis.

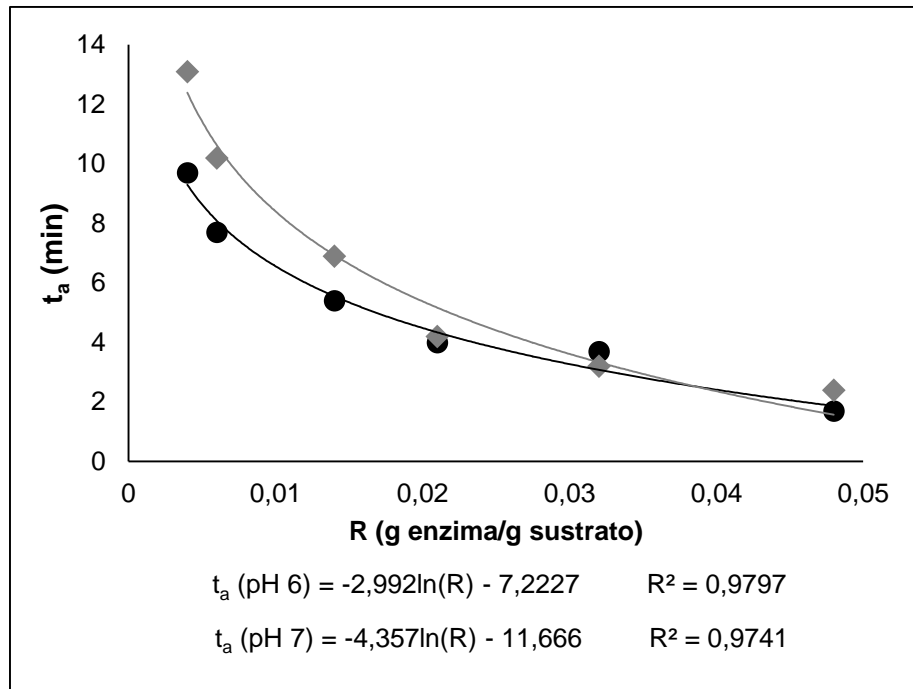


FIGURA 5. Modelització del temps de activació de les enzimes (t_a) frente a la relació enzima/sustrato R utilitzada, a pH 6 (♦) y a pH 7 (●).

PERIODO DE VELOCIDAD CONSTANTE

En el periodo de velocidad de reacción constante, la velocidad depende del pH del medio y es directamente proporcional a la relación enzima/sustrato utilizado (**FIGURA 6**). Tal y como se esperaba, la velocidad de digestión de los lípidos aumenta con la concentración de enzima ya que habrá más cantidad total de enzima en el sistema para catalizar la conversión de los triacilglicéridos a ácidos grasos libres (Reis et al., 2009); sin embargo, también influye la cantidad de sustrato presente en el medio, es decir, es la relación enzima/sustrato la que determina la velocidad en esta etapa y no solo la cantidad de enzima presente en el medio.

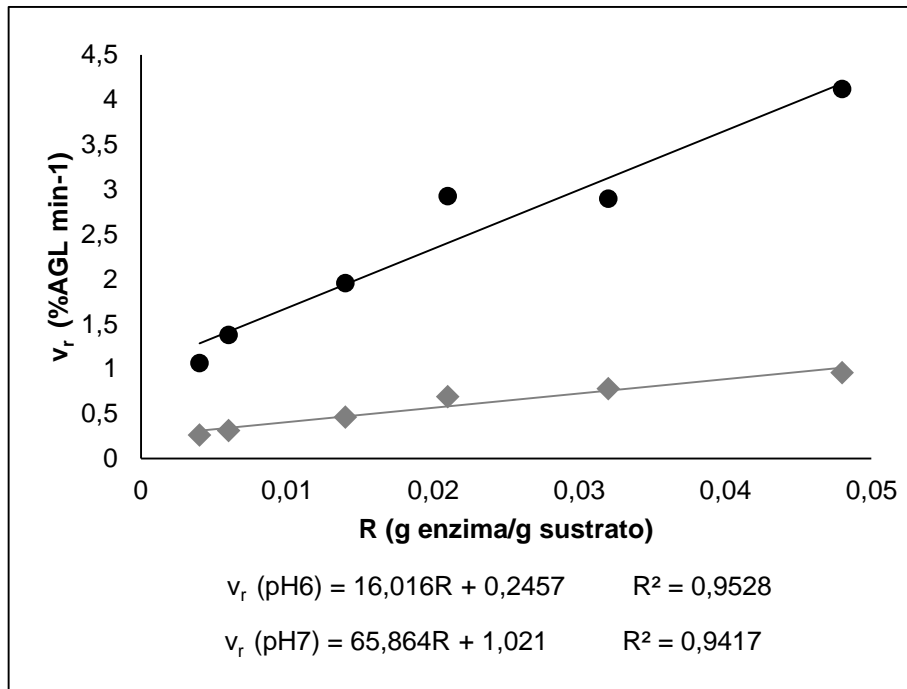


FIGURA 6. Correlación de la velocidad de reacción en el período lineal y la relación enzima/sustrato R, a pH 6 (◆) y a pH 7 (●).

La Etapa de velocidad de reacción decreciente se identifica por una meseta de liberación de AGL como consecuencia de una disminución progresiva de la velocidad de lipólisis. Este periodo podría corresponderse con un agotamiento del sustrato si el valor de %AGL fuera próximo al 100%; sin embargo, dependiendo de la relación enzima/sustrato y del pH del medio, se observa que esta meseta se presenta sin agotamiento del sustrato (%AGL<100), reflejando por tanto la prevalencia de mecanismos de inhibición de la actividad enzimática. Los mecanismos de inhibición de las lipasas pancreáticas no son bien conocidos pero podrían ser similares a los descritos para la lipasa gástrica. Pafumi et al. (2002) publicaron los resultados de un estudio orientado a dilucidar los mecanismos de inhibición de la lipólisis en la digestión gástrica. Según estos autores, la acumulación de productos generados durante la lipólisis en la superficie de los glóbulos de grasa, podrían formar una capa alrededor de los mismos atrapando las enzimas e inhibiendo su actividad. Esta acumulación de ácidos grasos libres, monoacilgliceridos y diacilgliceridos, pueden además modificar la tensión superficial del glóbulo de grasa, interfiriendo en la unión y en la actividad de las lipasas; adicionalmente, y como consecuencia de la naturaleza fusiogénica de estos compuestos, se puede producir la coalescencia de los glóbulos de grasa disminuyendo la superficie interfacial activa. Mecanismos similares a estos podrían ser los responsables de la inhibición de la lipasa pancreática en determinadas condiciones del medio intestinal, si bien se requieren estudios en profundidad que permitan dilucidar dichos mecanismos y así poder modular adecuadamente la digestión de la grasas en el duodeno.

PERIODO DE VELOCIDAD DECRECIENTE

En la **FIGURA 7** se presenta la relación entre el porcentaje de ácidos grasos liberados después de 120 minutos de digestión intestinal (%AGL₁₂₀) y la relación enzima/sustrato. Aunque para los dos pH en los que se observó actividad enzimática se obtuvo una correlación logarítmica entre estos dos parámetros, el pH del medio de digestión resulta determinante para optimizar la digestión de las grasas; según la ecuación obtenida mediante el ajuste de los resultados experimentales, la relación que se requeriría para alcanzar un valor del 90% de AGL₁₂₀ a pH 6 sería de 0.88 gramos de enzima por gramo de grasa, 18 veces superior a la que se requiere a pH 7 para obtener los mismos niveles de digestión.

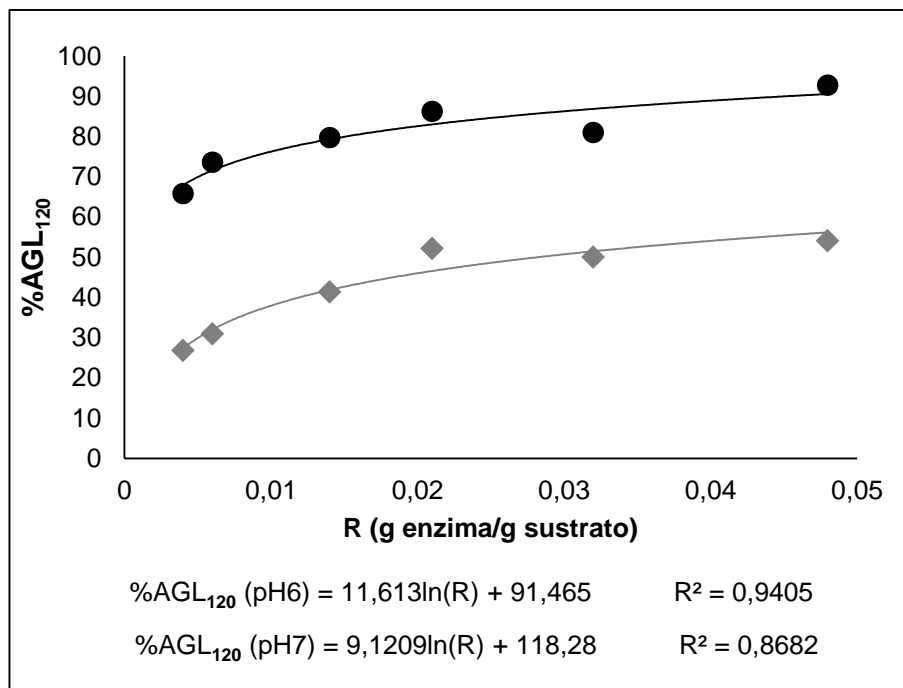


FIGURA 7. Correlación entre el %AGL liberados después de 120 minutos de digestión y la relación enzima/sustrato (R), a pH 6 (♦) y a pH 7 (●).

4. CONCLUSIONES

Ha sido posible establecer un protocolo experimental para evaluar la digestibilidad de la grasa en un alimento real, la leche, que permite estudiar la cinética y la extensión de la hidrólisis bajo diferentes condiciones de análisis.

Las curvas de progreso de la lipólisis obtenidas como resultado del estudio, siguen un patrón con tres periodos diferentes en cuanto a cinética de reacción. En función del ratio enzima-sustrato y del pH del medio en la

fase intestinal, estas etapas presentan una duración y una cinética diferentes.

La modelización de los parámetros característicos de las curvas de progreso de la lipólisis ha permitido obtener ecuaciones de gran utilidad para la estimación de la dosis adecuada de suplemento enzimático para optimizar la digestibilidad de la grasa en leche.

Se ha visto que la relación enzima-sustrato tiene influencia sobre la extensión y la cinética de la hidrólisis, no obstante es el pH del medio en la fase intestinal el mayor determinante en estos parámetros. De hecho, en pacientes con insuficiencia pancreática la secreción de bicarbonato sódico puede llegar a ser tan baja que el pH del intestino llegue a valores entre 3 y 5, por lo que no habría actividad enzimática y la terapia no produciría ningún beneficio.

Así pues, se plantea como solución a este problema la preparación de suplementos con bicarbonato sódico encapsulado para ser liberadas en el intestino y alcalinizar el medio, permitiendo así la óptima actuación de las lipasas. Otra alternativa podría ser la síntesis de enzimas con actividad óptima a valores de pH propios de los individuos con insuficiencia pancreática.

Finalmente, se requiere seguir estudiando los factores que afectan al comportamiento de la hidrólisis enzimática de la grasa con los suplementos comerciales actuales, para sentar las bases del conocimiento necesarios que permitan un ajuste basado en la evidencia de esta terapia. Adicionalmente, una vez bien definidos los factores, será posible el estudio de los factores individuales también influyentes en la efectividad de la terapia.

5. REFERENCIAS

- Borowitz, D., Baker R.D., and Stallings V. 2002. Consensus report on nutrition for paediatric patients with cystic fibrosis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **35(3)**: 246-59.
- Borowitz, D.; Gelfond, D.; Maguiness, K.; Heubi, J.B.; Ramsey, B. 2013. Maximal daily dose of pancreatic enzyme replacement therapy in infants with cystic fibrosis: a reconsideration. *Journal of Cystic Fibrosis*, **12(6)**: 784-785.
- Bruno, M.J.; Haverkort, E.B.; Tytgat, G.N.; van Leeuwen, D.J. 1995. Maldigestion associated with exocrine pancreatic insufficiency: implications of gastrointestinal physiology and properties of enzyme preparations for a cause-related and patient – tailored treatment. *The American Journal of Gastroenterology*, **90(9)**: 1383-1393.
- Brzozowski, A.M.; Derewenda, U.; Derewenda, Z.S.; Dodson G.G.; Lawson, D.M.; Turkenburg, J.P.; Bjorklings, F.; Hüge-Jensen, B.; Patkar, S.A.; Thim, L. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, **351**: 491–494.
- Escobar, H.; Infante, D.; Manznares, J.; Lambroschini, N.; Bousoño, C.; Ferrer Calvete, J.; Nadal, J.; Lázaro, A.; Sánchez Ruiz, F.; Sojo, A.; Dapena, J.; Banqué, M. 2005. Fibrosis Quística: control de la nutrición. *Ciència Pedàtrika*, **1**: 1-40.

- Fieker, A.; Philpott, J. and Armand, M. 2011. Enzyme replacement therapy for pancreatic insufficiency: present and future. *Journal of Clinical and Experimental Gastroenterology*, **4**: 55-73.
- Gallier, S.; Ye, A. and Singh, H. 2012. Structural changes of bovine milk fat globules during in vitro digestion. *Journal of Dairy Science*, **95**: 3579–3592.
- Hu, M.; Li, Y.; Decker, E.A.; McClements, D.J. 2010. Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model. *Food Hydrocolloids*, **24**: 719-725.
- Layer, P. and Keller, J. 2003. Lipase supplementation therapy: standards, alternatives and perspectives. *Pancreas*, **26(1)** 1-7: 1383-1393.
- Li, Y.; Hu, M. and McClements, D.J. 2011. Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chemistry*, **126**: 498–505.
- Macierzanka, A.; Sancho, A.I.; Mills, E.N.C.; Rigby, N.M.; Mackie, A.R. 2009. Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of beta-casein and beta-lactoglobulin. *Soft Matter*, **5(3)**: 538-550.
- Ménard, O.; Cattenoz, T.; Guillemin, H.; Souchon, I.; Deglaire, A.; Duponot, D.; Picque, D. 2014. Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chemistry*, **145**: 1039-1045.
- Pafumi, Y.; Lairon, D.; de la Porte, P.L.; Juhel, C.; Storch, J.; Hamosh, M.; Armand, M. 2002. Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**: 28070-28079.
- Reis, P.; Holmberg, K.; Watzke, H.; Leser, M.E.; Miller, R. 2009. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, **147–148**: 237–250.
- Rovner, A.J.; Alisha, J.; Schall, J.I.; Mondick, J.T.; Zhuang, H.; Mascarenhas, M.R. 2013. Delayed small bowel transit in children with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **57(1)**: 81-84.
- Solomon T. 1994. Control of exocrine pancreas secretion. *Physiology of the Gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, **2**: 1499–1529.
- Vu, M.K.; Vecht, J.; Eddes, E.H.; Biemond, I.; Lamers, C.B.H.W.; Masclee, A.A.M. 2000. Antroduodenal motility in chronic pancreatitis: are abnormalities related to exocrine insufficiency?. *American Journal of Gastrointestinal and Liver Physiology*, **278(3)**: G458-G466.
- Whitcomb, D.C.; Lehman, G.A.; Vasileva, G.; Malecka-Panas, E.; Gubergitis, N.; Shen, Y.; Sander-Struckmeier, S.; Caras, S. 2010. Pancrelipase delayed-release capsules (CREON) for exocrine pancreatic insufficiency due to chronic pancreatitis or pancreatic surgery: A double-blind randomized trial. *The American Journal of Gastroenterology*, **105(10)**: 2276-2286.