

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INFLUENCIA DE LA CO-INGESTA DE ALIMENTOS SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LÍPIDOS, CARBOHIDRATOS Y PROTEINAS. Caso de estudio

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE ALIMENTOS

ALUMNO/A: Olaya Mesa García

TUTOR/A ACADEMICO: Ana María Andrés Grau
COTUTOR/A: Ana Belén Heredia Gutiérrez

Curso Académico: 2017/2018

VALENCIA, FECHA 1 DE JULIO DE 2018

INFLUENCIA DE LA CO-INGESTA DE ALIMENTOS SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LÍPIDOS, CARBOHIDRATOS Y PROTEINAS. Caso de estudio

Mesa, O., Heredia, A. y Andrés, A.

RESUMEN

La insuficiencia pancreática exocrina (IPE) es un trastorno consistente en una secreción enzimática deficiente del páncreas al intestino conllevando una maldigestión de los macronutrientes, en especial de las grasas. Además, la IPE puede ir acompañada de una concentración biliar y pH intestinal inferiores a los de un adulto sano. El tratamiento actual consiste en una terapia de reemplazamiento enzimático, suplementando al paciente por vía oral con pancreatina (Kreon®) y estableciendo la dosis en base al peso del paciente y la cantidad de grasa ingerida, excluyendo factores inherentes al alimento, como son el tipo de grasa, estructura de la matriz-alimento o la interacción con otros macronutrientes. Así, el objetivo de este trabajo fue analizar la digestibilidad *in vitro* de lípidos, proteínas y glúcidos en diferentes combinaciones de pan con semillas, aceite, mantequilla y/o jamón York bajo condiciones intestinales de una persona sana (control) y de IPE. Las variables estudiadas fueron la dosis de Kreon® (0-4000 UL/ g grasa), pH (6 ó 7) y concentración biliar (1 mM ó 10 mM).

Los resultados indicaron que en todos los casos la suplementación favorecía la digestibilidad y que la variación de la dosis en la lipólisis era importante, encontrándose la óptima entre 2000-4000 UL/ g grasa. Además, una concentración de sales biliares de 10 mM y pH 7 favorecían la emulsión de lípidos y la actividad lipasa, aunque no era tan obvio en la glucólisis y proteólisis. Por último, el tipo de grasa y la estructura matricial condicionaron la extensión de la lipólisis y la dosis de Kreon® necesaria; de la misma forma, se apreciaron diferencias en la glucólisis y proteólisis del pan con semillas solo o acompañado.

PALABRAS CLAVE: digestión *in vitro*, insuficiencia pancreática exocrina, lipólisis, glucólisis, proteólisis

RESUM

La insuficiència pancreàtica exocrina és un trastorn greu que consisteix en una secreció enzimàtica deficient del pàncrees a l'intestí i comporta una maldigestió dels nutrients, en especial dels lípids. A més a més, la IPE pot anar acompanyada d'una concentració biliar i un pH intestinal menor al pacient sa estàndard. El tractament actual consisteix en una teràpia de reemplaçament enzimàtic, suplementant al pacient per via oral amb pancreatina (Kreon®) establint la dosificació en funció del pes del pacient i la quantitat de greix ingerit, sense comptar amb factors inherents a l'aliment, com són el tipus de greix, l'organització estructural en la matriu-aliment o la

interacció amb altres macronutrients. Per això, l'objectiu d'este treball va ser analitzar la digestibilitat *in vitro* de lípids, proteïnes i glúcids en diferents combinacions de pa amb llavors, oli, mantega i/o pernil dolç baix condicions intestinals d'una persona sana (control) i d'IPE. Les variables estudiades foren dosis de Kreon® (0-4000 UL / g lípids), pH intestinal (6 o 7) i concentració biliar (1 o 10 mM).

Els resultats indiquen que la suplementació té una influència positiva en la digestibilitat i que la variació de la dosi en la lipòlisi és important, estant la òptima entre 2000-4000 UL/ g greix. A més, una concentració de sals biliars de 10 mM i un pH 7 afavoreixen l'emulsió de lípids i l'activitat enzimàtica, encara que no és tan obvi en glicòlisi i proteòlisi. Per últim, el tipus de greix i l'estructura matricial condicionen la extensió de la lipòlisi i la dosi de Kreon® necessària; de la mateix manera, se aprecien diferències en la glicòlisi i proteòlisi de pa amb llavors ingerits sol o acompanyat.

PARAULES CLAU: digestió *in vitro*, insuficiència pancreàtica exocrina, lipòlisi, glucòlisi, proteòlisi

ABSTRACT

Exocrine pancreatic insufficiency (EPI) is a severe disorder that consists of a deficient enzymatic secretion from the pancreas to the intestine. This entails to a nutrients malabsorption. Moreover, this disorder can be accompanied with a lower concentration of bile salts and a low pH compared to a healthy patient. Current treatment is based in a pancreatic enzymatic replacement therapy and involves the oral intake of pancreatin (Kreon®) and the dosage is established based on the patient's weight and the total amount of fat ingested in each meal, without considering factors inherent to the food, such as the type of fat, structural organization in the food-matrix or its interaction with other macronutrients. Thus, the objective of this work has been to analyse the digestibility of lipids, proteins and carbohydrates in different combinations of bread with seeds, oil, butter and/or ham, digested *in vitro* under intestinal conditions of a standard healthy person (control) and EPI. The studied conditions were the dose of enzymatic supplementation of pancreatin (0-4000 UL / g fat) intestinal pH (6 or 7) and bile salts concentration (1 or 10 mM).

The results showed that in all cases, supplementation favoured digestibility and, dose influence was very important in lipolysis, being the optimum dose between 2000-4000 UL/ g fat. On the other hand, 10 mM of bile salts and pH 7 helped to emulsify lipids and to activate enzymes, however that was not so obvious in glycolysis and proteolysis. At last, type of fat and structural organization conditioned lipolysis extension and Kreon® dose required; in the same way, it was observed differences in glycolysis and proteolysis between ingest bread with seeds alone or accompanied with butter, oil or/and yolk.

KEY WORDS: *in vitro* digestion, exocrine pancreatic insufficiency, lipolysis, proteolysis, glycolysis

1. INTRODUCCIÓN

La insuficiencia pancreática exocrina (IPE) es una complicación propia de enfermedades pancreáticas y se conoce por una actividad enzimática inadecuada del páncreas, lo que resulta en una mala digestión y malabsorción de nutrientes, principalmente de lípidos. Las causas responsables de esta patología pueden ser una producción insuficiente de enzimas, una producción de enzimas no funcionales o problemas en el proceso de activación de estas enzimas (Bartel et al., 2015) (Gelfond et al., 2012). Además, suele ir acompañada de un déficit de vitaminas liposolubles, aminoácidos esenciales, algunos minerales y ácidos grasos (Sikkens et al., 2012). El páncreas es uno de los principales órganos implicados en el proceso digestivo siendo el encargado de digerir lípidos, carbohidratos y proteínas al secretar pancreatina (amilasa, lipasa, proteasa y colipasa pancreática) al duodeno (Li y Somers, 2014). Algunas enfermedades, como la fibrosis quística, van acompañadas de IPE. Además, se ha visto que los pacientes de fibrosis quística presentan valores subóptimos de pH intestinal y concentración biliar en comparación con un individuo sano (pH 7 y concentración biliar 10 mM) (Minekus et al., 2014). Así, un pH más ácido dificulta la neutralización de la acidez gástrica y la activación de las enzimas pancreáticas; mientras que la baja concentración biliar dificulta la emulsión de las grasas y, por tanto, no facilita la acción de las lipasas y colipasas sobre ellas (Sarkar et al., 2016).

Hoy en día, el principal tratamiento clínico para esta afección es la terapia de sustitución enzimática pancreática (del inglés *Pancreatic Enzymatic Replacement Therapy (PERT)*). Esta terapia consiste en suplementar al paciente con pancreatina exógena de fuentes porcinas en cada comida. La pancreatina se presenta en forma de microesferas gastrorresistentes que liberan las enzimas cuando se supera un pH de 5 o 5.5 ya en el intestino (Sikkens et al., 2010). En la actualidad, la dosificación de pancreatina se basa en la edad y peso del paciente y en la cantidad de grasa ingerida diariamente en términos generales, pero se ha observado en estudios como estos criterios son insuficientes puesto que la necesidad enzimática va a depender de factores propios del alimento como son la cantidad y el tipo de grasa, la matriz estructural y las posibles interacciones con otros macronutrientes (Sikkens et al., 2012) (Turck et al., 2016). Asimismo, la efectividad del suplemento puede depender de las condiciones intestinales en las cuales ha de actuar, como son el pH intestinal o concentración biliar, entre otros.

En el caso de los niños con IPE, ajustar adecuadamente la dosis de PERT es muy importante para que la absorción de nutrientes sea posible puesto que la malnutrición en ellos presenta consecuencias más graves que en adultos. Una de las comidas más comunes en esta franja de edad son los sándwiches o bocadillos. En este contexto, el objetivo del presente estudio ha sido evaluar el efecto las condiciones intestinales de pH y concentración biliar, de la dosis de suplemento enzimático, y de la co-ingesta de alimentos sobre el índice de degradación de la matriz y la extensión de la lipólisis, glucólisis y proteólisis tras la digestión *in vitro* de pan con semillas, jamón york, aceite y mantequilla

y sus combinaciones (pan y jamón york, pan y aceite, pan y mantequilla, pan con jamón york y aceite y pan con jamón york y mantequilla).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Matrices de estudio, reactivos y equipos

2.1.1. MATRICES DE ESTUDIO

Para el siguiente estudio se utilizaron cuatro matrices alimentarias diferentes, adquiridas en un supermercado de la ciudad de Valencia. Las matrices fueron: pan con semillas (Hacendado), jamón york (Hacendado – Casa Tarradellas), mantequilla sin sal añadida (Hacendado) y aceite de oliva virgen extra (La Española). En la TABLA 1.1 se ha descrito la composición nutricional de cada alimento indicada en el etiquetado; en la TABLA 1.2 se encuentran los valores nutricionales correspondientes.

TABLA 2.1. Composición de las matrices alimentarias por cada 100g en base al etiquetado.

Alimento	Ingredientes
Pan con semillas (B)	Harina de trigo, agua, semillas de girasol (4,7 %), semillas de lino (4,6 %), semillas de calabaza (4,2 %), levadura, azúcar, aceite refinado de girasol (1,2 %), semilla de amapola (0,8 %), copo de centeno, copo de avena, sal, gluten de trigo, harina de habas, vinagre de vino, emulgentes (E - 471, E - 472e), corrector de la acidez (E- 341 iii), antioxidante (E - 300), conservadores (E – 828,E - 200, E-202).
Jamón York (Y)	Jamón (85 %), agua, sal, dextrosa, estabilizantes (E 431 y E-407), antioxidante (ascorbato sódico), especias, aromas, conservador (nitrito sódico).
Mantequilla (b)	Nata pasteurizada, fermentos lácticos, vitamina A (beta-caroteno)
Aceite (O)	Aceite de oliva virgen extra

TABLA 2.2. Información nutricional en base al etiquetado por cada 100 g de producto

	Pan semillas (B)	Jamón York (Y)	Aceite (O)	Mantequilla (b)
Valor energético (kcal)	125	101	822	742
Grasas	11	2,5	91	82
Saturadas	1,6	0,9	12	55
Monoinsaturadas	3,1	-	71	-
Poliinsaturadas	6,3	-	8	-
Hidratos de carbono	36	0,9	-	0,4
Azúcares	4,6	0,9	-	0,4
Proteínas	13	18,6	-	0,6
Fibra	6,1	-	-	-
Sal	1,1	1,9	-	0,03

2.1.2. REACTIVOS Y EQUIPOS

La simulación de la digestión gastrointestinal se realizó mediante un modelo estático *in vitro* siguiendo el protocolo consensuado a nivel europeo por la cost-action INFOGEST publicado por Minekus et al. (2014). La simulación se realizó en una cámara termostataada a 37 °C (SELECTA modeloBoxcult 3000957) acoplada a un sistema de agitación circular “*head-over-heads*” a 55 rpm (agitador modelo Intelli – Mixer Rm-2). Además, se utilizó un pHmetro para ajustar el pH en cada etapa del proceso (SevenCompact™ S210, Mettler Toledo). Se simularon tres etapas: oral, gástrica e intestinal. En cada una de ellas se utilizaron fluido salival, gástrico e intestinal, respectivamente. Para la preparación de fluidos se partió de disoluciones stock (oral, gástrica e intestinal). En la TABLA 2.3 se muestra la composición de cada una de ellas mientras que en la TABLA 2.4 se encuentra la de los fluidos.

TABLA 2.3. Composición del stock salival simulado (SSS), gástrico simulado (SGS) e intestinal simulado (SIG)

Componente (mL)	SSS	SGS	SIS
KCl	30,2	13,8	13,6
KH ₂ PO ₄	7,4	1,8	1,6
NaCl	-	23,6	18,3
NaHCO ₃	13,6	25	95
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	1	0,8	2,2
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,12	1	-
H ₂ O	947,68	934	869,3

TABLA 2.4. Composición del fluido salival simulado (SSF), gástrico simulado (SGF) e intestinal simulado (SIF)

Componente (mL/mg)	SSF	SGF	SIF
SSS (mL)	70	-	-
SGS (mL)	-	135	-
SIS (mL)	-	-	217
CaCl ₂ (mL)	0,5	0,09	-
α-amilasa (mL)	10	-	-
Pepsina (mL)	-	2,411	-
Bilis (mg)	-	-	Según la condición*
Volumen final (mL)	80,5	180	240

*Las diferentes concentraciones se indican en el apartado 2.2 y en la TABLA 2.6.

Como se ve en la TABLA 2.4, el fluido salival contiene α-amilasa (proveniente de saliva humana tipo IX-A, de Sigma), el fluido gástrico contenía pepsina de la mucosa gástrica porcina (P6887, Sigma-Aldrich) y el fluido intestinal, bilis bovina (B3883 – Sigma-Aldrich) y pancreatina porcina comercial en forma de cápsulas (Kreon® Abbott). Cada cápsula contiene 150 mg de pancreatina que equivalen a 600 unidades proteasa, 8000 unidades amilasa y 10000 unidades lipasa.

Para las determinaciones analíticas se utilizó Triton X-100, etanol 96 %, kit de ensayo enzimático (Roche Diagnostics), TCA (ácido tricloroacético), DMSO (dimetilsulfóxido), ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), invertasa de levadura de cerveza (Grado VII > 300 U/mg ss), tampón glicina 33 mM pH 10.3, BSA (albumina de suero bovino), espectrofotómetro (Bechman Coulter) y una estufa para conocer el índice de la degradación de la matriz (IDM).

2.2. Modelo *in vitro* de simulación de la digestión

El objetivo del presente trabajo fue analizar la influencia tanto de la dosis de Kreon® como del pH intestinal y concentración biliar en la digestibilidad de grasas, proteínas y carbohidratos de las combinaciones alimentarias: B, Y, O, b, BY, BO, Bb, BYb, BYO. Para ello, se estudiaron 8 condiciones recogidas en la TABLA 2.5. Se estudiaron 5 condiciones en las que el pH y la concentración biliar se mantuvieron constantes (pH 6 y concentración biliar 1 mM, propio de un paciente con IPE) y se varió la dosis de Kreon® (0-4000 UL / g grasa) para así evaluar la influencia de la dosis de la pancreatina en la digestibilidad de macronutrientes. Además, se añadieron tres condiciones extras en las que a una dosis de pancreatina constante (2000 UL/ g grasa) se variaron las condiciones de pH (6 ó 7) y la bilis (1 ó 10 mM) para conocer el efecto de estas variables sobre la digestibilidad de macronutrientes.

TABLA 2.5. Detalle de las condiciones experimentales (concentración de Kreon®, pH y concentración biliar) de los ensayos *in vitro* de simulación gastrointestinal.

Kreon ® (UL/ g grasa)	Kreon® (mg/mL)	pH	Concentración biliar (mM)
0	0	6	1
1000	0,24		
2000	0,49		
3000	0,72		
4000	0,96		
2000	0,49	6	10
2000	0,49	7	1
2000	0,49	7	10

La digestión de las diferentes matrices alimentarias se llevó a cabo en tubos Falcon de 50 mL a los que se le añadió la cantidad necesaria de alimento para que cada uno contuviera 0.35 g de grasa y se procedió de la siguiente manera:

- Etapa oral: se añadieron 5 mL de SSF a cada tubo y se agitó durante 3 minutos simulando la etapa oral.
- Etapa gástrica: se adicionaron 10 mL de SGF a cada tubo de acuerdo con una relación bolo alimenticio: SGF de 1:1 (v/v). Antes de introducir los tubos en la cámara a 37 se ajustó el pH a 2.8 ± 0.1 con ácido clorhídrico (HCl 1N) y la ayuda del pH – metro. Seguidamente los tubos se introdujeron en la cámara a una temperatura controlada de 37° C en agitación constante durante dos horas.

- Etapa intestinal: se añadieron 20 mL de SIF a cada tubo (relación quimo:SIF de 1:1 (v/v)) y se introdujeron de nuevo los tubos en una cámara termostática a 37 °C, 55 rpm durante dos horas más. Durante este tiempo, se monitorizó y reajustó el pH y cuando fue necesario (6 ± 0.1 o 7 ± 0.1) ya que a pH inferior a 5.7 la lipasa permanece inactiva. La TABLA 2.6 recoge la composición del SSF en función de las condiciones de pH y concentración biliar simuladas.

TABLA 2.6. Composición del fluido intestinal simulado para cada una de las cuatro condiciones pH/concentración biliar simuladas

	6/1	6/10	7/1	7/10
Bilis (mg)	17,5	175	17,5	175
SIS (mL)	10,85	15,83	15,83	15,83
CaCl₂ (mL)	0,02	0,04	0,04	0,04
Ajuste pH	6	6	7	7
Vf (mL)	20	20	20	20

*Hasta llegar al volumen final, se ajustó con H₂O

2.3. Determinaciones analíticas

2.3.1. DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ

Se determinó el índice de degradación de la matriz siguiendo el protocolo de Lamothe et al. (2012). Una vez terminado el proceso de digestión gastrointestinal, se aumentó el pH a 9 para parar la reacción enzimática y se dejó reposar en hielo durante 10 minutos con el mismo objetivo. Seguidamente, se centrifugaron las muestras a 4000 rfc en fuerza G y 10°C durante 20 minutos y se filtraron con un tamiz de 1.6 mm de diámetro con el fin de separar la fase líquida a partir de ahora denominada “fase micelar” (FM) de la fase sólida. La FM se empleó para la determinación la extensión de la glucólisis, proteólisis y lipólisis; mientras que la fase sólida (FS) se llevó a sequedad en una estufa a vacío a 63° C durante 48 h, y se determinó el índice de degradación de la matriz (IDM (%)) de acuerdo con la ecuación 1:

$$IDM (\%) = \frac{cs_0 - cs_f}{cs_0} \times 100 \quad (1)$$

*siendo cs_0 = contenido en sólidos inicial antes del proceso digestivo (g), cs_f = contenido en sólidos final tras el proceso digestivo y estancia en la estufa (g).

2.3.2. DETERMINACIÓN DE LA LIPÓLISIS: ÁCIDOS GRASOS LIBRES (AGL)

Los ácidos grasos libres son el producto que queda tras la digestión de los triglicéridos. La extensión de la lipólisis se determinó tomando 100 µL de la FM y diluyéndolos en una disolución acuosa de 10 mL (5,6 % de Triton X-100 y 6% de etanol) para solubilizar los ácidos grasos libres (AGL) y evitar que la lipasa siguiera activa. Los AGL se midieron por espectrofotometría a una

longitud de onda de 546 nm utilizando un kit enzimático específico para esta determinación (Roche Diagnostics) (Lamothe et al., 2012).

Se compararon los valores de las absorbancias con los obtenidos en una recta de calibrado preparada con ácido palmítico y ácido oleico (0,04-0,000015 $\mu\text{mol}/\text{UL}$). La extensión de la lipólisis se ha expresado como los ácidos grasos liberados al final de la digestión (AGL) en relación con la grasa inicial del alimento (AGL/ g grasa). Para el cálculo se ha tenido en cuenta el peso molecular del triglicérido del ácido palmítico para la mantequilla y el de la trioleína para el aceite de oliva (861 g/mol y 885,432 g /mol; respectivamente) y la relación 1:2 de triglicéridos y ácidos grasos libres, respectivamente.

2.3.3. DETERMINACIÓN DE LA GLUCÓLISIS: GLÚCIDOS

La extensión de la glucólisis se determinó a partir de los monosacáridos liberados tras la digestión. Se tomaron muestras a los 20 y 120 minutos de la etapa intestinal y se determinaron: los azúcares de liberación rápida (RDS) a los 20 minutos, los de liberación lenta (SDS) como la diferencia de los medidos a los 120 minutos (S120) y los medidos a 20 minutos (SDS=S120 – RDS), y los resistentes a la digestión (RS) siendo estos los carbohidratos iniciales menos el total de los digeridos.

Para ello, se siguió el método publicado por Mishra et al., (2008) consistente en una hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa e invertasa y utilizando posteriormente ácido dinitrosalicílico (DNS). El procedimiento consistió en tomar alícuotas (250 μL) a cada tiempo (20 y 120 minutos) a los que se les añadió 1 mL de etanol 96 % y se agitó en vórtex durante un minuto para solubilizar los azúcares. Tras 30 minutos de reposo, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 1200 x g y 20° C. Tras el centrifugado, se tomaron 50 μL del extracto etanólico a los que se les añadieron 250 μL de la disolución enzimática (1% amiloglucosidasa y 1% invertasa) en tampón acetato (pH 5,2) y seguidamente se incubaron durante 10 minutos en una cámara a 37° C para completar la despolimerización de los azúcares a monosacáridos. Posteriormente, se añadieron 750 μL de la mezcla DNS para determinar los azúcares reductores [1 disolución de glucosa (0.5 mg/ml): 1 NaOH (4M): 5 DNS] calentando las muestras en un baño a 95° C durante 15 minutos. Finalmente, se añadieron 4 mL de agua destilada a 8°C para detener la reacción enzimática y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm.

2.3.4. DETERMINACIÓN DE LA PROTEÓLISIS

La extensión de la proteólisis se determinó de acuerdo con el método publicado por Bax et al. (2012). Así, se tomaron alícuotas (0.75 μL) al cabo de 0, 20 y 120 minutos de la etapa intestinal, y tras parar la reacción en frío introduciendo los tubos en un recipiente con hielo, se adicionaron 0.25 μL de ácido tricloroacético (TCA) y se mantuvo en la nevera durante 1h.

Para la medida espectrofotométrica se diluyó la disolución anterior con tampón glicina 33 mM a pH 1.8 (247 mg glicina en 100 mL H₂O destilada) y se midió la absorbancia a 280 nm con el fin de cuantificar la proteína solubilizada. Los resultados de las absorbancias se compararon con una recta de calibrado de albumina de suero bovino (BSA) (0.5 mg/mL, 0.75 mg/mL, 1 mg/mL, 1.25 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.75 mg/mL) expresando los resultados como mg de BSA por cada 100 g de proteína en la muestra inicial.

2.3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y han sido expresadas con la media y su desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis simple y multifactorial de la varianza (ANOVA) con el programa informático “Statgraphics Centurion XVI” y con un nivel de confianza del 95% (p valor $\leq 0,05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Índice de degradación de la matriz (IDM). Influencia de las condiciones intestinales y de la matriz alimentaria.

El índice de degradación de la matriz (IDM) provee información sobre las alteraciones macroestructurales que experimentan los alimentos durante la digestión. Estos cambios son consecuencia de los movimientos mecánicos (proceso físico) e hidrólisis enzimática de los macronutrientes (proceso químico) que se suceden y combinan a lo largo de la digestión. El IDM depende tanto de la estructura matricial como de la composición inicial del alimento, y en el caso de diferentes alimentos co-ingridos, del resultado de su combinación.

En el caso del pan al ser un alimento poroso debido al proceso de mezclado y fermentación, su degradación es rápida desde la fase oral, en la cual ya se reduce el tamaño de partícula considerablemente debido al fluido salival y masticación (Gao et al., 2015). En el caso de la mantequilla y el aceite, al ser matrices líquidas a 37°C, no se analizó su degradación individual sino juntamente con el pan ya que en ese caso, mantequilla y aceite son absorbidas por éste. En el caso del jamón, la degradación es algo más complicada debido a su composición en fibras musculares y grasa sólida que lo hacen más resistente a las fuerzas biomecánicas. De acuerdo a lo mencionado, se justifica que el índice de degradación a dosis 0 de Kreon® ya sea superior al 20 % como se observa en la Figura 3.1. Las causas directas son los movimientos físicos capaces de romper la estructura del pan facilitando el acceso de los diferentes fluidos digestivos. En el caso del jamón york, también se observa un valor IDM alto en ausencia de suplemento debido a la acción de la pepsina presente en los jugos gástricos, que se encarga de hidrolizar las proteínas rompiendo la estructura matricial compacta.

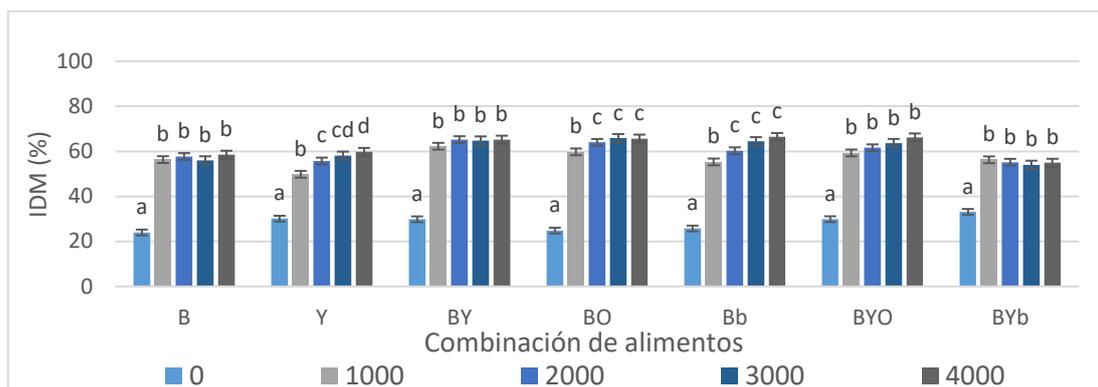


FIGURA 3. 1. Influencia de la dosis de Kreon® (0-4000 UL/ g grasa) sobre el índice de degradación de la matriz (IDM) del pan con semillas, jamón york y sus combinaciones con aceite y mantequilla, siendo constante el pH 6 y la concentración biliar en 1 mM. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre grupos homogéneos de cada alimento, con un nivel de significación del 95% ($p_{valor} < 0,05$). Los acrónimos del eje X hacen referencia a pan con semillas (B), jamón york (Y), pan con jamón york (BY), pan con aceite (BO), pan con mantequilla (Bb), pan con jamón york y aceite (BYO) y pan con jamón york y mantequilla (BYb).

En cuanto a la presencia de la suplementación con Kreon® sobre el IDM, existe una diferencia notable y significativa entre el hecho de suplementar o no con pancreatina, ya que la pancreatina termina de digerir los macronutrientes que en la fase oral y gástrica no se han digerido por completo. Sin embargo, a excepción del caso del jamón york, no existieron diferencias significativas entre las diferentes dosis enzimáticas. En el jamón york, la influencia se debe a que al ser una matriz más fibrilar y más rica en proteínas (aprox. 20%), la acción de las proteasas pancreáticas también es relevante, lo cual no ocurre en el resto de alimentos donde el porcentaje proteico es mucho menor como en la mantequilla y el aceite, o en el caso de alimentos porosos como el pan (Tornberg, 2005). Por otro lado, cabe destacar que una vez digeridos los alimentos, el IDM no fue superior al 60 %, valor bajo teniendo en cuenta que se partía de un 20 % sin dosis enzimática. Esto puede deberse, por un lado, a la presencia de grandes cantidades de semillas en el pan, que no son digeridas y por tanto, se encuentran intactas al final de la digestión disminuyendo el IDM (%). Además, en el pan hay grandes cantidades de fibra (almidón resistente), lo que contribuye a que el IDM no sea total (Repin et al., 2016; Taghipoor et al., 2014).

En cuanto a la influencia de condiciones de pH intestinal y concentración biliar (Figura 3.2), ambas variables presentaron una influencia poco significativa sobre la IDM, con un valor alrededor del 60% con independencia de estas. Únicamente en algunos casos, se produjo un incremento ligero del IDM al aumentar la concentración biliar. Este es el caso del pan con semillas, y casi todas sus combinaciones digeridas a pH 7.

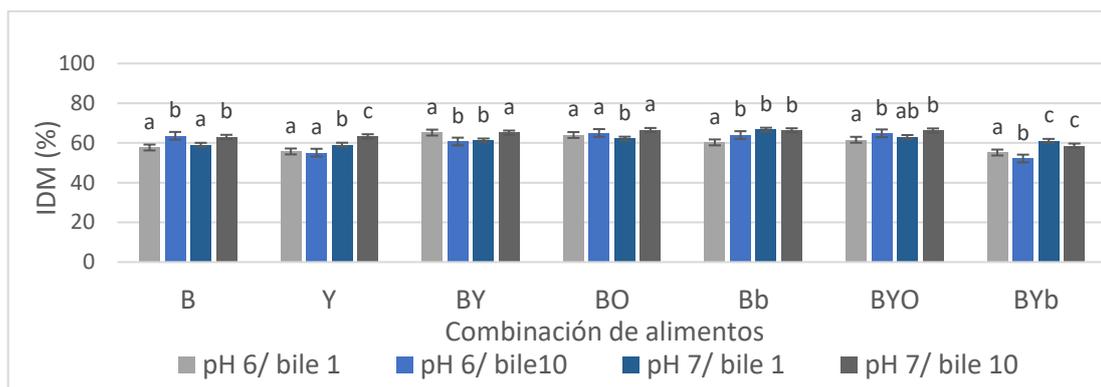


FIGURA 3.2. Influencia del pH (6 ó 7) y concentración biliar (1 ó 10 mM) a una dosis de Kreon® constante (2000 UL/g grasa) sobre el índice de degradación de la matriz (IDM) del pan con semillas, jamón york y sus combinaciones con aceite y mantequilla. Los acrónimos del eje X hacen referencia a pan con semillas (B), jamón york (Y), pan con jamón york (BY), pan con aceite (BO), pan con mantequilla (Bb), pan con jamón york y aceite (BYO) y pan con jamón york y mantequilla (BYb).

3.2. Influencia de las condiciones gastrointestinales sobre la extensión de la lipólisis

La lipólisis es un proceso metabólico en el que los triglicéridos se hidrolizan en ácidos grasos y monoglicéridos. La principal responsable de la hidrólisis es la lipasa pancreática pese a que necesita de las sales biliares y la colipasa para actuar efectivamente. En condiciones normales, la lipasa gástrica actúa en el estómago dando lugar a ácidos grasos libres y diglicéridos. Una vez en el intestino, los compuestos resultantes se emulsionan y son digeridos por la lipasa pancreática con ayuda de las sales biliares. La lipasa pancreática es activa a un pH mayor de 6 siendo su óptimo un pH de 8 (Bermúdez et al., 2004) (Wilde y Chu, 2011). En los pacientes con IPE, es de imaginar que la digestión sea muy complicada con una deficiencia enzimática y con pH muchas veces cercano a 6 o en ciertos casos, incluso menor.

En este estudio, la extensión de la lipólisis fue el centro de la investigación, puesto que como se ha comentado, los pacientes con IPE tienen principalmente problemas por hidrolizar las grasas. En las Figuras 3.3 y 3.4 es posible observar el efecto que presentan la dosis de pancreatina, el pH intestinal y la concentración biliar sobre la extensión de la lipólisis en las distintas combinaciones alimenticias digeridas.

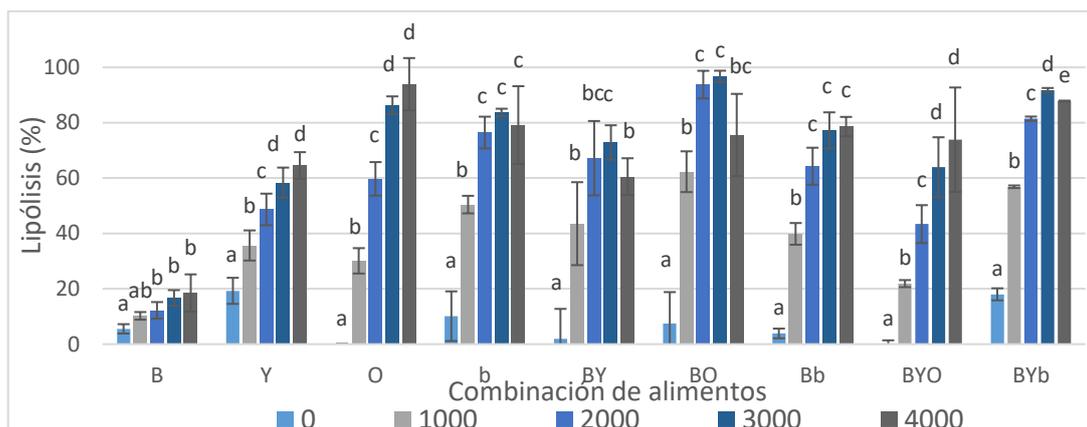


FIGURA 3.3. Extensión de la lipólisis (%) en el pan con semillas, york, aceite, mantequilla y sus combinaciones tras la etapa intestinal en función de la dosis de Kreon® (mg/ml) expresado en UL/g grasa. Los acrónimos del eje X hacen referencia a pan con semillas (B), jamón york (Y), aceite (O), mantequilla (b), pan con jamón york (BY), pan con aceite (BO), pan con mantequilla (Bb), pan con jamón york y aceite (BYO) y pan con jamón york y mantequilla (BYb).

Los resultados muestran una casi ausencia de lipólisis sin suplementación, y por tanto, en sujetos con IPE. Además, se observa una dependencia de la lipólisis a la suplementación con un aumento de ésta al aumentar la dosis de Kreon®, pudiéndose alcanzar en casi todos los casos, un 80 % de digestión de lípidos mediante la terapia de sustitución enzimática. Hay que destacar que, en el caso de la mantequilla, el pan con jamón york, el pan con aceite y el pan con jamón york y mantequilla, a dosis de Kreon® de 4000 UL/ g grasa, el porcentaje de la extensión de la lipólisis disminuye. Esto puede deberse a que se ha llegado previamente a la dosis a partir de cual la extensión es máxima, al menos en procesos in vitro, y la extensión ya no puede más que mantenerse o reducirse. En estos casos, sería conveniente confirmar en modelos in vivo que así es y que no se debe, en cambio, a ciertas limitaciones de la simulación in vitro en estático, como es la inhibición por producto. Estos resultados contribuirían a pautar de forma adecuada el suplemento y a evitar un aumento innecesario de la dosis, dado que un exceso no solo no supondría una mejora para el paciente, sino que podría empeorar la digestión de los lípidos.

En cuanto a la matriz alimentaria se refiere, la lipólisis en el pan de semillas es más baja que en el resto de los alimentos estudiados porque el mayor porcentaje de grasa se encuentra en las semillas, grasa difícilmente accesible para las lipasas pese a que haya una adecuada desestructuración oral. La grasa sólida e intramuscular del jamón york, también parece ser menos digerible que otros alimentos estudiados como indican los menores valores de lipólisis alcanzados (Tornberg, 2005). Todo lo contrario, ocurre en la mantequilla y el aceite, cuya grasa en forma libre, una vez emulsionada incluso a baja concentración biliar, es fácilmente accesible por las enzimas. Destacar, asimismo, que la extensión de la lipólisis en la mantequilla es más elevada que en aceite para dosis entre 1000 y 3000 UL/ g grasa debido a que su principal triglicérido (ácido palmítico) es de cadena más corta que el del aceite (ácido oleico), y a que en ésta el 55% de las grasas son saturadas frente

al 12% en el aceite. Esto se debe a que las grasas insaturadas debido a los dobles enlaces son más complicadas de digerir y que de igual manera, cuanto más larga es la cadena, más cuesta llevar a cabo su digestión (Zhang et al, 2015). Sin embargo, cabría esperar que cuando se combina el pan con el aceite o la mantequilla, la tendencia fuera la misma; no siendo así debido posiblemente a algún tipo de interacción entre estos alimentos.

En cuanto a la influencia de la bilis y el pH intestinal sobre la extensión de la lipólisis (Figura 3.4), la acción lipolítica fue por lo general mayor en condiciones gastrointestinales óptimas de pH 7 y concentración biliar 10 mM como era esperable.

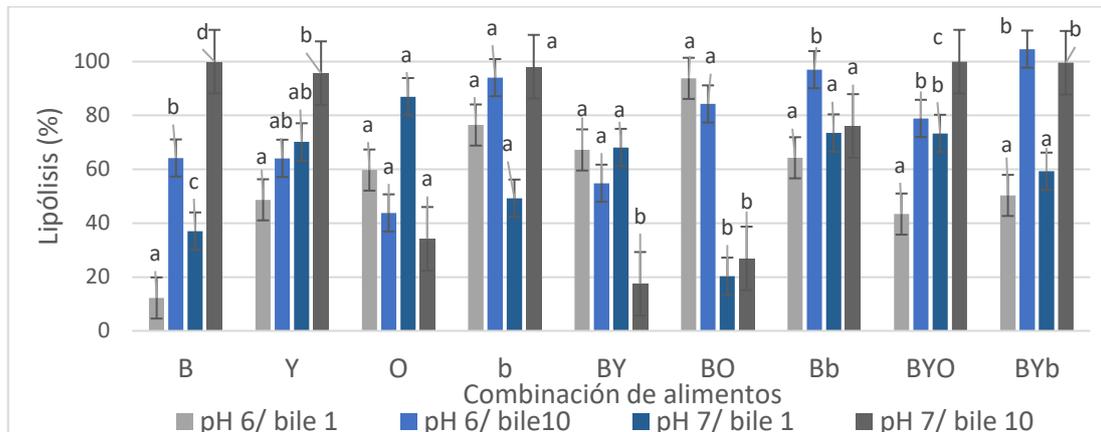


FIGURA 3.4. Extensión de la lipólisis (%) en el pan con semillas, york, aceite, mantequilla y sus combinaciones tras la etapa intestinal en función del pH (6 ó 7) y la concentración biliar (1 ó 10 mM). Los acrónimos del eje X hacen referencia a pan con semillas (B), jamón york (Y), aceite (O), mantequilla (b), pan con jamón york (BY), pan con aceite (BO), pan con mantequilla (Bb), pan con jamón york y aceite (BYO) y pan con jamón york y mantequilla (BYb).

Las sales biliares son biosurfactantes que generan una emulsión con las grasas permitiendo que la lipasa pancreática actúe. Si la concentración biliar es insuficiente, la lipasa no consigue actuar de forma adecuada (Maldonado-Valderrama et al. 2011). Sin embargo, hay algunos casos en los que al mejorar alguna de las condiciones de pH o concentración biliar no se produce una mejora en la extensión de la lipólisis. En estos casos se sospecha que seguramente la dosis de pancreatina requerida para una lipólisis total del 100% sea inferior a 2000 UL/ g grasa a pH 7 y concentración biliar 10 mM. De forma que por encima de ese valor de Kreon®, la lipólisis disminuye. Este es el caso de las mezclas pan con aceite, y pan con jamón york, para las que la extensión de la lipólisis se reduce considerablemente en las condiciones de un paciente sano estándar. Si se observa la Figura 3.3, puede apreciarse como en ambos casos la dosis óptima se sitúa entre 2000-3000 UL/ g grasa, para un pH y una concentración biliar sub-óptimos (6/1). De esto puede deducirse que en condiciones intestinales óptimas (7/10), sería necesaria una dosis menor para alcanzar valores más elevados de lipólisis, y por tanto en nuestro caso particular, una dosis de 2000 UL / g grasa es una dosis superior a la requerida. Esto explica que la digestión sea más efectiva respecto a los de otros alimentos y, por tanto, al mejorar las condiciones, hay una saturación.

En estos casos, sería conveniente analizar la influencia de las condiciones intestinales a una dosis menor, 1000 UL/ g grasa, por ejemplo, para confirmar si en estos casos se cumple el que en condiciones intestinales óptimas, mayor es la extensión de la lipólisis.

3.3. Influencia de las condiciones intestinales (Kreon®, pH y bilis) en la extensión de la glicólisis.

Esta determinación, conjuntamente a la de proteínas, fue complementaria al estudio de la extensión de la lipólisis para conocer cómo puede afectar este trastorno digestivo al resto de macronutrientes.

El almidón es un carbohidrato formado por amilosa (15-20%) y amilopectina (80-85 %) que es hidrolizado por la α -amilasa en los enlaces α 1-4 dando lugar a disacáridos, que por acción de otras enzimas terminarán siendo glucosa. La digestión el almidón empieza con la lipasa lingual, pero ocurre principalmente en el intestino donde la amilasa pancreática da lugar a la maltosa, dextrinas y maltotriosa. Así, parte del almidón se digiere en un periodo rápido de tiempo (20 minutos) y es conocido como “rapid digestible starch (RDS)”; parte en un periodo más lento (entre 20 y 120 minutos), “slow digestible starch (SDS)”. Tras 120 minutos de digestión, puede quedar parte del mismo sin digerir, “resistant starch (RS)”, el cual llegará al intestino grueso (Singh et al., 2010). La Figura 3.5 muestra la extensión de la glicólisis entendida como el sumatorio porcentual de RDS y SDS, siendo el porcentaje restante hasta el 100 %, el RS.

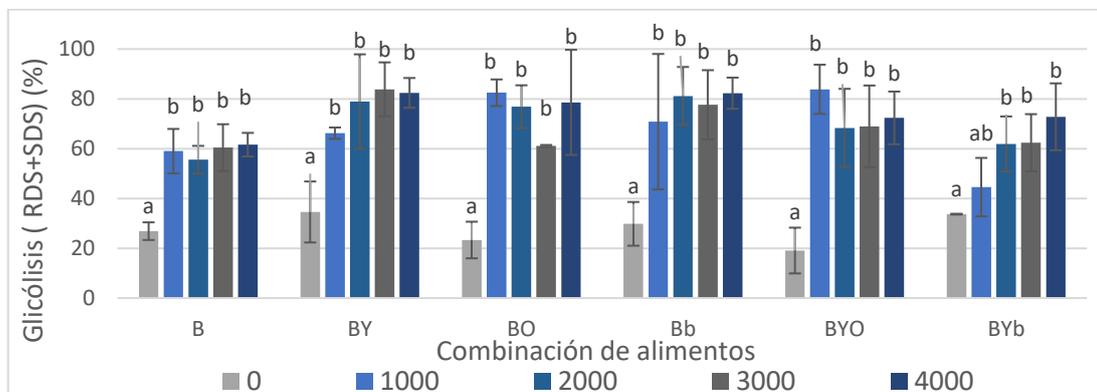


FIGURA 3.5. Influencia de la dosis de Kreon® en la extensión de la glicólisis (0-4000 UL/ g grasa) en el pan y sus combinaciones con jamón york, aceite y mantequilla manteniéndose constantes el pH (pH 6) y la concentración biliar (1 mM). Las letras minúsculas sobre las barras de error indican diferencias significativas entre los diferentes grupos con un nivel de confianza del 95 % (pvalor > 0,05). Los acrónimos del eje X hacen referencia a pan con semillas (B), pan con jamón york (BY), pan con aceite (BO), pan con mantequilla (Bb), pan con jamón york y aceite (BYO) y pan con jamón york y mantequilla (BYb).

En todos los casos, se observa una influencia de la presencia del suplemento enzimático, con respecto a los valores sin suplemento (0 UL/ g grasa), pero no del nivel de dosificación. Por tanto, es de destacar la importancia de la presencia de amilasa pancreática para llevar a cabo la hidrólisis de los carbohidratos en pacientes con IPE. Por otro lado, y teniendo

en cuenta que la dosificación del suplemento Kreon® se hace en la práctica clínica en función del contenido graso de los alimentos, es difícil poder evidenciar el efecto de las interacciones entre alimentos debido a que una dosis de 2000 UL/ g grasa por ejemplo, no equivalen a las mismas unidades amilasa (UA)/ g carbohidratos en todos los casos. Es por ello, que en la Figura 3.6 se muestra la extensión de la lipólisis (RDS+SDS) (%) en función de UA/ g carbohidratos. A la vista de los resultados, parece existir cierta interacción positiva en cuanto a la extensión de la glicólisis dado que ésta fue superior cuando el pan de semillas se combinó con el resto de alimentos. Esta interacción resulta evidente cuando se compara la glicólisis del pan solo (B) con la de sus combinaciones (BO, BY, Bb, BYO) a un valor similar de UA/ g carbohidratos (500 ó 7000 por ejemplo). Una excepción a este fenómeno fue el pan con jamón york y aceite (BYb).

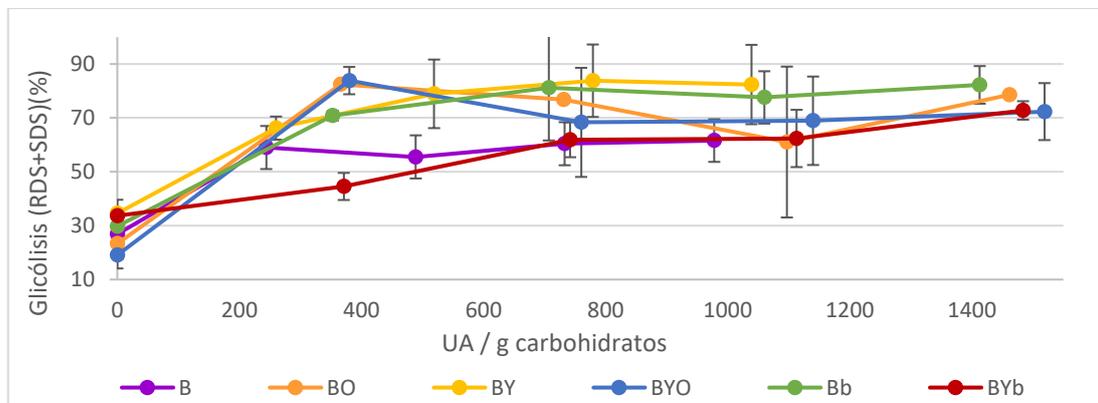


FIGURA 3.6. Extensión de la glicólisis (%) en el pan con semillas y sus combinaciones con aceite, mantequilla y jamón york en función de la UA / g carbohidratos. Los acrónimos del eje X hacen referencia a pan con semillas (B), pan con jamón york (BY), pan con aceite (BO), pan con mantequilla (Bb), pan con jamón york y aceite (BYO) y pan con jamón york y mantequilla (BYb).

En la Figura 3.7, se puede observar un ligero aumento de la extensión de la glicólisis al aumentar la concentración de sales biliares en algunos casos. No parece, sin embargo, existir una clara influencia del pH intestinal.

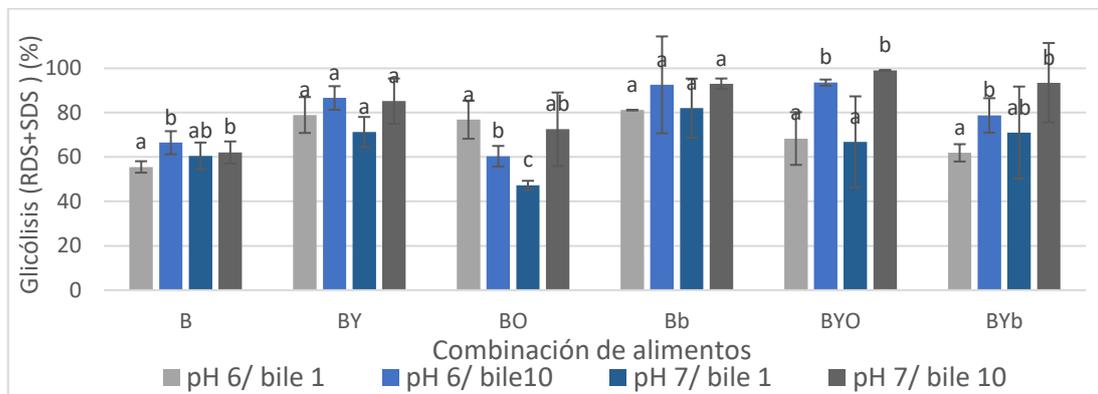


FIGURA 3.7. Influencia de pH (6 ó 7) y la concentración biliar (1 ó 10 mM) sobre la extensión de la glicólisis (RDS+SDS) (%) de pan con semillas y sus combinaciones con aceite, mantequilla y jamón york a dosis de Kreon® constante (2000 UL/g grasa equivalentes a 480, 760, 510, 740, 710, 710 UA/ g carbohidrato en B, BY, BO, Bb, BYO, y BYb, respectivamente).

Los acrónimos del eje X se refieren a pan integral (B), pan con jamón york (BY), pan con aceite (BO), pan con mantequilla (Bb), pan con jamón york y aceite (BYO) y pan con jamón york y mantequilla (BYb).

3.4. Influencia de las condiciones intestinales (Kreon®, pH y bilis) en la extensión de la proteólisis

La digestión de las proteínas comienza en el estómago gracias a la acción de la pepsina, la cual se activa por disminución del pH debido a la secreción de HCl. Aproximadamente el 15 % de la proteólisis tiene lugar en esta etapa dando lugar a péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos. El proceso prosigue en el intestino donde las proteasas pancreáticas (tripsina, carbopeptidasa y quimiotripsina) hidrolizan el resto de las proteínas (Griffiths, 2014). El proceso es complejo y es por ello, que siempre quedan proteínas y péptidos de tamaño variable que no se digieren y pasan al intestino grueso donde son metabolizados por la microbiota. El porcentaje de proteína digerido se determina a partir de la estimación cuantitativa de la fracción soluble de proteína que incluye aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular (Guerra et al., 2012).

En este estudio, la pepsina fue añadida al fluido gástrico y, por consecuencia, ante la ausencia de enzimas pancreáticas, existe un porcentaje de proteínas digeridas en el estómago simulado, tal y como se puede observar en el pan con semillas en la Figura 3.8. De la misma forma que ocurría con la glicólisis, resulta difícil comparar la extensión de la proteólisis al no ser equivalentes las dosis de Kreon utilizadas (1000-4000 LU/ g grasa) en términos de unidades proteasas (UP)/ g proteína para las diferentes combinaciones de alimentos. Por este motivo, en la Figura 3.9 se ha representado la extensión de la proteólisis (%) en función de las UP/ g proteína.

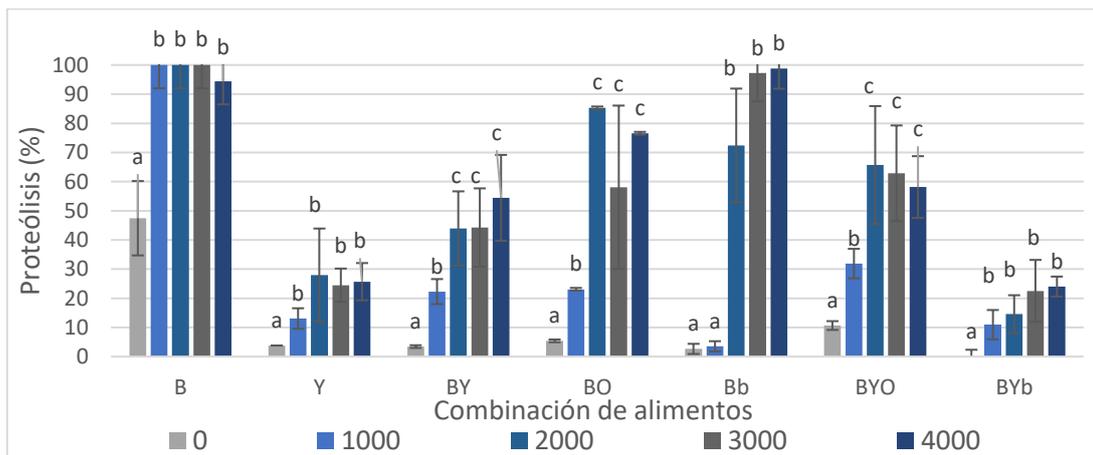


FIGURA 3.8. Influencia de la dosis de Kreon (UP/ g proteína) a pH y concentración biliar constante (pH 6 y 1 mM de concentración biliar) de pan con semillas, jamón york y sus combinaciones con aceite y mantequilla sobre la extensión de la proteólisis (%). Los acrónimos del eje X hacen referencia a pan integral (B), jamón york (Y), pan con jamón york (BY), pan con aceite (BO), pan con mantequilla (Bb), pan con jamón york y aceite (BYO) y pan con jamón york y mantequilla (BYb).

Las proteínas del pan resultaron ser de fácil digestión como se deduce de los elevados valores de proteólisis, mientras que el jamón york, alimento con ligeramente mayor contenido en proteínas, presenta niveles inferiores. Si bien el jamón york es de fácil digestión en comparación con otros productos cárnicos, como se ha comprobado en un estudio complementario llevado a cabo por este grupo (Toledo, 2016), su matriz es más compacta y compleja y, por tanto, es más complicado alcanzar un elevado porcentaje de proteólisis (Wen et al., 2015) si lo comparamos con el pan de semillas que contiene un 13% de proteínas aportadas por el gluten de trigo, la levadura y la harina de habas. Por otro lado, es posible observar que la adición de aceite o mantequilla al pan frente a la de jamón york, favorece la proteólisis; mientras que la presencia de jamón york, siempre disminuye ésta. De igual manera que en los carbohidratos, es difícil comparar los resultados al no corresponderse en todos la misma UP/ g proteína. Por ello, se presenta la Figura 3.9, donde se muestra este dato en función del alimento. A partir de estos resultados y comparando los resultados para un mismo alimento, es posible afirmar que el porcentaje de proteólisis en el caso del jamón york fue menor debido a que las UP/ g proteína es mucho menor en comparación con el resto.

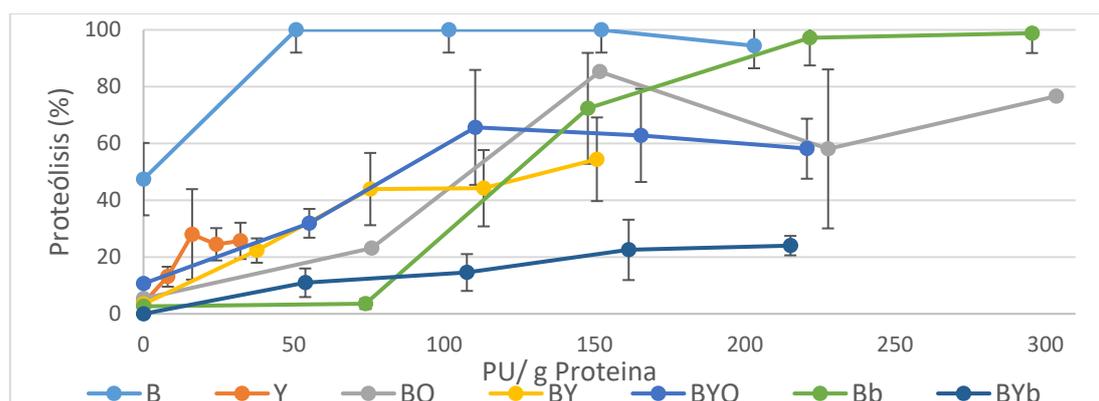


FIGURA 3.9. Extensión de la proteólisis en pan con semillas, jamón york y sus combinaciones con aceite y mantequilla en función de la UP / g proteína. Los acrónimos del eje X hacen referencia a pan con semillas (B), jamón york (Y), pan con jamón york (BY), pan con aceite (BO), pan con mantequilla (Bb), pan con jamón york y aceite (BYO) y pan con jamón york y mantequilla (BYb).

Por último, en la Figura 3.10 se muestran los valores del porcentaje de proteólisis alcanzados en función del pH y concentración biliar a 2000 UL/ g grasa. Como se puede observar, la proteólisis no pareció verse favorecida en condiciones intestinales de pH 7 y concentración biliar 10 mM, e incluso en muchos casos fue superior bajo las condiciones subóptimas de pH 6 y concentración biliar 1 mM.

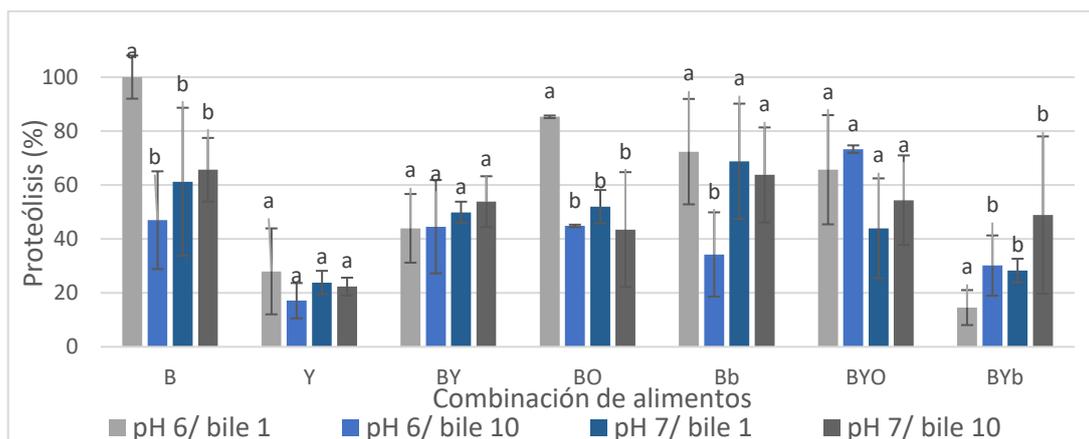


FIGURA 3.10. Influencia del pH (6 ó 7) y la concentración biliar (1 ó 10 mM) a una dosis de Kreon constante (2000 UL/ g grasa equivalentes a 100, 20, 75, 150, 145, 110, 110 UP/ g proteína en B, Y, BY, BO, Bb, BYO y BYb, respectivamente) sobre la extensión de la proteólisis (%) en pan con semillas, jamón york y sus combinaciones con mantequilla y aceite. Los acrónimos del eje X hacen referencia a pan con semillas (B), jamón york (Y), pan con jamón york (BY), pan con aceite (BO), pan con mantequilla (Bb), pan con jamón york y aceite (BYO) y pan con jamón york y mantequilla (BYb).

4. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir, que la suplementación enzimática contribuye a aumentar el índice de degradación de la matriz en el pan de semillas solo, o combinado con aceite, mantequilla y/o jamón york en una configuración tipo sándwich, siendo su valor del 60% aprox. con independencia de la dosificación o de las condiciones intestinales de pH y concentración biliar. Únicamente, el aumento de la dosis es significativo en la disgregación del jamón york digerido de forma aislada, debido a que presenta una estructura más fibrilar y compacta que el pan.

En cuanto a la lipólisis se refiere, la suplementación oral con pancreatina resultó esencial para que se produjera la hidrólisis de las grasas, siendo ésta muy dependiente a su vez de la estructura matricial del alimento y de las características fisicoquímicas de la grasa. La concentración biliar, responsable de la emulsión de las grasas, y un pH intestinal de 7 resultaron claves para completar la lipólisis (≈100%). La suplementación con pancreatina también aumentó la extensión de la proteólisis y glicólisis en los alimentos estudiados. Si bien en el caso de la proteólisis, ésta no pareció encontrarse limitada en condiciones de insuficiencia pancreática exocrina; la presencia de una molaridad normal de sales biliares (10 mM) sí aumentó la hidrólisis de los carbohidratos. Por último, pareció existir cierta interacción positiva en cuanto a la extensión de la glicólisis, dado que ésta fue superior cuando el pan de semillas se combinó con el resto de alimentos (mantequilla, aceite y/o jamón york). Asimismo, la matriz alimentaria y el tipo de proteínas determinaron la extensión de la proteólisis siendo esta mayor en pan de semillas que en jamón york por ejemplo, y viéndose influida a su vez por la adición de una fuente lipídica como la mantequilla o el aceite.

5. REFERENCIAS

- AOAC. 2000. Official methods of analysis. *Association of Official Analytical Chemists*. 15th edition
- Bartel, M.J.; Asbun, H.; Stauffer, J.; Raimondo, M. 2015. Pancreatic exocrine insufficiency in pancreatic cancer. *Digestive and liver disease*. 47, 1013-1020
- Bax, M.; Aubry, L.; Ferreira, C.; Daudin, J.; Gatellier, P.; Rémond, D.; Santé-Lhoutellier, V. 2012. Cooking temperatura is a key determinant of in vitro meat protein digestion rate: Investigation of underlying mechanism. *Journal of agricultural and food chemistry*. 60, 2569-2576.
- Bermúdez, B.; Pacheco, Y.M.; López, S.; Abia, R.; Muriana, F.J.G. 2004. Digestion and absorption of olive oil. *Grasas y aceites*. 55(1), 1-10
- Gao, J.; Wong, J.X.; Lim, J.C.; Henry, J.; Zhou, W. 2015. Influence of bread structure on human oral processing. *Journal of food engineering*. 167, 145-155
- Gelfond, D.; Ma, C.; Semler, J.; Borowitz, D. 2012. Intestinal pH and gastrointestinal transit profiles in cystic fibrosis patients measured by wireless motility capsule. *Digestive diseases and sciences*. 58(8), 2275-2281
- Griffiths, M. 2014. Lo esencial en aparato digestivo. Ed. Elsevier (Madrid).
- Guerra, A.; Etienne-Mesmin, L.; Livrelli, V.; Denis, S.; Blanquet-Diot, S.; Alric, M. 2012. Relevance and challenges in modelling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*. 30 (11), 591-600
- Lamothe, S.; Corbeil, M.; Turgeon, S. L.; Britten, M. 2012. Influence of cheese matrix on lipid digestion in a simulated gastrointestinal environment. *Food & function*. 3(7), 724-731
- Li, L.; Somerset, S. 2014. Digestive system dysfunction in cystic fibrosis: Challenges for nutrition therapy. *Digestive and liver disease*. 46, 865-874
- Maldonado-Valderrama, J.; Wilde, P.; Macierzanka, A.; Mackie, A. 2011. The role of bile salts in digestion. *Advances in colloid and interface science*. 165 (1), 36-46
- Minekus, M.; Alming, 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.; Mc Clements, D.J.; Ménard, O.; Recio, I.; Santos, C.N.; Singh, R.P.; Vegarud, G.E.; Wickham, M.S.J.; Weitschies, W.; Brodkorb, A. 2014. A standardized static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & function*. 5(6), 1113-1124.
- Mishra, S.; Monro, J.; Hedderley, D. 2008. Effect of processing on slowly digestible starch and resistant starch in potato. *Starch*. 60, 500-507
- Repin, N.; Cui, S.W.; Douglas, H. 2016. Impact of dietary fiber on in vitro digestion of modified tapioca starch: viscosity effect. *Bioactive carbohydrates and dietary fiber*.
- Sarkar, A.; Ye, A.; Singh, H. 2016. On the role of bile salts in the digestion of emulsified lipids. *Food hydrocolloids*. 60, 77-84
- Sikkens, E.C.M.; Cahen, D.L.; Kuipers, E.J.; Bruno, M.J. 2010. Pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis. *Best practice & research clinical gastroenterology*. 24 (3), 337-347

- Sikkens, E.C.M; Cahen, D.L.; Eijck, C.V.; Kuipers, E.J.; Bruno, M.J. 2012. The daily practice of pancreatic enzyme replacement therapy after pancreatic surgery: A Northern european survey. *Journal of gastrointestinal surgery*. 16(8), 1487-1492
- Singh, J.; Dartois, A.; Kaur, L. 2010. Starch digestibility in food matrix. *Food science and technology*. 21(4), 168-180
- Taghipoor, M.; Barles, G.; Georgelin, C.; Licois, J.R.; Lescoat, P. 2014. Digestion modelling in the small intestine: Impact of dietary fiber. *Mathematical biosciences*. 258, 101-112.
- Toledo, C. 2016. Influencia del procesado en la digestibilidad de lípidos en matrices cárnicas. Tesis final de master. Universitat Politècnica de València.
- Tornberg, E. 2005. Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products. *Meat science*. 70, 493 - 508
- Turck, D.; Braegger, C.P.; Colombo, C.; Declerq, D.; Morton, A.; pancheva, R.; Robberecht, E.; Stern, M.; Strandvik, B.; Wolfe, S.; Schneider, S.M.; Wilschanski, M. 2016. ESPEN-ESPGHAN-ECFS guidelines on nutrition care for infants, children and adults with cystic fibrosis. *Clinical nutrition*. 35(3), 557-577
- Wen, S.; Zhou, G.; Song, S.; Xu, X.; Voglmeir, J.; Liu, L.; Zhao, F.; Li, M.; Li, L.; Yu, X.; Bai, Y.; Li, C. 2015. Discrimination of in vitro and in vivo digestión products of meat proteins from pork, beef, chicken and fish. *Proteomics*. 15 (21), 3688-3698
- Wilde, P.J.; Chu, B.S. 2011. Interfacial & coloidal aspects of lipid digestion. *Advances in colloid and interface science*. 165 (1), 14-22
- Zhang, R.; Zhang, Z.; Zhang, H.; Dereck, E. A.; McClements, D.J. 2015. Influence of lipid type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions: In vitro digestión study. *Food Research International*. 75, 71-78