

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Influencia de factores inherentes al alimento y al individuo sobre la  
digestibilidad de lípidos de origen vegetal

*TESIS DOCTORAL*

Presentada por:

Carolina Alicia Paz Yépez

Dirigida por:

Dra. Ana María Andrés Grau

Dra. Ana Belén Heredia Gutiérrez

Julio 2019





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Dra. Ana María Andrés Grau, Catedrática de Universidad perteneciente al Departamento de Tecnología de Alimentos y Directora del Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la Universitat Politècnica de València,

Dra. Ana Belén Heredia Gutiérrez, Titular de Universidad perteneciente Departamento de Tecnología de Alimentos y miembro del Instituto Universitario de Ingeniería de alimentos para el desarrollo de la Universitat Politècnica de València,

CONSIDERAN: que la memoria titulada **“Influencia de factores inherentes al alimento y al individuo sobre la digestibilidad de lípidos de origen vegetal”** que presenta Dña. Carolina Alicia Paz Yépez, para aspirar al grado de Doctor de La Universitat Politècnica de València, y que ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la Universitat Politècnica de València, reúne las condiciones adecuadas para constituir su tesis doctoral, por lo que AUTORIZAN a la interesada para su presentación.

Valencia, Julio de 2019

Fdo.: Ana María Andrés Grau

Fdo.: Ana Belén Heredia Gutiérrez



**In Aeternum**, significa para toda la eternidad.

Me gusta pensar que hay instantes, personas y experiencias en la vida de uno que son para siempre. Aunque ya no estén, aunque ya no sea lo mismo, aunque el lugar físico ni siquiera exista. Va a perdurar en el aire, en alguna parte del mundo, eso va a ser, PARA SIEMPRE.

*A todos los que me han acompañado en este maravilloso capítulo de mi vida.*



A mi mami y mi papi (Sandra y Alberto) ustedes que me han motivado desde siempre a ser la mejor versión de mí, a luchar por todo aquello que me apasione y que llene por completo mi ser, alma y espíritu. Siempre me guiaron en esta aventura de vida regresándome a tierra cuando las fuerzas hacían falta o cuando los miedos intentaban apoderarse de los sueños, recordándome quien era aquella valiente mujer que han criado.

A mis hermanas, Sandra y Lorena, mis queridas repetidas. A Sandra, que con tú sinceridad y rudeza sin anestesia tan característica me has motivado siempre a ver las situaciones de una forma más clara. Luego me diste la mayor alegría de mi vida, nuestro Arturito, a la distancia cada video ha sido una dosis de felicidad directa a la vena. Mi Lore, que aunque la noticia de mi partida por la búsqueda de una meta lejos de casa, te daba tristeza y algo de temor, experimentaste el sentimiento de orgullo por tu pequeña hermana, el que me trasmites desde el día en que nos enteramos que la beca era una realidad y desde entonces tu presencia cada noche me recordaba que me acompañabas en este viaje (mi lunita lunera).

A mi abuelita Violeta, quien me ha regalado las sonrisas y los abrazos más motivadores, y me ha mantenido bien cuidada por mis angelitos, juntas hemos descubierto que a pesar de los miles de kilómetros que puedan existir, hay corazones unidos por una fuerza sobrenatural.

A Andrés, por todo el apoyo y la paciencia, acompañándome día tras día mientras me iba descubriendo desde escenarios diferentes. Por abriste aún más mis alas, gracias Guerrero!

Mis Rangers of Science, mi Trípode eterno, mis seres de luz, mis hermanos europeos: Andrea y Quim. Mentes con hambre incansable por aprender y compartirlo. A mi querida Andrea, porque me has enseñado de la vida mucho más de lo que te podrías imaginar. Enfrentándote al mundo con esa tú forma tan auténtica, contagiando libertad, reinventándonos desde nuestras imperfecciones, apoyándonos, aconsejándonos, respetándonos y lo más valioso de todo aceptándonos. A mi Quim más Kong, por ser inspiración durante todos estos años, sin duda alguna tú pasión por la ciencia y tu naturalidad para su difusión representa el modelo del científico de esta época, ese que desea transformar el mundo mostrándose a él como un ser auténtico, creativo, soñador, creador y muy trabajador. Esa calidad humana que tienes que me hizo sentir acogida desde el día uno en nuestro querido Lab, el apoyo constante en las distintas facetas que hemos experimentado, el hombro y los brazos para acogernos ante momentos duros de la vida que nos han convertido en seres aún más fuertes. Sin duda eres una huella imborrable en este capítulo de mi vida.

A Ever, por esa actitud realista, positiva y relajada que en ocasiones a muchos nos hace falta para enfrentarse a fracasos necesarios en nuestra formación como investigadores. Eres esa postura masculina del laboratorio que equilibra la locura de emociones en el L1-03.

A Mayra, mi ángel desde el 2014, juntas nos embarcamos a esta montaña rusa, enfrentándonos a ella cada una desde su forma de ser, aprendiendo sobre tolerancia y convivencia. Año tras año descubriéndonos y compartiendo emociones y también frustraciones distintas. Gracias por todos esos abrazos

que los sentía como familia. Por siempre seremos: “tú tan sopa y chipa Paraguaya y yo tan ceviche y encebollado”.

A Virginia, mi querida Vir, siempre tan atenta a cualquier necesidad que se presentaba, buscando como sea la forma de quitar o esquivar las piedras que se intentaban cruzar en el camino. Atenta hasta en el más mínimo detalle. Dueña de un cariño tan sincero que reconforta. La vida me ha regalado tus palabras, abrazos, fortaleza y consejos, en los momentos oportunos para ser guía y luz.

A todos los Técnicos del IIAD (Carolina, Mario, Milagro) por la apertura para enseñarme y ayudarme ante cualquier novedad que se presentaba al enfrentarme a un nuevo equipo.

A mis compañeros de la planta 1 por todos los buenos momentos, risas y tertulias durante los almuerzos y comidas.

A mis S/N (Marifer, Daca, Susi, Dani, Guto, Zavala, Michy, Josal) gracias por acompañarme a la distancia con mensajes divertidos, ánimos, y recordarme lo orgullosos que están siempre de mí. Con el paso del tiempo nos hemos ido reinventando en las distintas etapas que hemos experimentado durante estos 4 años, ahora cada vez más maduros, cada uno con su forma de enfrentar retos y a la vida misma, siempre tan distintos pero a la vez complementarios. Espero que ese reencuentro (completo) lo podamos vivir pronto.

A mi compadre Pedro, por acompañarme siempre durante estos años desde nuestra querida VLC o desde nuestra tierrita, pendiente de cada nuevo alcance, y fortaleciéndonos aún más desde otras experiencias de vida.

A mi querida embajada de Ecuador en VLC (Katherine, Jairo, Gabo, Carlos, Iván, María José, Josué, Terry, Antonio, Mafer, Anisa) han llenado de buenos e inmemorables momentos esta etapa de mi vida. Un grupo que sin duda se convirtió en familia. Cada uno con su inyección de personalidad y actitud para enfrentar la vida. Estando tan lejos de la tierrita pudimos sentir un pedacito de ella desde cada sazón o desde cada particularidad para expresar nuestras costumbres, que convertían cada reunión en una nueva oportunidad para coleccionar recuerdos y sonrisas, recordaremos Narnia por siempre!. Con cada experiencia vivida por estos lados, podemos afirmar que hemos evolucionado. Nos hemos atrevido a salir de nuestra zona de confort, y en ese proceso nos hemos descubierto con capacidades para enfrentar situaciones solos, ahora no hay nada que nos detenga, solo es cuestión de soñar, plantearlo y trabajar muy duro para hacerlo realidad.

A mis Tutoras (Ana Andrés y Ana Heredia), no hay duda alguna que tuve la dicha de aprender junto a mujeres de ciencia extraordinarias, exigentes con la calidad en los trabajos, auténticos ejemplo de mujeres empoderadas. Siempre tan cercanas y con la completa disposición en la transmisión del conocimiento. Otorgando en el camino la confianza suficiente para permitirme descubrir y desarrollar capacidades investigativas, enseñándome que en la resolución de los experimentales fallidos y en las múltiples correcciones de escritura es en donde más se aprende y se desarrollan las competencias investigativas y

humanas que marcan la diferencia entre seres con excelencia científica y simples máquinas de laboratorio.

Ana Andrés, tutora, amiga y madre Europea, me quedan cortas las palabras para expresar mi agradecimiento por acompañarme y aconsejarme en el camino por descubrir a esta nueva mujer de ciencia e independiente de pensamientos y acciones en la que me voy convirtiendo. Siempre con las palabras adecuadas para hacerme entender que cada experiencia en la vida sirve para fortalecernos y enfrentarnos a nuestros propios miedos e inseguridades sin permitir estancarnos, buscando soluciones que hagan que primen por sobre todo nuestra propia estabilidad emocional.



## RESUMEN

La incorporación de lípidos en la alimentación del ser humano resulta esencial para lograr una correcta homeostasis en el individuo. Las propiedades fisicoquímicas de los lípidos están condicionadas por el origen y su estructura, determinando su interacción con otros componentes de la matriz alimentaria. Estos factores considerados como inherentes al alimento, junto con las condiciones fisiológicas del entorno digestivo propias de cada individuo, pueden modular la digestibilidad y la posterior absorción intestinal de los lípidos. Así por ejemplo, en el contexto de las patologías que cursan insuficiencia pancreática exocrina (IPE) como es el caso de la fibrosis quística (FQ), la maldigestión de alimentos y malabsorción de nutrientes, especialmente de los lípidos, es una de las principales consecuencias. En estos casos, los pacientes siguen una serie de recomendaciones médicas y dietéticas que consisten en la administración oral de un suplemento enzimático de pancreatina encapsulada así como en un aumento de la ingesta de alimentos con alto contenido lipídico. En este escenario, los alimentos lipídicos de origen vegetal como frutos secos, semillas, así como alimentos formulados con derivados de estos, son especialmente recomendados por su perfil lipídico rico en ácidos grasos mono y poliinsaturados. La metodología de simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal permite imitar los procesos bioquímicos propios del tracto gastrointestinal estableciendo las condiciones propias del medio (pH, concentración de enzimas, sales biliares, etc.) según la etapa digestiva. Esta metodología está avalada por la comunidad científica del área de Ciencia y Tecnología alimentaria, para analizar la influencia de los diversos factores implicados en la digestibilidad y bioaccesibilidad de nutrientes en condiciones fisiológicas concretas como por ejemplo las determinantes de la Fibrosis Quística. El objetivo principal de esta tesis doctoral fue analizar la influencia de los factores inherentes al alimento sobre la digestibilidad lipídica y bioaccesibilidad de compuestos bioactivos en matrices alimentarias ricas en lípidos de origen vegetal. Las matrices seleccionadas fueron: semillas y germinados de chía, frutos secos (nueces y cacahuetes), chocolates (negro, con leche y blanco) y productos de panadería (pan integral, pan blanco,

galletas tipo María, galletas con pepitas de chocolate, pastel de chocolate, donut, gofre, croissant y magdalenas). Estas fueron seleccionadas principalmente en base a los resultados de encuestas nutricionales sobre consumo frecuente de alimentos en pacientes pediátricos de Fibrosis Quística. Otro de los objetivos centrales fue analizar la influencia de las condiciones gastrointestinales características de la FQ (pH intestinal subóptimo, secreción biliar y pancreática reducidas) sobre la lipólisis y bioaccesibilidad de compuestos bioactivos. Así, los resultados de esta tesis permiten afirmar que la estructura matricial, su composición, el tipo de procesado y la interacción entre nutrientes son determinantes en la lipólisis y bioaccesibilidad de algunos compuestos bioactivos en condiciones intestinales alteradas como sucede en FQ, teniendo menor repercusión en condiciones estándares de adulto sano. Así por ejemplo, en el caso de la chía y los frutos secos se evidenció que un mayor nivel de desestructuración (reducción de tamaño de las matrices) resulta en una mejor digestibilidad de los macronutrientes. Por otro lado, determinados procesos como la germinación de semillas de chía se traduce en una mejora en la digestibilidad lipídica y bioaccesibilidad de compuestos fenólicos. En el caso de chocolates y productos de panadería cabe destacar que su composición (contenido y tipo de grasa, proteínas, emulsificantes, etc.) juegan un papel esencial en la digestibilidad de macro y micronutrientes. Finalmente, los ensayos realizados a distintas dosis de suplemento enzimático permitieron identificar que las dosis adecuadas para mejorar la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos, así como para lograr una óptima extensión de la lipólisis no son únicamente en función de la cantidad de grasa. La modelización de los resultados experimentales obtenidos en cuanto a la dosificación enzimática en condiciones FQ, permitió obtener una herramienta para la predicción de la dosis óptima de enzimas recomendable en el tratamiento clínico de terapia de sustitución enzimática en pacientes con fibrosis quística.

## **ABSTRACT**

Incorporation of lipids in the diet of human beings is essential to achieve a correct homeostasis in the individual. The physicochemical properties of lipids are conditioned by the origin and the structure, determining its interaction with other components of the food matrix. These factors are considered as inherent to the food, and together with the physiological conditions of the digestion lumen, can modulate the digestibility and subsequent intestinal absorption lipid absorption. Thus, in the context of pathologies that present with exocrine pancreatic insufficiency (IPE), such as cystic fibrosis (CF), food maldigestion and malabsorption of nutrients, especially lipids, is one of the main consequences. In these cases, patients follow a series of medical and dietary recommendations, including the oral administration of encapsulated pancreatin enzyme supplements and high intake of lipid-rich foods. Plant-origin foods such as nuts, seeds and derivate foods are especially recommended because of their lipid profile, which is rich in mono and polyunsaturated fatty acids. The methodology of *in vitro* simulation of gastrointestinal digestion allows for imitating the biochemical processes of the gastrointestinal tract establishing the specific conditions (pH, concentration of enzymes, bile salts, etc.) according to the digestive stage. This methodology is endorsed by the scientific community in the area of Food Science and Technology, to analyze the influence of various factors involved in the digestibility and bioavailability of nutrients under specific physiological conditions, such as those which are determinants of Cystic Fibrosis. The main objective of this doctoral thesis was to analyze the influence of inherent-to-food factors on the lipid digestibility and bioaccessibility of bioactive compounds in food matrices rich in vegetable lipids. The selected matrices were: seeds and sprouts of chia, nuts (walnuts and peanuts), chocolates (black, with milk and white) and bakery products (wheat bread, white bread, cookies, cookies with chocolate chips, chocolate cake, donut, waffle, croissant and muffins). These were mainly selected based on the results of nutritional surveys on frequent food consumption in pediatric with Cystic

Fibrosis. Another main objective was to analyze the influence of the characteristic gastrointestinal conditions of Cystic Fibrosis (suboptimal intestinal pH, reduced biliary and pancreatic secretion) on the lipolysis and bioavailability of bioactive compounds. Thus, the results of this thesis allow us to affirm that the matrix structure, its composition, the type of processing and the interaction between nutrients, are determinants of lipolysis and bioavailability of some bioactive compounds in altered intestinal conditions as in CF, having less repercussion in standard healthy adult conditions. For example, in the case of chia and nuts, it was evident that a greater reduction of size of the matrices results in a better macronutrient digestibility. On the other hand, germination of chia seeds results in an improvement in the lipid digestibility and bioavailability of phenolic compounds. In the case of chocolates and bakery products it should be noted that their composition (content and type of fat, proteins, emulsifiers, etc.) play an essential role in the digestibility of macro and micronutrients. Finally the tests carried out at different doses of enzyme supplement allowed for identifying that the adequate doses to improve the bioavailability of bioactive compounds, as well as to achieve optimal lipolysis, are not only dependent of the amount of fat. The modeling of the experimental results obtained in terms of enzymatic dosing under Cystic Fibrosis conditions allowed the development of a tool for the prediction of the optimal dose of enzymes recommended for the clinical treatment of enzyme replacement therapy in patients with cystic fibrosis.

## RESUM

La incorporació de lípids en l'alimentació de l'ésser humà resulta essencial per aconseguir una correcta homeostasi en l'individu. Les propietats fisicoquímiques dels lípids estan condicionades per l'origen i la seua estructura, determinant la seua interacció amb altres components de la matriu alimentària. Estos factors considerats com inherents a l'aliment, junt amb les condicions fisiològiques de l'entorn digestiu pròpies de cada individu, poden modular la digestibilitat i la posterior absorció intestinal dels lípids. Així per exemple, en el context de les patologies que cursen insuficiència pancreàtica exocrina (IPE) com és el cas de la fibrosi quística (FQ), la maldigestió d'aliments i malabsorció de nutrients, especialment dels lípids, és una de les principals conseqüències. En estos casos, els pacients segueixen una sèrie de recomanacions mèdiques i dietètiques que consistixen en l'administració oral d'un suplement enzimàtic de pancreatina encapsulada així com en un augment de la ingesta d'aliments amb alt contingut lipídico. En este escenari, els aliments lipídics d'origen vegetal com a fruits secs, llavors, així com aliments formulats amb derivats d'estos, són especialment recomanats pel seu perfil lipídico, que és ric en àcids grassos mono i poliinsaturats. La metodologia de simulació in vitro de la digestió gastrointestinal permet imitar els processos bioquímics propis del tracte gastrointestinal establint condicions pròpies del mig (pH, concentració d'enzims, sals biliars, etc.) segons l'etapa digestiva. Esta metodologia està avalada per la comunitat científica de l'àrea de Ciència i Tecnologia alimentària, per a analitzar la influència dels diversos factors implicats en la digestibilitat i bioaccessibilitat de nutrients en condicions fisiològiques concretes com per exemple les determinants de la Fibrosi Quística. L'objectiu principal d'esta tesi doctoral va ser analitzar la influència dels factors inherents a l'aliment sobre la digestibilitat lipídica i bioaccessibilitat de compostos bioactius en matrius alimentàries riques en lípids d'origen vegetal. Les matrius seleccionades van ser: llavors i germinats de xia, fruites seques (anous i cacauets) , xocolates (negre, amb llet i blanc) i productes de forn (pa integral, pa blanc, galletes, galletes amb llavors de xocolate, pastís de xocolate, donut, gofre,

croissant i magdalenes). Estos van ser seleccionats principalment basant-se en els resultats d'enquestes nutricionals sobre consum freqüent d'aliments en pacients pediàtrics de Fibrosi Quística. Un altre dels objectius centrals va ser analitzar la influència de les condicions gastrointestinals característiques de la FQ (pH intestinal subòptim, secreció biliar i pancreàtica reduïdes) sobre la lipòlisi i bioaccessibilitat de compostos bioactius. Així, els resultats d'esta tesi permeten afirmar que l'estructura matricial, la seua composició, el tipus de processat i la interacció entre nutrients són determinants en la lipòlisi i bioaccessibilitat d'alguns compostos bioactius en condicions intestinals alterades com succeïx en FQ, tenint menor repercussió en condicions estàndards d'adult sa. Així per exemple, en el cas de la xia i els fruits secs es va evidenciar que un major nivell de desestructuració (reducció de grandària de les matrius) resulta en una millor digestibilitat dels macronutrients. D'altra banda, la germinació de llavors, de xia, millora en la digestibilitat lipídica i bioaccessibilitat de compostos fenòlics. En el cas del xocolates i productes de forn cal destacar que la seua composició (contingut i tipus de greix, proteïnes, emulsificants, etc.) juguen un paper essencial en la digestibilitat de macro i micronutrients. Finalment els assajos realitzats a distintes dosis de suplement enzimàtic van permetre identificar que les dosis adequades per a millorar la bioaccessibilitat de compostos bioactius, així com per a aconseguir una òptima extensió de la lipòlisi no són únicament funció de la quantitat de greix. La modelització dels resultats experimentals obtinguts pel que fa a la dosificació enzimàtica en condicions FQ, va permetre obtindre una ferramenta per a la predicció de la dosi òptima d'enzims recomanable per al tractament clínic de teràpia de substitució enzimàtica en pacients amb fibrosi quística.

## ***PREFACIO***

### **Justificación e interés del estudio**

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria autosómica más común en Europa, con más de 38000 casos registrados. La mayoría de los pacientes (85%) padece Insuficiencia Pancreática Exocrina (IPE). La IPE se caracteriza por la incapacidad del páncreas para sintetizar los requerimientos enzimáticos necesarios para la correcta digestión de los alimentos dando lugar a una maldigestión y malabsorción de nutrientes, especialmente de los lípidos. La incidencia de IPE es especialmente relevante en pacientes pediátricos, pues conlleva un retraso en su crecimiento y desarrollo fisiológico. La IPE puede ser tratada clínicamente a través de una terapia de suplementación enzimática (TSE), que consiste en la administración oral, en cada ingesta alimentaria, de enzimas pancreáticas encapsuladas, acompañada de un seguimiento nutricional. La dosificación de esta terapia se basa actualmente en la experiencia médica, sintomatología clínica del paciente, y contenido total de grasa del alimento/plato. Sin embargo, estos criterios parecen ser insuficientes ya que los pacientes siguen presentando deficiencias en la digestión de alimentos y absorción de nutrientes que no sólo conducen al empeoramiento del estado nutricional, sino que también provocan manifestaciones marginales ocasionando dolor abdominal y esteatorrea y en general empeoramiento de la esperanza de vida y de la calidad de vida del paciente de FQ.

En cuanto al criterio “grasa total del alimento”, son diversos los estudios científicos que demuestran que la cinética de la liberación de ácidos grasos, y su extensión final, durante la digestión se encuentra modulada por diversos factores inherentes al alimento tales como la estructura, naturaleza y estado químico de la grasa, interacciones entre macronutrientes, entre otros. Por tanto, estos factores podrían afectar también a la efectividad de la TSE. De acuerdo a lo anteriormente expuesto, parece necesario elucidar la influencia de estos factores inherentes al alimento sobre la TSE en el contexto de las condiciones gastrointestinales de IPE para ajustar de

forma más adecuada la dosis de suplemento en cada alimento/plato y mejorar la efectividad de la terapia.

Así, la presente tesis doctoral ha sido desarrollada en el marco del proyecto multidisciplinar “*Innovative approach for self-management and social welfare of cystic fibrosis patients in europe: development, validation and implementation of a telematics tool (MyCyFAPP)*” ([www.mycyfapp.eu](http://www.mycyfapp.eu)) financiado por la Unión Europea en el contexto del Programa Horizonte 2020 (Grant Agreement: 643806). El objetivo global del mismo ha sido el desarrollo de una aplicación móvil (APP) dirigida a pacientes pediátricos con FQ para los que se busca fomentar, a través de la APP, una mayor autogestión de la enfermedad en aspectos relacionados con su estado nutricional y con la dosificación de la TSE. En este último sentido, los objetivos de los paquetes de trabajo 2 y 3 del proyecto, liderados por el Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la Universitat Politècnica de València, han sido: (a) establecer una metodología estandarizada para simular la digestión *in vitro* en condiciones gastrointestinales de IPE, (b) digerir *in vitro* un número representativo de alimentos pertenecientes a los grupos alimentarios que contribuyen mayoritariamente a la ingesta de lípidos a través de la dieta de niños FQ, con el fin de (c) generar una base de datos y un modelo predictivo de la dosis óptima de enzimas a través de la APP. La metodología experimental aplicada ha permitido, a su vez, generar conocimiento en cuanto a cómo los factores inherentes a los alimentos (composición química, estructura molecular de los lípidos, matriz alimentaria) y las condiciones gastrointestinales (composición de los fluidos digestivos y pH intestinal), afectan a la hidrólisis de los lípidos dietéticos. En este sentido, la presente tesis doctoral recoge parte de los resultados obtenidos en MyCyFAPP y concretamente los relacionados con la digestión *in vitro* de matrices alimentarias que contienen lípidos de origen vegetal de forma nativa o incluidos en su formulación.

### **Difusión en revistas indexadas.**

1. Paz-Yépez, C., Peinado, I., Heredia, A., & Andrés, A. (2019). Lipids digestibility and polyphenols release under in vitro digestion of dark, milk and white chocolate. *Journal of Functional Foods*, 52, 196–203.
2. Paz-Yépez, C., Peinado, I., Heredia, A., & Andrés, A. (2019). Influence of particle size and intestinal conditions on in vitro lipid and protein digestibility of walnuts and peanuts. *Food Research International*, 119, 951-959

### **Difusión en congresos internacionales**

1. I. Peinado, A. Asensio-Grau, A. Heredia, C. Paz-Yépez y A. Andrés. Influence of particle size after chewing on fat availability of different nuts. **5th International Conference on Food Digestion**. Abril 2017. (Rennes, Francia). Póster
2. C. Paz-Yépez, V. Zegada, A. Heredia and A. Andrés. Matrix effects and influence of intestinal conditions on lipid digestion of different types of chocolate. **4th International & 5th National Student Congress of Food Science and Technology**. Febrero 2018. (Valencia, España). Póster
3. C. Paz-Yépez, A. Heredia and A. Andrés. Influence of intestinal conditions on lipid digestion in bakery products and their interaction with milk consumption. **32nd EFFoST International Conference. Developing innovative food structures and functionalities through process and reformulation to satisfy consumer needs and expectations**. Noviembre 2018. (Nantes, Francia). Póster
4. C. Paz-Yépez, J. Calvo-Lerma, A. Heredia and A. Andrés. Data modelling for predicting the optimal pancreatine dose for the adequate digestion of bakery products in patients with exocrine pancreatic insufficiency. **VI International Student Congress of Food Science and Technology**. Febrero 2019. (Valencia, España). Póster



**TABLA DE CONTENIDOS**

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	Lípidos y salud .....	3
1.1.1.	Clasificación y estructura general de los lípidos dietarios .....	3
1.1.2.	La importancia de los lípidos en la salud .....	6
1.2.	Proceso digestivo y digestión de lípidos alimentarios .....	8
1.2.1.	Proceso digestivo .....	8
1.2.2.	Digestión de lípidos alimentarios.....	13
1.2.2.1.	Lípidos en la etapa oral .....	13
1.2.2.2.	Lípidos en el estómago .....	13
1.2.2.3.	Lípidos en el intestino delgado .....	14
1.2.2.4.	Lípidos en el colon.....	16
1.3.	Factores que influyen en la digestibilidad de los lípidos.....	17
1.3.1.	Factores inherentes al alimento .....	18
1.3.2.	Factores inherentes al individuo.....	22
1.4.	Fibrosis quística y terapia de sustitución enzimática.....	25
1.4.1.	Fibrosis Quística e Insuficiencia Pancreática Exocrina.....	26
1.4.2.	Terapia de Sustitución Enzimática .....	29
1.5.	Modelos de estudio de digestión <i>in vitro</i> de alimentos.....	30
1.5.1.	Modelos de digestión <i>in vitro</i> estáticos y dinámicos.....	32
2.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....	35
2.1	Objetivos.....	37
2.1.	Plan de trabajo .....	39
3.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	41
3.1.	Selección de Matrices y preparación de muestras .....	43
3.1.1	Chía.....	44
3.1.2	Frutos Secos (Nueces y Cacahuets).....	45
3.1.3	Chocolates.....	46
3.1.4	Productos de panadería.....	47

## TABLA DE CONTENIDOS

3.2.	Simulación <i>In vitro</i> de la digestión gastrointestinal .....	51
3.3.	Determinaciones Analíticas.....	54
3.3.1.	Índice de Degradación de la Matriz (IDM (%)).....	55
3.3.2.	Digestibilidad Proteica -Parámetros cinéticos de la proteólisis. .	55
3.3.3.	Análisis de Ácidos Grasos Libres (AGL) .....	57
3.3.3.1.	Determinación de ácidos grasos libres (AGL) mediante ensayo colorimétrico .....	57
3.3.3.2.	Determinación de AGL por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) .....	58
3.3.4.	Contenido total de polifenoles .....	59
3.3.5.	Actividad antioxidante total.....	60
4.	RESULTADOS .....	63
4.1	Digestibilidad lipídica y bioaccesibilidad de antioxidantes en semillas y germinados de chía .....	65
4.1.1.	Caracterización de las semillas de chía antes y después de la germinación .....	72
4.1.2.	Distribución del tamaño de partícula en semillas después de la simulación del proceso mecánico de masticación de semillas de chía .....	74
4.1.3.	Influencia de la germinación y de las condiciones intestinales en la digestibilidad lipídica de la chía .....	75
4.1.4.	Influencia de las condiciones intestinales en la bioaccesibilidad de fenoles totales y en la capacidad antioxidante de los digeridos de semillas y germinados de chía. ....	77
4.1.5.	Conclusiones .....	82
4.2	Influencia del tamaño de partícula y de las condiciones intestinales en la digestibilidad <i>in vitro</i> de lípidos y proteínas en nueces y cacahuets .....	83
4.2.1	Influencia de las condiciones intestinales del individuo y del tamaño de partícula sobre el índice de degradación de la matriz. ....	89
4.2.2	Influencia de las condiciones intestinales y del tamaño de partícula de los frutos secos en la digestibilidad de las proteínas .....	92
4.2.3	Influencia de las condiciones intestinales y del tamaño de partícula de las nueces sobre la digestibilidad lipídica .....	98

4.2.4	Conclusiones .....	105
4.3	Influencia de las condiciones intestinales en la digestibilidad lipídica y liberación de polifenoles en distintos tipos de chocolate (negro, con leche y blanco).....	107
4.3.1	Efecto de las condiciones intestinales sobre el índice de degradación de la matriz (IDM) en los chocolates digeridos.....	113
4.3.2	Efecto de las condiciones intestinales en la liberación y bioaccesibilidad final de polifenoles de chocolate .....	115
4.3.3	Afectación de la extensión de la lipólisis por el tipo de chocolate y las condiciones intestinales.....	123
4.3.4	Conclusiones .....	127
4.4	Digestibilidad lipídica en productos de panadería y propuesta de un modelo de estimación de la dosis de suplemento enzimático para su adecuada digestión .....	129
4.4.1.	Influencia de las condiciones intestinales del individuo sobre el índice de degradación de la matriz y porcentaje de lipólisis en productos panadería .....	135
4.4.1.1	Influencia de distintas condiciones intestinales sobre el Índice de Degradación de la Matriz .....	135
4.4.1.2	Influencia de las condiciones intestinales en la digestibilidad de los lípidos.....	137
4.4.2.	Estimación de la Dosis Óptima Teórica (DOT) del suplemento enzimático para una adecuada digestión de los productos de panadería.....	141
4.4.2.1	Criterios para establecer la Dosis Óptima Teórica (DOT). .....	144
4.4.3.	Correlación de la Dosis Óptima Teórica (DOT) de pancreatina con la composición de los productos de panadería. ....	146
4.4.4.	Conclusiones: .....	150
5.	OBSERVACIONES FINALES .....	151
6.	BIBLIOGRAFIA.....	155



ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Estructura de un triglicérido que incluye al glicerol y las tres cadenas de ácidos grasos.....	3
<b>Figura 1.2.</b> Proceso enzimático en la etapa oral. Acción de la $\alpha$ -amilasa rompiendo las cadenas de polisacáridos.....	9
<b>Figura 1.3.</b> Acción enzimática durante la etapa gástrica. Acción de la pepsina sobre las proteínas dando como resultado péptidos. Acción de Lipasa gástrica que inician la digestibilidad de los triglicéridos.....	10
<b>Figura 1.4.</b> Acción enzimática durante etapa intestinal por acción de pancreatina, posterior absorción de macronutrientes en vellosidades de enterocitos y paso al torrente sanguíneo. A. Acción amilasa. B. Acción proteasa C. Acción Lipasas.....	12
<b>Figura 1.5.</b> Actuación de la proteína CFTR como un canal de cloro entre el interior y el exterior de la célula. El defecto genético modifica el transporte del cloro, provocando una secreción de moco espeso que da como consecuencia complicaciones respirar. ....	27
<b>Figura 2.1.</b> Esquema de aplicación de objetivos específicos planteados según matrices alimentarias escogidas en el estudio.....	38
<b>Figura 3.1.</b> Diagrama del plan experimental desarrollado en los estudios de digestión <i>in vitro</i> . ....	43
<b>Figura 3.2.</b> Equipo germinador de semillas de chía y Termostato regulador de nebulizaciones.....	45
<b>Figura 3.3.</b> Semillas de Chía Germinadas luego de 10 días .....	45
<b>Figura 4.1.</b> Esquema del desarrollo del plan experimental para la evaluación de la digestión lipídica y bioaccesibilidad de antioxidantes en semillas de chía y sus germinados.....	71
<b>Figura 4.2.</b> Extensión de la lipólisis (%) en semillas y germinados de chía sometidos a digestión <i>in vitro</i> en condiciones intestinales subóptimas de fibrosis quística (pH 6 y concentración biliar 1 mM) y adulto sano (pH 7 y concentración biliar 10Mm con dosis de suplemento enzimático 2000 UL g grasa. ....	76
<b>Figura 4.3.</b> Correlación entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los digeridos de semillas y germinados de chía, así como de las muestras no digeridas. ....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 4.4.** Esquema del desarrollo del plan experimental de frutos secos .....88
- Figura 4.5.** Parámetros de digestibilidad proteica ( $OD_{max}$  y  $\Delta OD/h$ ) de nueces y cacahuets con tamaño de partícula grande ( $> 1.2$  mm) y pequeño ( $< 1.2$  mm) digeridas a diferentes condiciones intestinales pH (6 o 7), concentración biliar (1 o 10 mM) usando una dosis fija de enzima pancreatina (2000 UL/ g grasa equivalentes a 459 UP/g proteína en nueces y 247 UP/g proteína en cacahuets). .....95
- Figura 4.6.** Parámetros de digestibilidad de proteínas ( $OD_{Max}$  y pendiente inicial  $\Delta OD / h$ ) de nueces y cacahuets con tamaños de partícula grandes ( $> 1.2$  mm) y pequeños ( $<1.2$  mm) digeridos en condiciones intestinales de pH 6 y concentración biliar 1 mM, con diferentes dosis de pancreatina (0 -4000 UL / g de grasa equivalente a 0-229-459-688-918 UP / g de proteína en las nueces, y de 0-124-247-371-494 PU / g de proteína en el cacahuete). .....96
- Figura 4.7.** Perfil de ácidos grasos libres en nueces y cacahuets digeridos. A y B representan los digeridos *in vitro* con una concentración de pancreatina fija (2000 UL / g de grasa) y diferentes combinaciones de pH intestinal y concentración de bilis (pH 6 o 7, concentración de sales biliares de 1 o 10 mM); C y D representan los digeridos *in vitro* en condiciones intestinales fijas (pH 6 y concentración biliar 1 mM) y diferentes concentraciones de pancreatina (0-4000 UL / g de grasa). .....104
- Figura 4.8.** Esquema del desarrollo del plan experimental para la evaluación de la digestión lipídica y bioaccesibilidad de antioxidantes en chocolates..112
- Figura 4.9.** Contenido de polifenoles (mg de ácido gálico eq / g de chocolate) tras la digestión oral, gástrica e intestinal de los diferentes tipos de chocolates (negro, leche y blanco). Las condiciones intestinales han sido de pH 6, concentración biliar de 1 o 10 mM y cantidad de enzima pancreática de 2000 UL / g de grasa. El contenido de polifenoles se ha medido en el chocolate antes de la digestión (línea discontinua) y en las fases líquida y sólida en el chocolate digerido. ....117
- Figura 4.10.** Contenido de polifenoles (mg eq. de ácido gálico / g de chocolate) después de la digestión *in vitro* de diferentes tipos de chocolates (negro, leche y blanco) digeridos en condiciones intestinales fijas de pH 6 y concentración biliar 1 mM pero variables de concentración de pancreatina (0- 3000 UL / g de grasa). (A) Valores de la fase líquida (B) de la fase sólida. ....121
- Figura 4.11.** A) Lipólisis (mg de ácidos grasos libres (AGL)/ g de grasa) después de la digestión *in vitro* con una concentración de pancreatina fija (2000 UL / g de grasa) y diferentes combinaciones de pH intestinal y

concentraciones de bilis (pH 6 o 7 concentración de sales biliares 1 o 10 mM); B) Lipólisis (mg de AGL / g de grasa) después de la digestión *in vitro* en condiciones intestinales fijas (pH 6 y concentración biliar 1 mM) y diferentes concentraciones de pancreatina (0-3000 UL / g de grasa). ...124

**Figura 4.12.** Esquema del desarrollo del plan experimental para la evaluación de la digestión lipídica de productos de panadería. ....134

**Figura 4.13.** Lipólisis (%) después de la digestión *in vitro* con una concentración de pancreatina fija (2000 UL / g de grasa) y diferentes combinaciones de pH intestinal y concentraciones de bilis (pH 6 o 7, concentración de sales biliares 1 o 10 mM). ....140

**Figura 4.14.** Lipólisis (%) en productos de panadería sometidos a digestión *in vitro* en condiciones intestinales de FQ (pH6 y concentración biliar 1 mM) a distintas dosis enzimáticas (0, 1000, 2000, 3000, 4000 UL/ g grasa). ..142

**Figura 4.15.** Correlación entre los valores experimentales de DOT expresados en UL / g de producto versus los valores pronosticados de DOT por el modelo para productos de panadería. ....148



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Conformación de triglicéridos dominantes en aceites y grasas naturales en alimentos. ....	5
<b>Tabla 3.1.</b> Ingredientes según información del etiquetado de los diferentes chocolates estudiados.....	46
<b>Tabla 3.2.</b> Información nutricional (por 100 g de producto) de los chocolates sometidos a digestión <i>in vitro</i> .....	47
<b>Tabla 3.3.</b> Ingredientes, de acuerdo al etiquetado, de los distintos productos de panadería comerciales empleados en el estudio de digestión <i>in vitro</i> .....	48
<b>Tabla 3.4.</b> Información nutricional de los productos de panadería sometidos a digestión <i>in vitro</i> . ....	51
<b>Tabla 3.5.</b> Composición de los fluidos simulados para la digestión <i>in vitro</i> .....	53
<b>Tabla 3.6.</b> Resumen de las determinaciones analíticas realizadas en las matrices alimentarias objeto de estudio. ....	61
<b>Tabla 4.1.</b> Caracterización de semillas y germinados de chía en términos de contenido en humedad, proteínas, lípidos, capacidad antioxidante, polifenoles totales y variación neta de masa y macronutrientes durante la germinación. ....	73
<b>Tabla 4.2.</b> Distribución de tamaños de partícula (%) de semillas de chía obtenidos en la etapa de desestructuración previa a la digestión <i>in vitro</i> . ....	74
<b>Tabla 4.3.</b> Valores de polifenoles totales (mg ácido gálico (AG) eq./g materia seca) y capacidad antioxidante (mg TROLOX eq./g materia seca) analizados en semillas y germinados de chía tras la digestión gastrointestinal. Condiciones intestinales de fibrosis quística (pH 6 y concentración biliar 1 Mm) y estándares de adulto sano (pH 7 y concentración biliar 10 mM) con dosis de suplemento enzimático 2000 UL/ g grasa. Valores de bioaccesibilidad (%) de compuesto fenólicos entre paréntesis.....	78
<b>Tabla 4.4.</b> F-ratio y significancia estadística obtenido del análisis ANOVA factorial para el índice de degradación de la matriz. Los factores para el análisis fueron: pH, concentración biliar, tamaño de partícula, y su interacción. ....	89
<b>Tabla 4.5.</b> Índice de degradación de la matriz (IDM (%)) tras la digestión <i>in vitro</i> a diferentes condiciones intestinales pH (6 o 7), concentración biliar (1 o	

## ÍNDICE DE TABLAS

10 mM) y dosis de pancreatina (0-4000 UL/g grasa) de nueces y cacahuets con dos tamaños de partículas (grande o pequeño).....	91
<b>Tabla 4.6.</b> F-ratio obtenido del análisis de ANOVA factorial de los parámetros de digestibilidad proteica (ODmax, y pendiente inicial). Los factores del análisis fueron pH, concentración biliar, tamaño de partícula, y sus interacciones.....	93
<b>Tabla 4.7.</b> F-ratio y significancia estadística obtenidos del ANOVA factorial aplicado a la lipólisis (mg Ácidos Grasos Libres (AGL)/g grasa) alcanzada en nueces y cacahuets digeridos. Los factores para el análisis fueron pH, concentración biliar, tamaño de partícula, y su interacción. ....	100
<b>Tabla 4.8.</b> Lipólisis (mg ácidos grasos libres (AGL)/g grasa) alcanzada en nueces y cacahuets digeridos con dos tamaños de partícula (grande (> 1.2 mm) o pequeño (< 1.2 mm)) y bajo diferentes condiciones intestinales de pH (6 o 7), concentración biliar (1 o 10 m M) y dosis de pancreatina (0-4000 UL/g grasa).....	102
<b>Tabla 4.9.</b> Índice de degradación de la matriz (IDM (%)) de chocolate negro, con leche y blanco digerido <i>in vitro</i> bajo diferentes condiciones intestinales de pH (6 o 7), concentración biliar (1 o 10 mM) y distintas dosis de pancreatina (0-3000 UL/g grasa). ....	114
<b>Tabla 4.10.</b> Índice de degradación de la matriz (IDM (%)) tras la digestión <i>in vitro</i> de productos de panadería digeridos a diferentes condiciones intestinales pH (6 o 7), concentración biliar (1 o 10 mM) y pancreatina 2000 UL/g grasa. ....	137
<b>Tabla 4.11.</b> Parámetros <i>d</i> y <i>g</i> del modelo propuesto .....	143
<b>Tabla 4.12.</b> Parámetros del modelo de predicción de lipólisis en productos de panadería y Dosis Óptima Teórica estimada por aplicación de criterios clínicos.....	145
<b>Tabla 4.13.</b> Variables consideradas en el modelo de correlación de la DOT con la composición y estructura.....	146
<b>Tabla 4.14.</b> Coeficientes del modelo de regresión mixta lineal y p-valor .....	147
<b>Tabla 4.15.</b> Aplicación del modelo para la obtención de DOT en una selección de productos de panadería.....	149

# 1. INTRODUCCIÓN

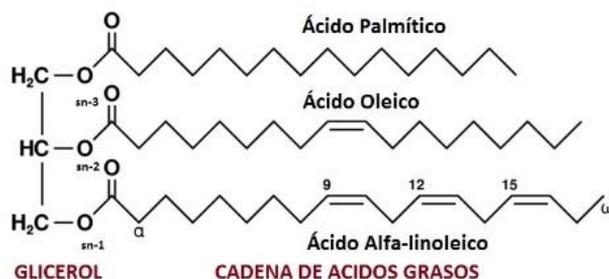


# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Lípidos y salud

### 1.1.1. Clasificación y estructura general de los lípidos dietarios

Los lípidos son un grupo amplio y heterogéneo de moléculas, siendo los mayoritarios los triglicéridos (TAG del inglés Triacylglyceride) (92-96 %), seguidos de fosfolípidos, esteroides (Ej: colesterol), ceras y vitaminas liposolubles. Los TAG son ésteres de un solo glicerol unido a tres ácidos grasos (**Figura 1.1**). Tanto la naturaleza de los ácidos grasos constituyentes (longitud de la cadena y grado de insaturación) como su distribución posicional, determinan sus propiedades físico-químicas y digestibilidad (Guo, Ye, Bellissimo, Singh, & Rousseau, 2017). Debido a la estructura asimétrica del glicerol, los ácidos grasos esterificados se distinguen por su posición, la posición sn-1, sn-2 y sn-3. Teniendo en cuenta su destino metabólico en el tracto digestivo, los ácidos grasos sn-1 y sn-3 se consideran esterificados en las posiciones "externas", mientras que la posición sn-2 se denomina "interna".



**Figura 1. 1.** Estructura de un triglicérido que incluye al glicerol y las tres cadenas de ácidos grasos.

En función del número de dobles enlaces que contengan los ácidos grasos, se clasifican como: saturados (sin dobles enlaces, SFA del inglés Saturated fatty acid), monoinsaturados (un doble enlace, MUFA del inglés monounsaturated fatty acids) o

## 1. INTRODUCCIÓN

poliinsaturados (dos o más dobles enlaces, PUFA del inglés Polyunsaturated fatty acids). Algunos de estos ácidos grasos han de ser incorporados a través de la dieta, ya que estos no pueden ser sintetizados por el organismo (EFA del inglés Essential Fatty Acids). Los EFAs lo conforman dos familias principales: los ácidos omega-3, como el ácido  $\alpha$ -linoleico (ALA), y sus derivados como el ácido eicosapentaenoico (EPA) o el ácido docosahexaenoico (DHA), y los ácidos omega-6 como el linoleico (LA), precursor del ácido araquidónico (AA).

Como se muestra en la **Tabla 1.1**, las grasas o aceites naturales comparten básicamente los mismos ácidos grasos distribuidos de forma variable en el esqueleto del glicerol (Karupaiah & Sundram, 2007; Michalski et al., 2013). La distribución de ácidos grasos en los TAG no es aleatoria (Hilditch & Williams, 1949; Norris & Mattil, 1947). Así, el ácido palmítico se ubica preferentemente en la posición sn-2 en la grasa láctea y manteca de cerdo, mientras que se concentra en las posiciones sn-1,3 en sebo de res, aceite de soja y manteca de cacao. Los ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico) se encuentran principalmente en la posición sn-2 en el aceite de soja y la manteca de cacao, mientras que en la manteca de cerdo, el ácido oleico se encuentra principalmente en las posiciones externas (Hunter, 2001).

**Tabla 1.1.** Conformación de triglicéridos dominantes en aceites y grasas naturales en alimentos.

TRIGLICÉRIDOS			
<b>Aceite Vegetal</b>			
Aceite de palma	POP	POO	POL
Aceite de nueces	LLL	OLL	PLL
Aceite de cacahuete	OOL	POL	OLL
Manteca de cacao	POS	SOS	POP
<b>Grasa Animal</b>			
Grasa de Huevo	POO	PLO	POS
Mantequilla	PPB	PPC	POP
Manteca de cerdo	SPO	OPL	OPO

Abreviaciones: P: Palmítico; O: Oleico; S: Esteárico; L: Linoleico  
B: Butírico C: Cáprico (Karupaiah & Sundram, 2007).

Los lípidos dietéticos proceden tanto de fuentes animales como vegetales. Los lípidos de origen animal son generalmente sólidos a temperatura ambiente y contienen predominantemente SFA y MUFA, como ocurre en las carnes, productos lácteos, yema de huevo; mientras que las fuentes de lípidos de origen vegetal contienen una variedad más amplia de ácidos grasos y tienden a ser líquidos a temperatura ambiente, como por ejemplo: aceites de semillas, frutos secos y sus aceites. La excepción a esta generalización son las grasas de pescados que son ricos en PUFA, especialmente el aceite de pescado de salmón o de atún, así como el aceite de coco y palma que presentan un elevado contenido en ácidos grasos saturados, y por tanto son sólidos a temperatura ambiente (Chow, 2000).

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1.2. La importancia de los lípidos en la salud

Los lípidos presentan valores nutricionales indiscutibles. En primer lugar, los lípidos almacenados en el tejido adiposo representan una fuente de energía durante los períodos de restricción de alimentos. El rendimiento de la oxidación completa de los ácidos grasos es de aprox. 9 kcal / g (o 38 kJ / g), y superior al de las proteínas y los carbohidratos, ambos con rendimientos de energía de aprox. 4 kcal / g (17 kJ / g). En segundo lugar, el consumo regular de pescado, semillas y frutos secos proporciona ácidos grasos esenciales. De este modo, EPA, DHA y AA se pueden suministrar directamente de esta fuente de alimentos o sintetizarse a partir de sus precursores, ALA y LA. Sin embargo, la conversión de ALA a DHA y EPA es limitada, siendo aproximadamente del 4 al 9% y del 0,3 al 21% respectivamente, según el género del individuo (Arterburn, Hall, & Oken, 2006; Burdge & Wootton, 2002; Harnack, Andersen, & Somoza, 2009). Por lo tanto, se recomienda que los ácidos grasos esenciales sean incluidos en la dieta para cumplir con los requisitos del organismo. Los ácidos grasos omega-3 (es decir, EPA, DHA y ALA) están involucrados en la síntesis de eicosanoides que son metabolitos importantes en los procesos inflamatorios (Calder, 2010; Simopoulos, 2013) y funciones neuronales (Bourre, 2006; Wainwright, 2002).

Es de gran importancia considerar que los ácidos grasos son componentes estructurales de las membranas celulares y orgánulos celulares, principalmente como fosfolípidos. El cerebro, tiene las áreas de superficie de membrana más grandes en comparación con otros órganos; 40 a 60% del peso seco del cerebro consiste en lípidos, 35% de los cuales son PUFA (Yehuda, Rabinovitz, & Mostofsky, 1999). La calidad de los ácidos grasos consumidos, y específicamente su grado de insaturación (es decir, PUFA), presenta un impacto en la estructura y función del cerebro (Haag, 2003). Los ácidos grasos insaturados proporcionan a la membrana más flexibilidad que los saturados, debido a las curvas en la cadena de ácidos grasos creadas por los

dobles enlaces. La fluidez óptima es esencial para permitir que los neurotransmisores se unan a los receptores de membrana y se genere la propagación de la información eléctrica dentro de la célula.

Los lípidos de la dieta también son necesarios para el transporte y la absorción de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y son precursores de hormonas esteroideas (estrógenos, testosterona, hormonas suprarrenales) (Gurr, Harwood, & Frayn, 2002).

Según la opinión científica de la Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos (European Food Safety Authority-EFSA), el consumo de grasas debe encontrarse entre el 20 y el 35 % del total de la energía diaria adquirida (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, 2010). Por ello, y a pesar de los beneficios propios de la ingesta de grasas saludables, un consumo excesivo de grasas puede conllevar consecuencias como la hiperlipidemia, niveles elevados de lípidos y colesterol en la sangre ( Grundy & Denke, 1990), representando un alto factor de riesgo para la aterosclerosis y, por tanto, de enfermedades cardiovasculares (Temple, 1994). Valores elevados de ácidos grasos plasmáticos se han asociado, de igual manera, con resistencia a la insulina (Boden, 1997; Shulman, 2000) y la obesidad (Bray, Paeratakul, & Popkin, 2004). La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2003 fijó los objetivos saludables de ingesta de ácidos grasos entre: PUFA n-6 en 5 a 8% para PUFA n-3 de 6 a 10%, y <10% para SFA. En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), su objetivo de consumo se estableció como: "grasa total menos (ácidos grasos saturados + ácidos grasos poliinsaturados + ácidos grasos *trans*)" y para los ácidos grasos *trans* inferior al 1%. En cuanto al colesterol, se recomienda no exceder una ingesta de 300 mg por día por parte de la población adulta (WHO/FAO, 2003).

Cabe destacar que en determinadas patologías, como es el caso de la Fibrosis Quística, los lípidos son el nutriente más importante en la dieta del paciente, debido a que la insuficiencia pancreática exocrina, compromete su digestibilidad (Turck et al., 2016). Finalmente, desde un punto de vista organoléptico, los lípidos proporcionan

## 1. INTRODUCCIÓN

palatabilidad al alimento al contribuir a su textura (sensación en la boca) y también tienen la capacidad de transportar compuestos aromáticos (Lucca & Tepper, 1994).

### 1.2. Proceso digestivo y digestión de lípidos alimentarios

#### 1.2.1. Proceso digestivo

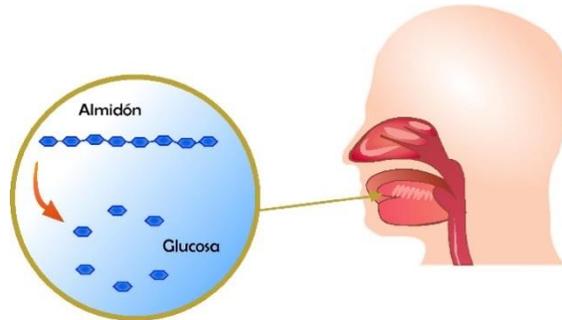
La digestión es un proceso complejo esencial para la salud en el que ocurre la transformación de los alimentos previamente ingeridos en sustancias más sencillas para ser absorbidas por los organismos y poder ser empleados en el crecimiento, mantenimiento de las células y como aporte energético. La conversión de los alimentos en sustancias absorbibles se realiza por desdoblamiento mecánico, químico y enzimático. Ocurren por tanto, dos procesos principales y simultáneos: (i) transformaciones mecánicas que reducen el tamaño de partícula de los alimentos; y (ii) transformaciones químicas y enzimáticas donde las macromoléculas se hidrolizan en compuestos más pequeños que luego se absorben en el torrente sanguíneo. Los glúcidos complejos, las grasas y proteínas se convierten durante la digestión en monosacáridos, glicerol y ácidos grasos, y aminoácidos respectivamente.

El proceso de digestión se desarrolla en tres etapas: oral, gástrica e intestinal.

#### **Etapas Oral:**

La digestión de los alimentos empieza en la cavidad oral, donde la masticación y las secreciones salivares se convierten en factores clave. La saliva es un fluido biológico compuesto por agua, mucinas, proteínas tales como amilasa, lisozima y peroxidasa. También contiene electrolitos, incluyendo  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , y urea (Humphrey & Williamson, 2001; Levine, 1993). Durante la masticación, la matriz alimentaria se descompone en fragmentos de menor tamaño y se inicia la digestión de los carbohidratos y grasas a través de la acción de la  $\alpha$ -amilasa y lipasa lingual. La  $\alpha$ -amilasa salival inicia la hidrólisis enzimática de los polisacáridos en disacáridos, como la maltosa. El pH para la óptima actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa se encuentra

alrededor de 7. El producto resultante de esta etapa oral se denomina bolo, el cual se traga y llega al estómago por medio del esófago (**Figura 1.2**) (Pedersen, Bardow, Jensen, & Nauntofte, 2002)



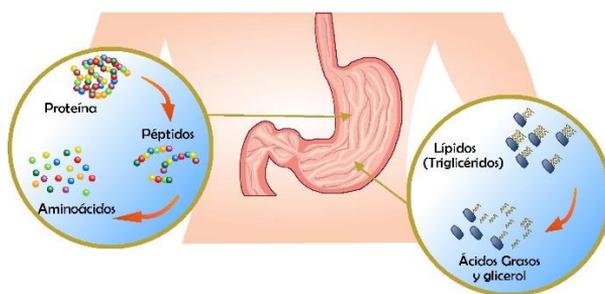
**Figura 1.2.** Proceso enzimático en la etapa oral. Acción de la  $\alpha$ -amilasa rompiendo las cadenas de polisacáridos.

### **Etapa Gástrica:**

El bolo alimenticio recorre el esófago impulsado por movimientos peristálticos de contracción de los músculos de sus paredes, que contribuyen a una mayor descomposición del bolo y permiten la entrada en el estómago. El estómago es el principal órgano de la digestión y se divide en 5 regiones (cardias, esófago, fundus, cuerpo, antro y píloro). En el estómago se secretan varias sustancias que reciben en conjunto el nombre de jugo gástrico, cuyos componentes principales son el ácido clorhídrico y pepsina. El revestimiento del estómago está cubierto por células epiteliales columnares estrechamente unidas, así como por moco que protege la mucosa de la secreción de ácido y la digestión con pepsina y lipasa gástrica (Smith & Morton, 2001). El pH gástrico varía entre 1 y 3 durante un estado de ayuno y entre 5.5 y 7 después de la ingesta de alimentos, aunque esos valores fluctúan enormemente entre los individuos y dependen de los alimentos consumidos en términos de cantidad y tipo (N'Goma, Amara, Dridi, Jannin, & Carrière, 2012). La presencia de alimentos en el estómago estimula la secreción ácido-gástrica producida por las bombas de protones lo que provoca una disminución de pH hasta valores cercanos a

## 1. INTRODUCCIÓN

3, el cual se mantiene a lo largo de la digestión gástrica (Dressman et al., 1990). En el estómago los alimentos se transforman en una papilla pastosa llamada quimo. La principal enzima digestiva del jugo gástrico es la pepsina, la cual es principalmente responsable de la proteólisis, cuya actividad hidroliza las proteínas y las convierte en bloques peptídicos de cadena corta y en aminoácidos libres (Kalantzi et al., 2006). También en el estómago prosigue la digestión de los lípidos por acción de la lipasa gástrica, si bien está se inactiva rápidamente con la caída de pH de manera que únicamente entre el 10 y 30% de la digestión de los lípidos tiene lugar en la etapa gástrica (Carrière et al., 2000). Cuando la descomposición de la matriz alimentaria alcanza un tamaño lo suficientemente pequeño, el quimo pasa por el píloro, un músculo de constricción situado en el extremo inferior del estómago que se abre directamente hacia el duodeno. El tiempo de residencia del bolo en el estómago varía en función de la composición del alimento y del individuo, aunque se sitúa en dos horas en promedio (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3.** Acción enzimática durante la etapa gástrica. Acción de la pepsina sobre las proteínas dando como resultado péptidos. Acción de Lipasa gástrica que inician la digestibilidad de los triglicéridos.

### **Etapa intestinal:**

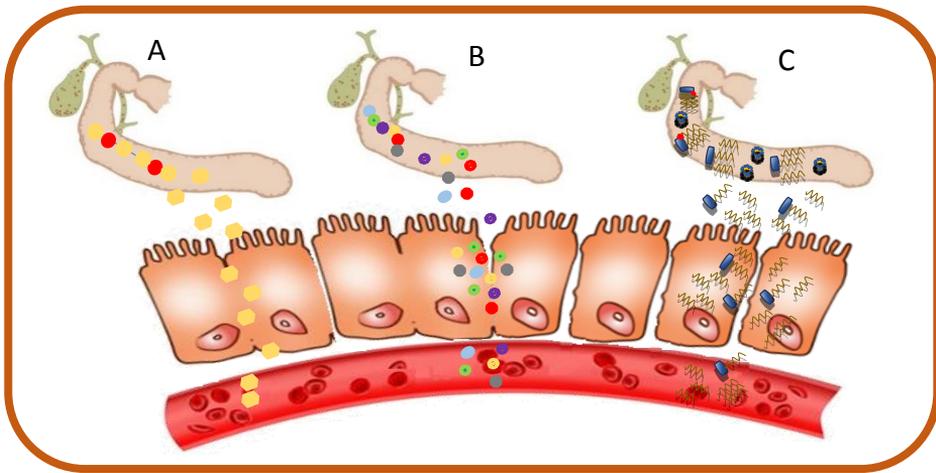
El quimo ácido del estómago se vacía progresivamente al intestino delgado, que es la porción más larga del tracto digestivo. Mide aproximadamente unos 7 metros desde el píloro hasta la unión ileocecal y es el órgano más importante de la digestión de

alimentos y absorción de los productos de digestión. En el intestino delgado se distinguen tres partes: una sección corta (el duodeno) que recibe las secreciones digestivas del páncreas y del hígado, y dos secciones más largas, el yeyuno y el íleon (Barrett, 2018). La morfología del intestino delgado está adaptada a sus dos funciones principales en la digestión: la descomposición de las macromoléculas y la absorción de agua y nutrientes (Guerra et al., 2012).

Una vez en el duodeno, el quimo ácido se neutraliza con bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Kalantzi et al., 2006) hasta alcanzar un pH alrededor de 7, es decir el óptimo para las enzimas pancreáticas (Carrière et al., 2000). Las enzimas pancreáticas (una mezcla compleja de proteasas, amilasas y lipasas) y otras enzimas digestivas producidas por la pared interna del intestino delgado actúan conjuntamente en la digestión de los macronutrientes de los alimentos, que incluye la descomposición final de los carbohidratos por parte de las amilasas, y de las proteínas y péptidos por parte de las proteasas, a monosacáridos y aminoácidos, respectivamente (**Figura 1.4**).

El fenómeno de la digestión y de la absorción en el intestino depende en gran medida del contacto del alimento con las paredes intestinales, por lo que cuanto mayor sea éste y en una superficie más amplia, mejor será la digestión y absorción de los alimentos. Esto nos da una de las características morfológicas más importantes del intestino delgado que es la presencia de numerosos pliegues y microvellosidades que amplifican la superficie de absorción de los enterocitos. Los enterocitos son células epiteliales del intestino encargadas de realizar la absorción de diversos nutrientes, el transporte de agua y electrolitos al interior del organismo y la secreción de proteína a la luz intestinal.

## 1. INTRODUCCIÓN



**Figura 1.4.** Acción enzimática durante etapa intestinal por acción de pancreatina, posterior absorción de macronutrientes en vellosidades de enterocitos y paso al torrente sanguíneo. A. Acción amilasa. B. Acción proteasa C. Acción Lipasas.

El material no digerido y absorbido en el intestino delgado pasa al intestino grueso o colon. Las funciones principales del colón son: (i) la absorción de agua y electrolitos, (ii) la fermentación de polisacáridos y proteínas por microbiota colónica, (iii) la reabsorción de sales biliares y (iv) la formación, almacenamiento y eliminación de heces (Guerra et al., 2012). Está habitado en perfecta simbiosis por más de 400 especies de bacterias diferentes que constituyen la llamada Microbiota Intestinal, algunas de las cuales producen nutrientes que pueden absorberse, entre los que se incluyen, vitamina k, biotina y ácidos grasos de cadena corta, como acético, propiónico, butírico, etc. Las bacterias del colon son capaces de degradar polisacáridos específicos de la pared celular de los vegetales y aumentar así las capacidades digestivas humanas. El ser humano por si solo obtiene pocos nutrientes de los carbohidratos complejos como celulosa, hemicelulosa y pectina y son las bacterias del colon las que despliegan un arsenal de enzimas, que rompen esas cadenas largas en carbohidratos simples que posteriormente son fermentados generando ácidos grasos de cadena corta que son absorbidos por los enterocitos.

## 1.2.2. Digestión de lípidos alimentarios

Como se ha dicho anteriormente, la digestión de las grasas comienza en la boca con la secreción de la lipasa lingual, un componente de la saliva que aumenta su actividad cuando el bolo entra en el estómago y el pH se hace más ácido. La acción de esta lipasa no es tan importante como la que realizan la lipasa secretada por la mucosa gástrica, y las lipasas secretadas por el páncreas y por la mucosa intestinal.

### 1.2.2.1. *Lípidos en la etapa oral*

Al parecer la lipasa lingual tiene un papel importante en bebés y en roedores, sin embargo, su función, e incluso su presencia real, es menos clara en personas de edad adulta (Bernbäck, Bläckberg, & Hernell, 1990; Denigris, Hamosh, Kasbekar, Lee, & Hamosh, 1988; Hamosh, Scow, Hamosh, & Scow, 1973; Kulkarni & Mattes, 2014; Stewart et al., 2010). Por otro lado, se ha observado que algunas emulsiones pueden flocularse, unirse y experimentar una inversión de fase (por ejemplo, la emulsión de aceite en agua se convierte en una emulsión de agua en aceite) debido a la salivación, a la fuerza de mezcla producida por la masticación y a la temperatura de la boca (Malone, Appelqvist, & Norton, 2003; Vingerhoeds, Blijdenstein, Zoet, & Aken, 2005). Estos procesos de floculación de emulsiones de aceite que pueden ocurrir en la boca, tienen a su vez un efecto sobre la digestibilidad posterior en el tracto digestivo (McClements, Decker, & Park, 2009; Silletti, Vingerhoeds, Norde, & Aken, 2007).

### 1.2.2.2. *Lípidos en el estómago*

Los lípidos alimentarios que llegan al estómago pueden formar parte de distintos tipos de matrices sólidas (ej: carnes, pescados, frutos secos, productos de panadería, etc...), en forma de emulsión (ej. Mayonesa, leche, etc.), o bien en forma libre, es decir, sin formar parte de ninguna matriz alimentaria (ej: aceite, mantequilla, etc). En el primer caso, la función de mezclado del estómago junto con los procesos de

## 1. INTRODUCCIÓN

hidrólisis ácida y enzimática provoca la liberación progresiva de los lípidos de la matriz. La mayor o menor presencia de fosfolípidos en el medio procedentes de la ingesta, así como la presencia de los aminoácidos producto de la hidrólisis de las proteínas contribuyen en mayor o menor medida a la emulsificación de las grasas en el estómago aunque en ocasiones también se observan fenómenos de coalescencia Armand et al. (1994). En esta etapa, la lipasa gástrica contribuye entre el 10 y el 30% de la hidrólisis lipídica, si bien puede contribuir hasta un 7.5% adicional debido a que puede mantener su actividad en el duodeno al inicio de la etapa intestinal cuando todavía el pH es relativamente ácido (Martine Armand, 2007; Moreau et al., 1989).

### *1.2.2.3. Lípidos en el intestino delgado*

La digestión de los lípidos en el intestino implica distintos eventos tanto a nivel de la mucosa como a nivel luminal. A nivel luminal, se producen procesos de: 1) emulsificación, 2) lipólisis, 3) solubilización micelar y 4) difusión, mientras que a nivel de la mucosa se produce: 1) captación, 2) resíntesis lipídica, 3) formación de quilomicrones y 4) secreción a linfa.

La emulsificación de los lípidos en el intestino es crucial para la eficiencia de las lipasas ya que incrementa la superficie de reacción para las lipasas, que son enzimas cuya acción se produce en la interfase de los glóbulos grasos. De ahí la importancia de las sales biliares que actúan como detergentes, disminuyendo la tensión superficial y formando micelas (Carey & Hernell, 1992). La bilis es una mezcla compleja de componentes orgánicos e inorgánicos, compuesta de agua, sales biliares (~ 25-35% del contenido sólido), fosfolípidos (principalmente lecitina), colesterol (aproximadamente 4% del contenido sólido), pigmentos como la bilirrubina (~ 2% del contenido de sólidos) y sales inorgánicas (Johnson, 1991). Las sales biliares sintetizadas en el hígado a partir del colesterol, llegan al duodeno después de haber sido almacenadas en la vesícula biliar. Las sales biliares son surfactantes naturales, moléculas anfifílicas, compuestas por una cara lipófila e hidrófila. Las sales biliares

más abundantes son el colato, el desoxicolato y el quenodeoxicolato conjugados con glicina (75%) o taurina (25%) (Maldonado-Valderrama et al., 2011). Se sitúan en la interfase proyectando su cara hidrofílica en el agua y la hidrofóbica en los TAG (Carey & Hernell, 1992). La acumulación de sales biliares en la interfase de los glóbulos de grasa confiere una carga negativa a las gotas de aceite, provocando la adsorción de la colipasa, reduciendo la tensión superficial de las gotitas haciendo posible el anclaje a la lipasa pancreática (Lowe, 2002). Adicionalmente, las sales biliares tienen un papel de "limpieza", ya que eliminan de la interfase otras moléculas anfifílicas, como las proteínas y los productos lipolíticos. Las sales biliares también participan en la solubilización de los productos de la lipólisis que junto con la acción de los fosfolípidos, forman micelas reconocibles para su absorción en la pared intestinal (Maldonado-Valderrama et al., 2011).

Se considera que la mayor parte de la hidrólisis de los TAG se produce en la etapa intestinal que conduce a la formación de diacilglicéridos (DAG), monoglicéridos (MAG) y AGLs. En general se asumen que durante la hidrólisis, los TAG dan lugar a una molécula de MAG y dos AGL. La lipasa pancreática es responsable de la mayor parte de este fraccionamiento, al actuar sobre la superficie de las micelas que engloban los TGA. La enzima pancreática colipasa, favorece la formación del complejo sales biliares-lipasa-colipasa que posibilita la lipólisis. Adicionalmente, la colesterol esterasa y la fosfolipasa, son enzimas pancreáticas que hidrolizan los ésteres de colesterol y los enlaces éster de los fosfolípidos presentes en los alimentos.

A medida que se van generando productos de la actividad enzimática a nivel luminal, estos van siendo absorbidos por los enterocitos de la mucosa intestinal y una vez en el interior de la célula se convierten de nuevo en TGA (Carey & Hernell, 1992). Los ácidos grasos de cadena corta y media (longitud de cadena <12 átomos de carbono) son bastante solubles en agua y pasan los enterocitos por difusión pasiva. Los ácidos grasos de cadena larga (> 12 átomos de carbono), en particular los que están parcialmente ionizados, deben ser solubilizados por las sales biliares y transportados

## 1. INTRODUCCIÓN

como micelas mixtas (Hernell, Staggers, & Carey, 1990). Las micelas mixtas se pueden absorber a través de las microvellosidades intestinales en los enterocitos de la mucosa. Dentro del enterocito, los TGA se unen a fosfolípidos, a unas proteínas específicas (apoproteínas) y a una pequeña cantidad de colesterol, para formar grandes agregados lipoproteicos denominados quilomicrones que pasan a la linfa (Carey, Small & Bliss, 1983; Iqbal & Hussain, 2009). Los AGLs se pueden transportar a través de la vena porta o el vaso linfático dependiendo de su longitud de cadena y grado de insaturación (Mu & Høy, 2004). Por lo tanto, los AGL de cadena corta y media, que son más solubles en agua que los AGL de cadena larga, se absorben directamente en la sangre portal.

### 1.2.2.4. Lípidos en el colon

El material que no se absorbe en el intestino delgado llega al colon, el sitio principal de la captación de agua y electrolitos. Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC; ácidos acético, propiónico y butírico) se producen en el colon a partir de la fermentación de los carbohidratos de la dieta no digeridos ni absorbidos (Cummings, 1981). Las sales biliares y el colesterol que llegan al colon pueden reabsorberse o degradarse y excretarse en las heces.

Dado que la digestión de los lípidos es un proceso altamente eficiente, se supone que la mayoría de los lípidos de la dieta se hidrolizan y absorben en el intestino delgado (Carey, Small and Bliss, 1983). El exceso de lípidos no digeridos en las heces, denominada esteatorrea, se observa generalmente en individuos que sufren enfermedades pancreáticas o gastrointestinales (Davenport, 1982), o en pacientes a los que se les han administrado inhibidores de la lipasa, como los prescritos para el control del peso (Hvizdos & Markham, 1999). Sin embargo, dependiendo de la estructura de los alimentos vegetales ingeridos, una proporción significativa de lípidos y nutrientes lipofílicos, como carotenoides, puede pasar del íleon al colon, incluso en

sujetos sanos (Ellis et al., 2004; Hoad et al., 2011; Mandalari, Faulks, Rich, Lo Turco, Picout, Lo Curto & Ellis, 2008; Tydeman et al., 2010).

### **1.3. Factores que influyen en la digestibilidad de los lípidos**

Actualmente, el estudio de la digestión de alimentos resulta clave para poder generar información relevante para llevar a cabo una alimentación saludable. La variabilidad de la digestión de los lípidos está principalmente relacionada con dos tipos de factores: a) los relacionados con las propiedades del alimentos que los contiene (estructura matricial, interacciones entre ingredientes, influencia del procesado o método de cocinado, etc.) y b) los relacionados con las variables intestinales propias de cada individuo (nivel de secreción de jugos gástricos, biliares y pancreáticos, por ejemplo) los cuales dependen de la edad, estado de salud, cantidad y tipo de grasa ingerida en la dieta, etc. En esta sección, se presentan algunas de las evidencias que se conocen sobre la influencia de los mencionados factores sobre la digestión de lípidos.

La gran mayoría de estudios orientados a analizar la influencia de distintos factores en la digestibilidad de lípidos alimentarios, se han centrado en sistemas monocomponentes o emulsiones ideales, con el fin de simplificar el carácter multifactor y complejo de la mayoría de los alimentos. Existen pocos estudios en la literatura que aborden la complejidad de alimento sólidos estructurados y la influencia de diferentes variables del lumen del tracto gastrointestinal (Guo et al., 2017). Existe evidencia suficiente para afirmar que dentro de la complejidad de las estructuras de los alimentos, se derivan múltiples interacciones matriciales entre los componentes que lo conforman, lo que altera de manera inequívoca el comportamiento observado de los componentes aislados cuando se someten a digestión. Así, todavía falta conocimiento para comprender el impacto de la matriz alimentaria, los procesos y otros tantos factores en el resultados de la digestión (Guo et al., 2017; McClements, Decker, Park, et al., 2009).

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.3.1. Factores inherentes al alimento

La accesibilidad de las lipasas a los TAG puede verse limitada por las características de la matriz alimentaria, que incluye entre otros, su composición, las interacciones entre macronutrientes, estructura y comportamiento mecánico durante el tránsito intestinal (Calvo-Ilerma, Fornés-Ferrer, Heredia, & Andrés, 2018).

La matriz alimentaria, además de lípidos, suele contener proteínas y carbohidratos de diferente naturaleza (almidón, fibras entre otros). La matriz se desestructura durante la masticación, se diluye por acción de la saliva y el jugo gástrico y se hidroliza por medio de las enzimas digestivas, lo que permite la liberación de los lípidos y/o el acceso de las lipasas a sus sustratos en la posterior etapa intestinal (Mu & Høy, 2004). Esta es la razón por la cual, tanto la composición como la estructura de la matriz alimentaria, afectan el destino de la digestión de los lípidos de la dieta.

#### *Influencia de la composición y estructura de los triglicéridos sobre la lipólisis*

Tal como se indicó en apartados anteriores, la longitud de la cadena del ácido graso y el grado de insaturación, junto con su distribución posicional estereoespecífica, pueden afectar la extensión de la lipólisis alcanzada (Rogalska, Ransac, & Verger, 1990). La velocidad y el alcance de la digestión de los TAG durante la digestión *in vitro* disminuye al aumentar la longitud de la cadena de ácidos grasos en este orden: triacilglicerol de cadena corta (SCT) > triacilglicerol de cadena media (MCT) > triacilglicerol de cadena larga (LCT). Esto se atribuye al hecho de que los AGL liberados de las LCT pueden acumularse en las superficies de las gotitas de aceite, lo que restringe el acceso de la lipasa a otros TAG (Day, Rago, Domke, Velikov, & Bonn, 2010; Devraj et al., 2013). Por el contrario, los AGL de cadena media o corta presentan una mayor afinidad por el agua y se mueven rápidamente hacia la fase acuosa, lo que facilita el acceso de las lipasas a los TAG (Sek, Porter, Kaukonen, & Charman, 2002) aún no digeridos. Sin embargo, este efecto en el retraso de la digestión de lípidos de

cadena larga depende de la concentración de sales biliares, ya que concentraciones más elevadas de sales biliares producen una mayor extensión de la digestión con LCT (Devraj et al., 2013).

La posición de los ácidos grasos dentro de los TAG (especialmente los ácidos grasos de cadena larga en las posiciones sn-1 o sn-3 afecta la digestión de los lípidos. Los ácidos grasos liberados de las posiciones sn-1 y sn-3 frecuentemente tienen diferentes destinos metabólicos que los ácidos grasos retenidos en la posición sn-2 (Hunter, 2001). Los ácidos grasos de cadena corta y media ( $\leq 10$  átomos de carbono) se pueden solubilizar en la fase acuosa del contenido intestinal, donde se absorben. Los ácidos grasos de cadena más larga, como el palmítico y el esteárico, tienen bajos coeficientes de absorción porque primero tienen que formar micelas para ser absorbidos.

El grado de insaturación de los TAG (es decir, poliinsaturado vs. mono-insaturado) parece no afectar significativamente la digestión de los lípidos. Sin embargo, es importante destacar que existe escasa información científica disponible a este respecto (Guo et al., 2017).

### *Influencia de los componentes de la matriz alimentaria sobre la lipólisis*

En los alimentos con estructura lipídica en emulsión de aceite en agua, teóricamente, la película proteica presente en una interfaz aceite-agua se descompone fácilmente por proteasas y es desplazada por las sales biliares (Maldonado-Valderrama et al., 2008). Las propiedades de las proteínas generalmente tienen poco efecto sobre la digestión de los lípidos (Singh & Ye, 2013).

En comparación con la proteína animal, las proteínas vegetales pueden limitar la lipólisis durante la digestión. Por ejemplo, las gliadinas de trigo son mucho más insolubles e hidrófobas, por lo que forman una película interfacial compacta y resistente al desplazamiento por parte de las sales biliares. Esto dificulta la difusión de la lipasa hacia la superficie de los glóbulos grasos, lo que resulta en un menor grado

## 1. INTRODUCCIÓN

de digestión. Otro ejemplo son las proteínas de la soja que presentan más resistencia que la  $\beta$ -lactoglobulina al desplazamiento interfacial por parte de las sales biliares en la interfaz aceite-agua, lo que también conduce a una disminución de la digestión lipídica (Qiu, Sun, Cui, & Zhao, 2013; Qiu, Zhao, Andrew, & Julian, 2015).

En una matriz sólida proteica, como el queso, cuando las gotas de grasa se dispersan, la estructura de la matriz alimentaria circundante se convierte en el factor dominante que controla la digestión. Durante la digestión, la estructura proteica de la red 3D dentro de la matriz alimentaria puede obstruir la difusión de enzimas hacia la superficie de los glóbulos de grasos. En este tipo de sistemas, la lipólisis estará condicionada por la velocidad y el grado de la proteólisis: a medida que la estructura proteica se descompone, los lípidos se liberan de la matriz alimentaria, siendo accesibles para las lipasas (Dickinson, 2012).

Por otro lado, hay estudios que indican que las cadenas de polisacáridos protegen las emulsiones de aceite en agua contra la lipólisis formando una capa gruesa e hidratada que impide el contacto físico de las lipasas con el glóbulo graso (Nakamura, Yoshida, Maeda, & Corredig, 2006). En la industria alimentaria, los polisacáridos se utilizan para espesar, dado que presentan poca preferencia a la emulsificación, dada su falta de actividad superficial (Dickinson, 2009). En cuanto a los carbohidratos se refiere, estos han sido señalados como componentes que disminuyen la lipólisis por otros mecanismos, como el aumento de la viscosidad del medio de digestión (Lairon, Play, & Jourdheuil-rahmani, 2007).

### *Influencia de la organización de los lípidos en la matriz alimentaria*

Los lípidos deben ser accesibles a las enzimas digestivas para lograr su digestión y absorción. La composición y la estructura de la matriz alimentaria pueden afectar la accesibilidad de las lipasas a los lípidos dietarios. Los lípidos pueden presentarse en los alimentos como lípidos accesibles o lípidos confinados. Los lípidos accesibles son aquellos no emulsionados, como los aceites, el tejido adiposo o emulsiones de agua

en aceite, como la mantequilla. Los lípidos confinados se encuentran en los alimentos en forma glóbulos grasos de pequeño tamaño, rodeadas por una fase acuosa líquida o semilíquida (emulsiones de aceite en agua) o pueden presentarse en una fase sólida (lípidos encapsulados).

De acuerdo a Michalski et al., (2013) en las matrices alimentarias podemos encontrar los lípidos organizados según tres tipos de estructuras:

1) **Estructuras con fase lipídica continua** como es el caso de los aceites, emulsiones de agua en aceite como la mantequilla, y el chocolate que es una dispersión de partículas distribuidas en grasa sólida.

2) **Estructuras con fase acuosa continua**, como el caso de las emulsiones de aceite en agua como la leche, salsas, la yema de huevo, etc.

3) **Estructura de sólidos complejos** en los que las grasas quedan atrapadas por elementos estructurales formados por otros nutrientes como proteínas o carbohidratos, como es el caso de alimentos procesados como el queso, o productos de panadería (Michalski et al., 2013).

Algunos ejemplos de distintas organizaciones de los lípidos en alimentos se detallan a continuación:

En almendras, las estructuras portadoras de aceite que pueden representar más del 50% del peso del fruto seco, se encuentran formando parte de las paredes celulares. Por lo tanto, la liberación de estos lípidos es un paso previo imprescindible para la acción de las enzimas lipolíticas. Se ha observado que tan solo aproximadamente el 10% de los lípidos en las almendras crudas y tostadas se liberan de las almendras después de la masticación y las células permanecen en gran parte intactas. Por lo tanto, la digestión y la bioaccesibilidad de los lípidos en la almendra se encuentra

## 1. INTRODUCCIÓN

regulada por la estructura y las propiedades de las paredes celulares que rodean los cuerpos oleosos (Grundy et al., 2016).

En el caso de los productos lácteos procesados como el queso y el yogur, las grasas se encuentran atrapadas en una matriz sólida o semisólida. Ciertos estudios han demostrado que los péptidos y AGL se liberan más fácilmente en leches y yogures (que son matrices líquidas y semisólidas, respectivamente) en comparación con los quesos (que son matrices sólidas). Para el queso, las características estructurales y la dureza son por tanto determinantes de la digestión de lípidos (Guo et al., 2017).

En muchos casos, son los procesos industriales y domésticos los que provocan cambios estructurales en las matrices alimentarias. Así por ejemplo, el huevo en el que los lípidos de la yema de huevo están dispersados en forma de lipoproteínas el tipo de preparación afecta la digestibilidad y bioaccesibilidad de macro y micronutrientes (Asensio-Grau et al., 2018).

### 1.3.2. Factores inherentes al individuo

Los factores inherentes al individuo relacionados con el proceso de digestión son aquellos relacionados con las alteraciones gastrointestinales del individuo. Las alteraciones hormonales por ejemplo, pueden modificar algunas variables del proceso de digestión, como el tiempo de tránsito o la secreción de fluidos digestivos (Carswell et al., 2014). El estado fisiológico alterado, como la inflamación o infección, también puede modificar la digestión y la absorción de nutrientes (Ferrari et al., 2015). La edad del individuo es también determinante de este proceso. Por ejemplo, los recién nacidos no tienen un sistema digestivo completamente desarrollado, incluida la falta de secreción de enzimas digestivas, y el tiempo de tránsito es más rápido (Mooij, Koning, & Huijsman, 2012). En contraste, en los ancianos, varios factores se ven afectados, comenzando por las dificultades en la masticación y la disminución progresiva de las secreciones enzimáticas (Casellas, Aparici, Casaus, & Rodri, 2013).

Otras patologías específicas también implican complicaciones en la digestión, como es el caso del síndrome del intestino corto, en el que la sección de absorción de nutrientes del intestino se reduce drásticamente (O'keefe et al., 2006).

En el caso particular de la insuficiencia pancreática exocrina (EPI), las alteraciones que la caracterizan presentan un elevado impacto sobre la digestión intestinal de los macronutrientes, y en especial de los lípidos. En esta patología se ve reducida la secreción de enzimas pancreáticas, y puede también estar comprometida la secreción de bicarbonato al duodeno. Otras condiciones particulares en la insuficiencia pancreática pueden incluir concentraciones y composición de sales biliares alteradas. La etiología de la insuficiencia pancreática exógena puede clasificarse en pancreáticas y no pancreáticas:

### *Causas pancreáticas:*

Pancreatitis crónica, fibrosis quística, cáncer de páncreas, pancreatitis autoinmune, síndrome de Shwachman-Diamond

### *Causas no pancreáticas:*

Enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn, síndrome de Zollinger-Ellison, intervenciones quirúrgicas gastrointestinales y pancreáticas.

En este tipo de patologías y con el fin de mejorar la digestibilidad de los nutrientes es necesaria la adopción de una Terapia de sustitución enzimática pancreática (TSEP) (Borowitz et al., 2002; Sinaasappel et al., 2002), la cual se explica detalladamente más adelante.

Es importante indicar que en ciertas ocasiones las alteraciones pueden conducir a posibles afecciones gastrointestinales individuales que modifican la acción de la Terapia de Sustitución Enzimática Pancreática (TSEP). A continuación, se exponen detalladamente las alteraciones que se pueden dar en la insuficiencia pancreática y su impacto sobre la digestión.

## 1. INTRODUCCIÓN

### **pH Gástrico**

En el estómago, el pH se mantiene en un promedio de 3 durante la digestión gástrica (Armand et al., 2004). Sin embargo, puede modificarse mediante el uso de inhibidores de la bomba de protones (IBP) que bloquean la secreción de protones haciendo que el fluido gástrico sea menos ácido. Como consecuencia del efecto inhibitorio sobre la secreción de ácido causada por el uso de IBP, el ambiente en el estómago puede alcanzar un pH de 4 y 5. Este aumento puede tener un impacto en la proteólisis, ya que las proteasas tienen un pH óptimo alrededor de 3-4. Otro efecto del uso de los IBP sería que el quimo pasa al intestino delgado a un pH mayor que 3; por lo que a pesar de la disminución de la secreción de bicarbonato, el aumento del pH en esa etapa sería mayor, favoreciendo la actividad de la lipasa pancreática (Zentler-Munro, Fine, Batten, & Northfield, 1985).

### **pH Intestinal**

A pesar del hecho de que las enzimas pancreáticas se administran para mejorar la insuficiencia pancreática, la falta de bicarbonato crea un ambiente ácido, en el que las enzimas no tienen una actividad óptima. Algunos estudios han demostrado que el pH intestinal en patologías como la Fibrosis Quística (FQ) oscila entre 4.5 y 6.5, mientras que en individuos sanos alcanza valores superiores a 7 (Clarke, Stien, & Walker, 2001; Gelfond, Ma, Semler, & Borowitz, 2013; Rovner, Schall, Mondick, Zhuang, & Mascarenhas, 2013; Rowe et al., 2014). Además, el tiempo requerido para aumentar el pH del contenido gástrico que ingresa al duodeno es de alrededor 1 minuto en condiciones saludables, mientras que en la FQ se retrasa hasta 30 minutos (Gelfond et al., 2013). En conclusión, el pH más bajo en esta etapa reduce la actividad enzimática, por lo tanto la eficacia del TSEP.

### **Sales Biliares**

La concentración de sales biliares puede llegar a ser de hasta 10 veces menor en el caso de la FQ (Maldonado-Valderrama et al., 2011). Estudios realizados hace varios años, dirigen a suplementar a los pacientes con FQ con taurina para lograr una mejor

digestión de la grasa. Sin embargo, la literatura recopila conclusiones controvertidas sobre este tema. Algunos estudios señalan un resultado sin efecto (Merli et al., 1994; Thompson, Robb, & Davidson, 1987), mientras que otros confirman su papel beneficioso como adyuvantes (Belli et al., 1987; Colombo, Arlati, Curcio, Maiavacca, & Garatti, 1988). La discrepancia puede estar relacionada con diferentes diseños experimentales y metodologías de determinación a AGL.

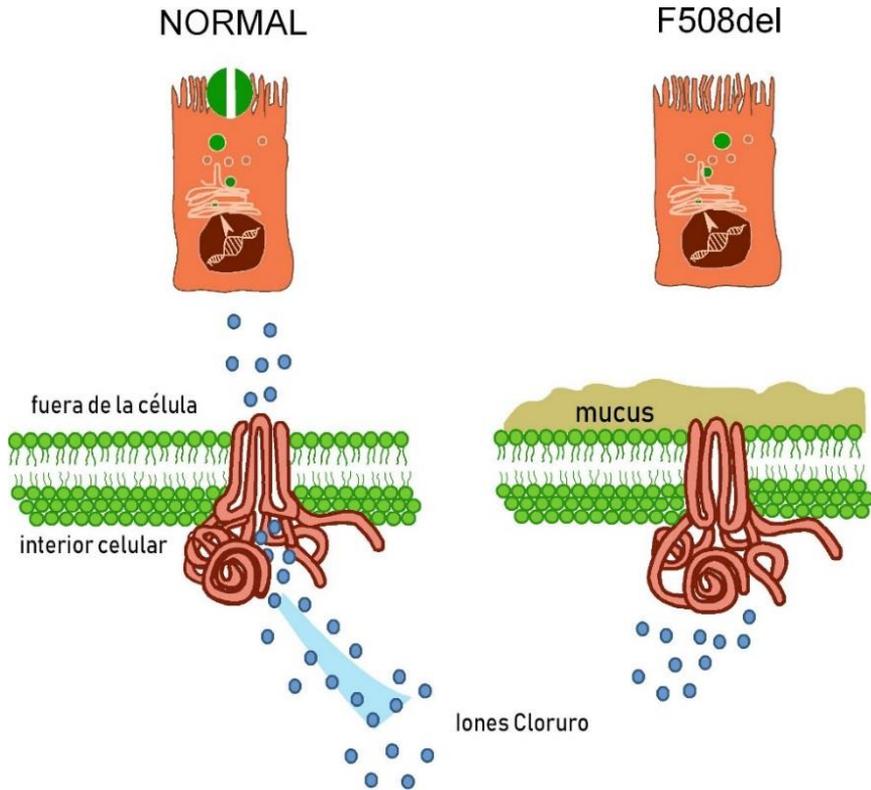
### **1.4. Fibrosis quística y terapia de sustitución enzimática.**

Las enfermedades o alteraciones gastrointestinales son todas aquellas patologías que afectan a los órganos que conforman el sistema digestivo. El intestino delgado, donde se produce la absorción de todos los nutrientes, es un órgano de aproximadamente 9 metros de longitud. Resulta evidente que en una superficie tan grande cualquier alteración afecta de forma directa a la absorción de nutrientes porque es el responsable del tránsito nutricional desde el sistema digestivo a la sangre. Es por ello que cualquier alteración de la membrana intestinal puede tener severas consecuencias sobre el estado de salud de un individuo. En general, estas alteraciones son ocasionadas por bacterias, parásitos, virus y ciertos alimentos, aunque algunos medicamentos también pueden provocarlas. Sin embargo existe un grupo de trastornos crónicos del tracto gastrointestinal resultado de la interacción de factores genéticos, epigenéticos y ambientales como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) crónica, que comprende la enfermedad de Crohn (EC), la colitis ulcerosa (CU) y la colitis inclasificable (CI)(Iborra, Beltrán, & Nos, 2011). Dentro de este grupo de enfermedades genéticas con repercusiones a nivel gastrointestinal se encuentra la Fibrosis Quística, enfermedad sobre la que se contextualiza esta tesis doctoral, y de la que se dará mayor detalle a continuación.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.4.1. Fibrosis Quística e Insuficiencia Pancreática Exocrina

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética autosómica recesiva que presenta mutaciones en el gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana (CFTR), que actúa como un canal de iones ubicado en la membrana celular apical. Actualmente, hay más de 2000 mutaciones descritas que causan FQ, siendo la F508del en la homocigosis la más prevalente y la más grave (Zolin, McKone, & Van Rens, 2014). Es la enfermedad potencialmente letal, de herencia mendeliana recesiva, más frecuente en la población caucásica. Se estima una prevalencia en esta población de 1 cada 2500 individuos, siendo la frecuencia de portadores de 1 cada 25 (Paz-Valiñas & García-Vega, 2004). Actualmente se registran más de 38000 casos de FQ en Europa (Farrell, 2008). Las manifestaciones fisiopatológicas afectan principalmente a los pulmones, aunque también se originan otras alteraciones negativas en la funcionalidad fisiológica de páncreas e hígado, así como la aparición de procesos de inflamación en el epitelio intestinal. La alteración del CFTR causa una disminución en la secreción de  $\text{Cl}^-$ , agua y  $\text{HCO}_3^-$  con la consiguiente deshidratación de las secreciones pancreática y biliar causando la dilatación y la obstrucción de los conductos pancreático y biliar, lo que conduce a la secreción excesiva de un moco espeso por los diferentes órganos (**Figura 1.5**) (Li & Somerset, 2014).



**Figura 1.5.** Actuación de la proteína CFTR como un canal de cloro entre el interior y el exterior de la célula. El defecto genético modifica el transporte del cloro, provocando una secreción de moco espeso que da como consecuencia complicaciones respirar.

Las manifestaciones clínicas incluyen, entre enfermedad pulmonar crónica, enfermedad hepática o síndromes de pérdida de sal, insuficiencia pancreática en el 85% de los pacientes (Gaskin, 2013). La alteración de las secreciones pancreática y biliar causa una digestión deficiente de los alimentos y, por consiguiente la malabsorción de nutrientes, particularmente aquellos de naturaleza lipídica y vitaminas liposolubles (Bruno, Haverkort, Tytgat, & Van Leeuwen, 1995).

La insuficiencia pancreática exocrina (IPE) está presente en aproximadamente el 85-90% de los pacientes con FQ (Ramsey, Farrell, Pencharz, & Committee, 1992; Sinaasappel et al., 2002). Sin embargo, esta afectación puede descender hasta el 14% en los individuos diagnosticados a una edad superior a 16 años (Gracia et al.,

## 1. INTRODUCCIÓN

2002). La determinación de la Elastasa 1, sin embargo, debe realizarse de manera periódica en personas con FQ (y si existe sospecha clínica de IPE), ya que el daño pancreático es progresivo y puede aparecer en individuos inicialmente suficientes (Olveira & Olveira, 2008).

La IPE consiste en un bloqueo del conducto pancreático por parte de mucosidad espesa, impidiendo la secreción del jugo pancreático, que contiene las enzimas digestivas del páncreas, al duodeno (Sullivan & Freedman, 2009). Como consecuencia, la hidrólisis enzimática de los nutrientes, y en especial de los lípidos, suele ser subóptima, así como su posterior absorción intestinal (Sikkens, Cahen, Kuipers, & Bruno, 2010). La IPE se suele manifestar con deposiciones abundantes, fétidas, con características de grasas esteatorreicas (hipocoloreadas, brillantes y aceitosas). Además suelen aparecer deficiencias de vitaminas liposolubles y otras manifestaciones como prolapso rectal (cerca del 20% de los pacientes con FQ menores de 5 años de vida no tratados, siendo un signo de enfermedad severa) (Ramsey et al., 1992; Sinaasappel et al., 2002). La no absorción de los lípidos se traduce en la pérdida de una importante fuente de energía (Woestenenk, Ent, & Houwen, 2015). Asimismo, la obstrucción del conducto pancreático evita de igual forma la secreción de bicarbonato, necesario en una digestión normal ya que es el principal agente del aumento del pH en la etapa intestinal. La acción de las enzimas pancreáticas se ve comprometida por el retraso en la neutralización del quimo ácido que llega del estómago y el menor pH general alcanzado en el intestino (Clarke et al., 2001; Rowe et al., 2014). La IPE da lugar, de no ser tratada, a una excreción abundante, prácticamente el 80%, de la grasa de la dieta en heces. Este hecho conlleva problemas de maldigestión y malnutrición en general, y un retraso en el crecimiento en niños con FQ en particular (Stephenson et al., 2013).

#### 1.4.2. Terapia de Sustitución Enzimática

Actualmente, el tratamiento de la FQ se lleva a cabo mediante terapias de sustitución enzimática (TSE) (Borowitz et al., 2002; Sinaasappel et al., 2002). La TSE consiste en la administración de suplementos enzimáticos formulados como microencapsulados gastrorresistentes que posteriormente se disuelve en el pH duodenal que es alcalino, de modo que en esa etapa del proceso de digestión, las enzimas pueden ejercer su función hidrolítica sobre los nutrientes (Fieker, Philpott, & Armand, 2011). Estas cápsulas aportan pancreatina porcina con actividad lipasa, amilasa y proteasa. Los suplementos enzimáticos están disponibles en diferentes dosis. La unidad para cuantificar la dosis se refiere a la actividad enzimática de la lipasa, es decir, las unidades de lipasa (UL). Hay cuatro presentaciones disponibles en Europa: 5000, 10000, 25000 y 40000 UL. Los pacientes con FQ y/o insuficiencia pancreática exocrina deben ingerir los suplementos de enzimas en cada comida para lograr la correcta digestión de los alimentos. El dietista o gastroenterólogo que realiza el seguimiento de los pacientes es el encargado de establecer la dosis recomendada, de acuerdo con los síntomas y la evolución. Actualmente, las asociaciones de enfermos de FQ y entidades clínicas han consensuado la dosificación en base al contenido graso en la dieta y el peso (kg) corporal llegando a establecerse una dosis máxima de hasta 4000 UL/g grasa ingerida (Fieker et al., 2011). Aunque se ha evidenciado que este es un grado muy bajo de recomendación según evidencia científica (Amin & Ratjen, 2014). Las pautas de nutrición en la FQ también recomiendan que las enzimas se complementen en el rango de 2000 a 4000 UL / g de grasa y comida, aunque reconocen un grado muy bajo de evidencia científica para la recomendación (Ramsey et al., 1992). Además, estimar la cantidad de grasa que contiene un alimento o una comida puede ser una tarea difícil para el paciente, lo que hace que la práctica regular se adhiera a la "dosis x en las comidas principales, x / 2 para medias mañanas o medias tardes".

## 1. INTRODUCCIÓN

Estas pautas de dosificación parecen insuficientes para la eficiencia del tratamiento no solo debido a que cada individuo puede presentar mutaciones particulares del gen CFTR, sino también por 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, que influyen en la digestibilidad de las grasas (Borowitz, Gelfond, Maguiness, Heubi, & Ramsey, 2013; Rovner et al., 2013). Así, en los pacientes adscritos a las TSE siguen presentes las deficiencias en la digestión de alimentos y absorción de nutrientes que no sólo conducen al empeoramiento del estado nutricional y de la función pulmonar, sino que también provocan manifestaciones marginales ocasionando dolor abdominal y esteatorrea y en general empeoramiento de morbilidad y la calidad de vida del paciente de FQ.

Complementariamente a la TSE, los nutricionistas y dietistas de los centros hospitalarios pautan a estos pacientes el seguir una dieta rica en grasas, y en especial en lípidos saludables. En este sentido, la ingesta de alimentos grasos de origen vegetal como frutos secos (almendras, cacahuets, nueces,..), semillas (chía, sésamo, lino,...), o frutos frescos (olivas, aguacate,...) entre otros, así como cualquier alimento que incluya estos o sus derivados en la formulación (chocolates, productos de panadería, salsas y aderezos, bebidas,...) es especialmente recomendable.

### **1.5. Modelos de estudio de digestión *in vitro* de alimentos.**

Se ha visto incrementado el interés del uso de modelos *in vitro* digestivos para evaluar la efectividad del diseño de alimentos funcionales, la eficacia de un nutraceutico o de sistemas de liberación controlada, como es el caso de la encapsulación (McClements, Decker, & Park, 2009). Complementariamente los modelos *in vitro* también se están utilizando para evidenciar los cambios estructurales y químicos que ocurren en los diferentes alimentos en condiciones gastrointestinales específicas que reproduzcan fielmente el entorno gastrointestinal de grupos poblacionales (Hur, Ou, Decker, & McClements, 2011). Aunque los sistemas *in vivo* proporcionan resultados más

precisos, estos requieren de largos tiempos experimentales, son más costosos y representan ciertas limitaciones éticas por el empleo de animales o seres humanos (Boisen & Eggum, 1991). En contra partida, los modelos *in vitro* presentan ventajas dentro de las que podemos destacar: i) métodos rápidos, de menor coste y de fácil manipulación, ii) posibilidad de toma de muestra en cualquier parte del tracto gastrointestinal simulado, iii) mejor reproducibilidad que los estudios *in vivo* iv) no supone limitaciones éticas. Los modelos *in vitro* tratan de imitar los procesos fisiológicos que ocurren durante la digestión humana (Minekus et al., 2014), teniendo en cuenta varios factores como la aparición y concentración de enzimas digestivas, los valores de pH en fases gástricas e intestinales, tiempo de digestión y concentraciones de sal, entre otros factores. Como lo indican, Coles, Moughan, & Darragh, (2005), la técnica de digestión *in vitro* perfecta (i) debería proporcionar resultados precisos en poco tiempo y (ii) podría ayudar como herramienta para el análisis rápido de alimentos o modelos de alimentos con diferentes composiciones y estructuras (Coles et al., 2005; Fuller, 1991; Hur et al., 2011).

Si bien el primer artículo publicado en esta área data de 1954 (DeBAUN & Connors, 1954), al que le siguieron una serie de artículos cada año, se han realizado importantes esfuerzos para simular el estómago humano y el intestino delgado en las últimas dos décadas, un período en el que han aparecido más del 85% de los trabajos publicados hasta la fecha. Lucas-gonzález, Viuda-martos, Pérez-alvarez, & Fernández-lópez (2018) indica que aunque los modelos de digestión *in vitro* se han aplicado a todo tipo de alimentos, los alimentos más comunes evaluados han sido: verduras (26%), productos lácteos (23%), productos de panadería (17%), productos cárnicos (13 %), alimentos marinos (12%) y huevos (7%).

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.5.1. Modelos de digestión *in vitro* estáticos y dinámicos

Se ha diseñado una amplia gama de modelos gastrointestinales para simular el proceso de digestión de los alimentos, que van desde sistemas estáticos hasta sistemas compartimentales y dinámicos. Los modelos de digestión *in vitro* difieren entre sí en varios parámetros. Uno de estos es el número y el tipo de etapas incluidas en la digestión. Según el propósito del estudio, los modelos de digestión simulados pueden incluir las fases oral, gástrica y / o del intestino delgado, y en algunos casos, la fermentación intestinal en el colon (Polovic et al., 2009; Sek, Porter, & Charman, 2001).

Otra variación importante entre los modelos es la composición química de las soluciones digestivas utilizadas en cada fase, el tipo y las concentraciones de enzimas, las sales y los tampones utilizados, los polímeros biológicos, los componentes tenso-activos, etc. (Almaas et al., 2006; Boisen & Eggum, 1991; Chatterton, Heegaard, & Sørensen, 2004; Hur et al., 2011; Hur, Decker, & McClements, 2009; Kitabatake & Kinekawa, 1998; Porter et al., 2004).

La mayoría de los simuladores *in vitro* utilizados son estáticos (89%). En estos se simula la digestión gástrica y del intestino delgado, se imita en tres fases sucesivas (oral, gástrica e intestino delgado). En cada fase, el producto alimenticio se incuba por un tiempo específico y a una temperatura específica con saliva artificial simulada y fluidos digestivos del intestino gástrico y del intestino delgado, mientras que el pH generalmente se mantiene en un valor fijo utilizando un tampón.

Si bien esto puede parecer un método simple, la falta de consenso con respecto a las condiciones fisiológicas aplicadas, ha conducido a diferentes modelos y, por lo tanto, los resultados no pueden ser comparados entre los diferentes equipos de investigación. Para minimizar este problema, el grupo de trabajo (COST ACTION) INFOGEST propuso en el 2014 un método de digestión estática para simular las condiciones gastrointestinales de un adulto sano, estandarizadas y prácticas (Minekus

et al., 2014). El objetivo de este consorcio fue armonizar los sistemas estáticos *in vitro* que simulan los procesos digestivos mediante la definición de parámetros y condiciones clave. La comunidad científica ha mostrado un gran interés en este estudio, como se puede ver en las numerosas citas (1039) que ha recibido desde 2014 (año de publicación). Este método armonizado de digestión *in vitro* estático para alimentos debería contribuir a la producción de datos más comparables en el futuro (Lucas-gonzález et al., 2018).

Los modelos estáticos gastrointestinales *in vitro* tienen numerosas ventajas, el propósito principal es imitar los procesos bioquímicos que ocurren en el tracto gastrointestinal y, normalmente, utilizar un conjunto único de condiciones iniciales (pH, concentración de enzimas, sales biliares, etc.) para cada parte del tracto gastrointestinal. Sin embargo, este método con frecuencia no es una reproducción precisa de las condiciones *in vivo* más complejas, donde el entorno bioquímico está cambiando continuamente y los parámetros físicos como el corte y las fuerzas de molienda pueden tener un gran impacto en la descomposición de partículas de alimentos más grandes y la liberación de nutrientes (Golding & Wooster, 2010). La geometría (alineación vertical, alineación horizontal o vaso) (Campbell, Arcand, & Mainville, 2011; Tompkins, Mainville, & Arcand, 2011) la bioquímica (las diferentes secreciones digestivas se agregan a los compartimentos del modelo a lo largo del tiempo (Marciani, Gowland, Fillery-travis, et al., 2001) y las fuerzas físicas (simuladas mediante el uso de rodillos giratorios, discos flexibles o camisas de agua) son los tres factores más importantes que se han abordado de manera diferente en el diseño de los modelos de digestión dinámica (Kong & Singh, 2010; Vardakou et al., 2011).

Algunos de los modelos de digestión dinámica más avanzados cuentan con un diseño para representar el fondo y el antro del estómago y / o el duodeno (Verhoeckx et al., 2015). Estos diseños permiten la simulación de las fuerzas físicas ejercidas durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal, lo que a su vez comprende la naturaleza heterogénea de la digestión y los entornos bioquímicos localizados de forma más fiel

## 1. INTRODUCCIÓN

al *in vivo* (Kong & Singh, 2010; Marciani, Gowland, Fillery-travis, et al., 2001; Marciani, Gowland, Spiller, et al., 2001; Tompkins et al., 2011; Vardakou et al., 2011).

## **2.OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

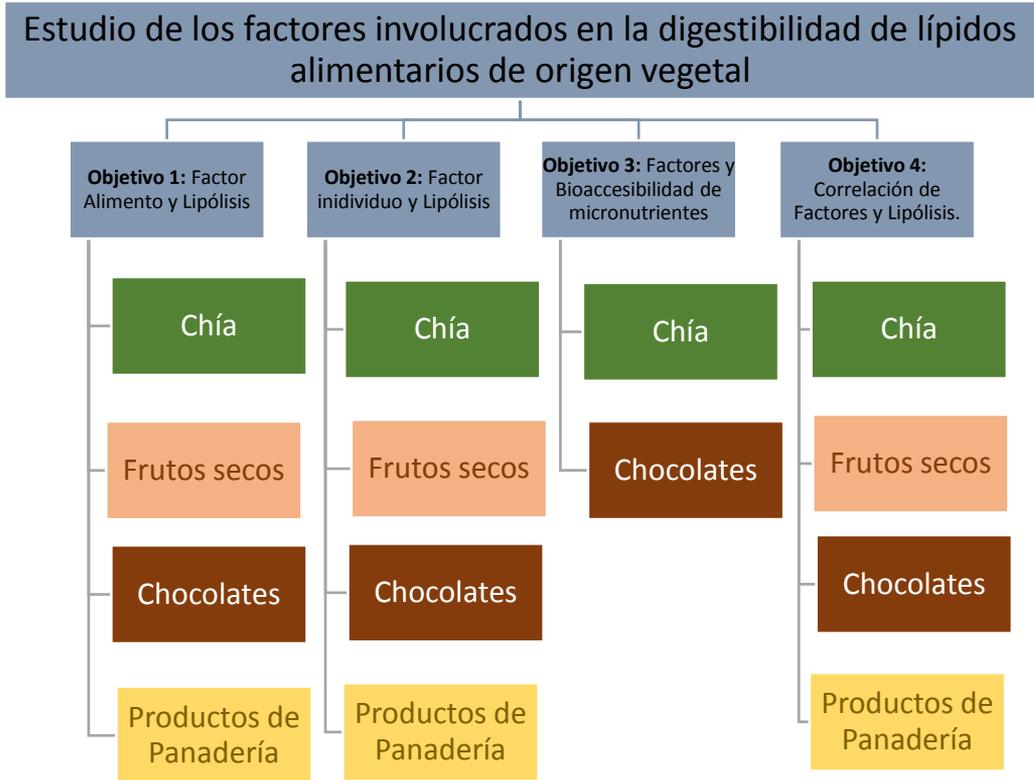


## 2.1 Objetivos

La presente tesis doctoral tiene como objetivo general el estudio de los factores mayormente involucrados en la digestibilidad de alimentos con lípidos alimentarios de origen vegetal (chía, frutos secos, chocolate y productos de panadería).

Para alcanzar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos (**Figura 2.1**):

1. Evaluar el efecto de ciertos factores inherentes al alimento tales como: estructura matricial, composición, tipo de procesado e interacciones entre nutrientes sobre la digestibilidad lipídica.
2. Estudiar la influencia de los principales factores característicos del individuo tales como: nivel de masticación, pH intestinal, concentración de sales biliares y concentración de enzimas pancreáticas en la digestión de las matrices alimentarias seleccionadas.
3. Estudiar la influencia que tienen los factores inherentes a los alimentos y los factores característicos del individuo sobre la bioaccesibilidad de algunos compuestos bioactivos de relevancia en las matrices estudiadas.
4. Correlacionar la extensión de la lipólisis alcanzada con la composición, estructura y procesado de las matrices seleccionadas y con la dosis de enzimas pancreáticos utilizada en la simulación de la digestión *in vitro*.



**Figura 2. 1.** Esquema de aplicación de objetivos específicos planteados según matrices alimentarias escogidas en el estudio.

## 2.1. Plan de trabajo

Con el fin de alcanzar los objetivos planteados, se llevaron a cabo las siguientes tareas:

1. **Revisión bibliográfica** referente a las matrices alimentarias estudiadas, metodologías de digestión *in vitro* en matrices alimentarias, así como también relacionados con las condiciones lumbinales intestinales características de pacientes con Fibrosis Quística.
2. **Selección de las matrices** de origen vegetal objeto de estudio. Se seleccionaron alimentos correspondientes a los siguientes grupos: semillas y germinados de chía, frutos secos, chocolates y productos de panadería. Esta selección se basó en el estudio europeo sobre hábitos alimentarios y la evaluación dietética de los niños con Fibrosis Quística en los países participantes (Calvo-Lerma, J.et al., 2019; Calvo-Lerma, J.et al, 2017).
3. Análisis de la influencia del pH, concentración de sales biliares y concentración de suplemento de enzimas pancreáticos en la digestión de **semillas y germinados de chía**.
  - 3.1 Preparación de la germinación de las semillas de chía para los ensayos correspondientes.
  - 3.2 Ensayos de digestión *in vitro* en condiciones gastrointestinales estándar y alteradas en situaciones de insuficiencia pancreática.
  - 3.3 Determinaciones analíticas de extensión de la lipólisis y bioaccesibilidad de polifenoles y capacidad antioxidante.
4. Análisis de la influencia del tamaño de partícula, origen botánico, y condiciones intestinales sobre la extensión de la lipólisis y proteólisis en **nueces y cacahuetes**.
  - 4.1 Identificación de tamaños medios de partícula correspondientes a distintos niveles de masticación para determinar su impacto en la digestibilidad de lípidos y proteínas.

## 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

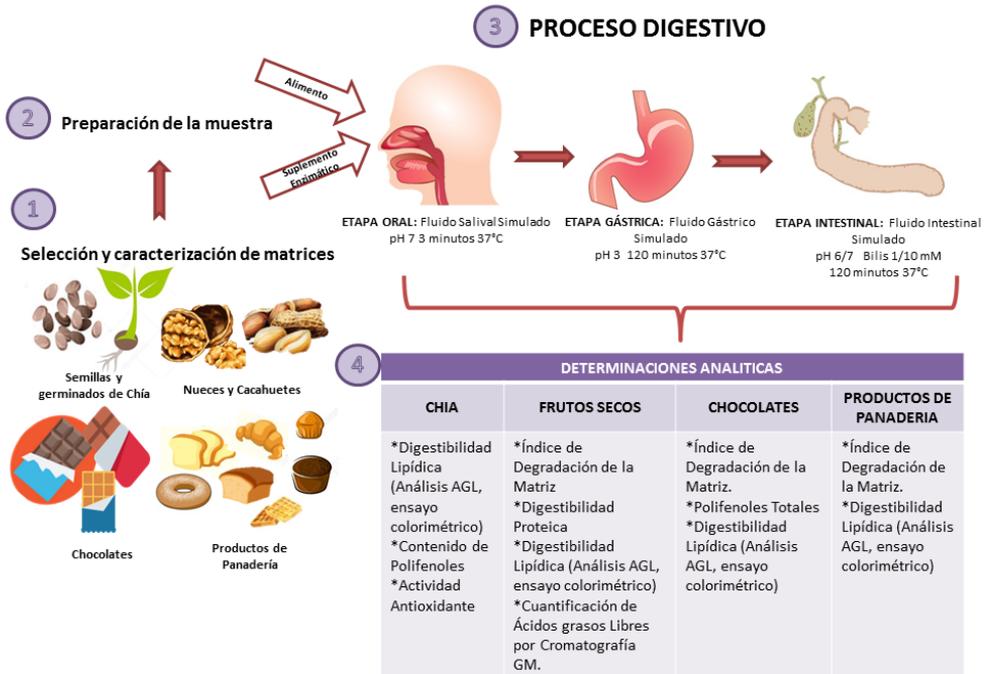
- 4.2 Ensayos de digestión *in vitro* en condiciones gastrointestinales estándar y alteradas propias de insuficiencia pancreática.
- 4.3 Determinaciones analíticas para establecer la extensión de la lipólisis y proteólisis, así como la evolución del perfil lipídico.
5. Análisis de la influencia de la formulación de **chocolates** y condiciones intestinales en la digestibilidad lipídica y bioaccesibilidad de polifenoles.
  - 5.1 Ensayos de digestión *in vitro* en condiciones gastrointestinales estándar y alteradas de insuficiencia pancreática.
  - 5.2 Determinaciones analíticas de degradación de la matriz, extensión de la lipólisis y bioaccesibilidad de polifenoles.
6. Análisis de la influencia del pH, concentración de sales biliares y concentración de suplemento de enzimas pancreáticos en la digestibilidad lipídicos de diferentes **productos de panadería**.
  - 6.1 Ensayos de digestión *in vitro* en condiciones gastrointestinales estándar y alteradas en situaciones de insuficiencia pancreática.
  - 6.2 Determinaciones analíticas: degradación de la matriz y extensión de la lipólisis.
  - 6.3 Modelización de la cinética de digestión de los lípidos de los productos digeridos y estimación de la dosis óptima de suplemento enzimático requerida para su adecuada digestión en grupos de población con insuficiencia pancreática.

## **3.METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**



### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Esta sección incluye los materiales y métodos utilizados en el desarrollo experimental de la presente tesis doctoral. El proceso realizado y las determinaciones correspondientes están esquematizados a continuación (**Figura 3.1**):



**Figura 3. 1.** Diagrama del plan experimental desarrollado en los estudios de digestión *in vitro*.

#### 3.1. Selección de Matrices y preparación de muestras

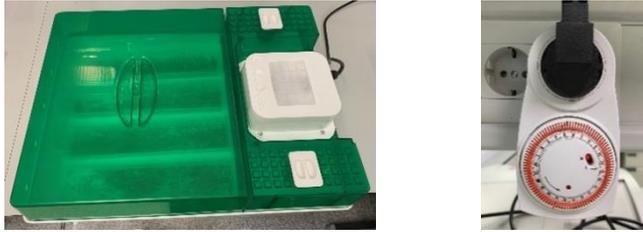
Se seleccionaron un total de 16 alimentos ricos en lípidos vegetales ya sea de forma natural como es el caso de frutos secos y semillas de chía, o bien incorporados mediante formulación y procesado como es el caso de los chocolates y productos de panadería.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.1.1 Chía

Las semillas de chía fueron adquiridas en un supermercado local y el estudio se llevó a cabo tanto en semillas como en sus brotes germinados. Las semillas se caracterizaron y digirieron de dos formas: 1) enteras y 2) parcialmente desestructuradas (simulando la masticación) con ayuda de un molino mecánico (Taurus Aromatic SP-7407 50Hz, disco de molienda de  $\varnothing$  80 mm, a 1480 rpm) aplicando 8 pulsos de molienda de 1s. Posteriormente se pasaron por varios tamices metálicos para determinar los diferentes tamaños obtenidos según masticación previamente simulada.

Para la obtención de germinados de chía se empleó el germinador eléctrico Easygreen EGL55, de Seed & Grain Technologies Inc., Nevada, EEUU, el cual incluye un nebulizador temporizado (generador de niebla) que permite rociar y oxigenar en períodos de tiempos ajustable a las condiciones deseadas para la germinación de las semillas (**Figura 3.2**). El proceso de germinación se llevó a cabo de acuerdo con el método publicado por Pająk, Socha, Broniek, Królikowska, & Fortuna (2019) con algunas modificaciones. Las semillas de chía se extendieron en bandejas estériles y se rociaron con agua desionizada a través del sistema de niebla del equipo germinador únicamente dos veces al día. El proceso de germinación de las semillas se llevó a cabo a una temperatura de  $22 \pm 2$  ° C 12/12 h día / noche. Las semillas germinadas se cosecharon después de 10 días de crecimiento (**Figura 3.3**) y se sometieron al proceso de digestión *in vitro* previamente desestructurando los germinados simulando una masticación con la ayuda de un picador (con cuchillas) realizando 3 pulsaciones cada una de un 1 segundo. Previo a la digestión de ambos productos (semillas y germinados), se determinó humedad, proteínas y lípidos según metodologías de AOAC.



**Figura 3. 2.** Equipo germinador de semillas de chía y Termostato regulador de nebulizaciones



**Figura 3. 3.** Semillas de Chía Germinadas luego de 10 días

#### 3.1.2 Frutos Secos (Nueces y Cacahuetes)

Los frutos secos seleccionados fueron nueces (*Juglans regia*) y cacahuetes tostados (*Arachis hypogaea*). Ambos frutos secos se compraron en un supermercado local. Las nueces ya estaban peladas, mientras que los cacahuetes tostados fueron adquiridos con su cáscara, por lo que fueron pelados previamente a su digestión.

Las nueces y los cacahuetes se trituraron con ayuda de un molino mecánico (Taurus Aromatic SP-7407 50Hz, disco de molienda de  $\varnothing$  80 mm, a 1480 rpm) aplicando pulsos de molienda de 3 s durante 1 min y luego se pasaron por un tamiz metálico de 1.2 mm para separar fracciones de dos tamaños de partículas (grandes > 1.2 mm y pequeñas < 1.2 mm) para evaluar la influencia del tamaño de partícula, entre otros factores, sobre su digestibilidad.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.1.3 Chocolates

Se seleccionaron tres tipos de chocolate: chocolate negro, chocolate con leche y chocolate blanco, todos del mismo fabricante y adquiridos en un supermercado local. La **Tabla 3.1** detalla los ingredientes de acuerdo a las etiquetas de los distintos chocolates.

**Tabla 3.1.** Ingredientes según información del etiquetado de los diferentes chocolates estudiados.

Ingredientes (%)	Negro	Leche	Blanco
Azúcar	27.43	54.61	59
Pasta de Cacao	63	8	-
Manteca de Cacao	9	28	25
Crema de leche en polvo	-	9	15
Emulsificantes	0.54 <sup>a</sup>	0.39 <sup>a</sup>	0.99 <sup>ab</sup>
Extracto de Vainilla	0.03	0	0.01

a: Lecitinas b: Polirricinoleato de poliglicerol

Las muestras de chocolates se trituraron mecánicamente con un mortero de mano antes del inicio de la etapa oral de la digestión hasta alcanzar un tamaño de 0.2 a 0.5 mm. La composición nutricional de los distintos chocolates se detalla en la **Tabla 3.2**.

**Tabla 3.2.** Información nutricional (por 100 g de producto) de los chocolates sometidos a digestión *in vitro*.

ALIMENTO	Carbohidratos (%)	Grasa (%)	Proteína (%)
Chocolate Negro	32	40	10.4
Chocolate con Leche	57	31	7
Chocolate Blanco	59	31	6

### 3.1.4 Productos de panadería

Se seleccionaron 9 productos de panadería comerciales: Pan integral, pan blanco, galleta tipo María, galleta con pepitas de chocolate, pastel de chocolate, donuts, gofre, croissant y magdalena del estudio europeo sobre hábitos nutricionales en niños con FQ (Calvo-Lerma et al., 2019)

En función del tipo de muestra (vítrea o gomosa) estas fueron desmigajadas o trituradas antes de su incorporación a la etapa oral del proceso de digestión *in vitro*. El pan blanco, pan integral, pastel de chocolate, donut, gofre, croissant y magdalena fueron desmigajados manualmente, mientras que las galletas tipo María y las galletas con pepitas de chocolate fueron trituradas con la ayuda de un mortero seleccionando posteriormente mediante tamices la fracción de partículas correspondientes a tamaños entre 0.25-0.5 mm.

Los ingredientes de los productos empleados se detallan en la siguiente tabla (**Tabla 3.3**):

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Tabla 3.3.** Ingredientes, de acuerdo al etiquetado, de los distintos productos de panadería comerciales empleados en el estudio de digestión *in vitro*.

PRODUCTO	INGREDIENTES
<b>PAN INTEGRAL</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).
<b>PAN BLANCO</b>	Harina de trigo, agua, levadura, azúcar, aceite refinado de girasol (1 %), sal, vinagre de vino, harina de habas y emulgentes (E - 471, E - 472e, E-481). corrector de la acidez (E- 341 iii), antioxidante (E - 300), conservadores (E - 828,E - 200, E-202).
<b>GALLETA TIPO MARÍA</b>	Harina de trigo, azúcar, grasa vegetal (palma), jarabe de glucosa y fructosa, lactosa (1 %), gasificantes: bicarbonato sódico y amónico, sal, emulgente: lecitina de soja, antioxidantes: metabisulfito sódico.
<b>GALLETA CON PEPITAS DE CHOCOLATE</b>	Harina de trigo, azúcar, grasa de palma, pasta de cacao, gasificantes (carbonato ácido de amonio, carbonato ácido de sodio, fosfato monocálcico), dextrosa, jarabe de glucosa y fructosa, sal, suero de leche en polvo, emulgentes (lecitina de soja, lecitina de girasol), aroma.

PRODUCTO	INGREDIENTES
<b>PASTEL DE CHOCOLATE</b>	Harina de trigo, azúcar, huevo líquido pasteurizado, aceite refinado, azúcar, pasta de cacao, manteca de cacao, emulgente (lecitina de soja), aroma de vainilla), agua, humectantes (glicerina, sorbitol), cacao desgrasado en polvo, leche desnatada en polvo, almidón de maíz modificado, gasificantes (pirofosfato ácido de sodio, bicarbonato sódico), sal, conservador (ácido sórbico), espesante (goma de xantana), enzimas, aromas.
<b>DONUT</b>	Harina de trigo 25%, azúcar 25%, grasas y aceites vegetales (palma, coco, girasol), agua, jarabe de glucosa y fructosa, humectantes: sorbitoles y glicerina, levadura, huevo, dextrosa, emulgentes: monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos-ésteres monoecil y diacetil tartáricos de monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos-estearoil-2-lactato sódico- lecitinas de girasol, sal, estabilizantes: celulosa-carboximetilcelulosa sódica - goma guar, gluten de trigo, conservadores: sorbato potásico y propionato cálcico, aromas, harina de soja, agente de tratamiento de la harina: ácido ascórbico, acidulantes: ácido láctico y ácido cítrico.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRODUCTO	INGREDIENTES
<b>GOFRE</b>	Harina de trigo, aceites y grasas vegetales no hidrogenadas (girasol, palma y soja en proporciones variables), azúcar, agua, huevo líquido pasteurizado, levadura, emulgente (lecitina de soja), leche desnatada en polvo, sal, conservador (E200), aroma de vainilla
<b>CROISSANT</b>	Harina de trigo, aceites y grasas vegetales (girasol, soja, palma), agua, azúcar, aceite refinado de girasol, huevo líquido pasteurizado, azúcar invertido, levadura, fibra y gluten de trigo, espesantes (carboximetilcelulosa, goma xantana), emulgentes (lecitinas (girasol), sorbitol, E-471, E-472e, E-472c, E-481), sal, proteínas de leche, conservador (ácido sórbico, sorbato potásico, propionato cálcico), aromas, corrector de acidez (ácido cítrico), enzimas (alfa amilasas, xilanasas), colorante (betacaroteno), antioxidante (ácido ascórbico, E-304, E-307).
<b>MAGDALENA</b>	Azúcar, harina de trigo, aceite refinado de girasol (20%), huevo líquido pasteurizado, agua, sorbitol, sal, gasificantes (pirofosfato ácido de sodio, bicarbonato sódico), corrector de acidez (ácido cítrico), conservador (ácido sórbico), emulgentes (E-471, E-477, E-470a, E-1520), espesante (goma xantana), colorante (betacaroteno), aromas.

Complementariamente, la composición nutricional de los distintos productos de panadería se detalla en la **Tabla 3.4**

**Tabla 3.4.** Información nutricional de los productos de panadería sometidos a digestión *in vitro*.

<b>ALIMENTO</b>	<b>Carbohidratos (%)</b>	<b>Grasa (%)</b>	<b>Proteína (%)</b>
Pan Integral	48.50	4.40	8.40
Pan blanco	52.00	1.50	9.50
Galletas tipo María	76.30	11.50	6.70
Galletas con chispas de chocolate	64.30	22.92	6.20
Pastel de chocolate	39.60	21.90	6.50
Donuts	42.00	24.40	6.00
Gofres	53.7	27.3	7.6
Croissant	55.00	17.20	7.50
Magdalena	39.90	22.40	6.10

### **3.2. Simulación *In vitro* de la digestión gastrointestinal**

Los experimentos de digestión *in vitro* se llevaron a cabo en un modelo estático basado en el protocolo internacional armonizado publicado por Minekus et al., 2014 y adaptado para simular y estudiar la digestión en las condiciones gastrointestinales alteradas propias de la Insuficiencia Pancreática Exocrina (IPE) (Asensio-Grau, Peinado, et al., 2018; Peinado, Larrea, Heredia, & Andrés, 2018).

El diseño experimental utilizado en cada una de las matrices estudiadas conlleva la ejecución de 2 bloques de experimentos. El primero de ellos, está orientado al estudio de la influencia del pH intestinal y de la concentración de sales biliares, por lo que se

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

fija la dosis de pancreatina en 2000 UL/g grasa y se establecen distintas combinaciones de pH y concentración de sales biliares: pH6/10mM, pH7/1mM, y pH7/10mM. El segundo bloque de experimentos está orientado al estudio de la influencia de la dosis de suplemento enzimático en el resultado de la digestión, para lo que se fijan las condiciones intestinales en pH6/1mM (por ser estas condiciones las más desfavorables y representativas en pacientes de fibrosis quística). (Asensio-Grau, Calvo-Lerma, Heredia, & Andrés, 2018; Asensio-Grau, Peinado, et al., 2018; Calvo-Lerma et al., 2018; Gelfond et al., 2013; Harries, Muller, McCollum, Lipson, Romaand Norman, 1979; Paz-Yépez, Peinado, Heredia, & Andrés, 2019a, 2019b; Robinson, Smith, & Sly, 1990).

Las principales alteraciones simuladas en el contexto de esta tesis son aquellas que se derivan de la Insuficiencia Pancreática Exocrina (IPE) y que fundamentalmente se traduce en una disminución del pH intestinal y una disminución o ausencia de enzimas pancreáticas. Adicionalmente, y en el contexto de la fibrosis quística, la IPE suele ir acompañada de una obstrucción del conducto biliar y pancreático de ahí que el diseño experimental incluya como condiciones una baja concentración de sales biliares en el medio de digestión.

Los fluidos digestivos simulados (Salival (FSS), gástrico (FGS) y el intestinal (FIS), fueron preparados diariamente partiendo de las correspondientes disoluciones stock previamente preparadas de acuerdo a Minekus et al. (2014) (**Tabla 3.5**).

**Tabla 3.5.** Composición de los fluidos simulados para la digestión *in vitro*.

Compuesto	FSS	FGS	FIS
	mmol/ L	mmol/ L	mmol/ L
KCl	15.1	6.9	6.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.7	0.9	0.8
NaHCO <sub>3</sub>	13.6	25	85
NaCl	-	47.2	38.4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0.15	0.1	0.33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.06	0.5	-
CaCl <sub>2</sub>	1.5	0.15	0.6

FSS: Fluido Salival Simulado; FGS: Fluido Gástrico Simulado; FIS: Fluido Intestinal Simulado.

A continuación, se describe con detalle el proceso de digestión *in vitro* simulado en este estudio:

**Etapa Oral:** el fluido salival simulado (FSS) con  $\alpha$ -amilasa de saliva humana (75 U/ mL) (pH 7), fue añadido al tubo falcon que contenía el alimento en una relación alimento: FSS de 1:1 (p:v). Se mezcló y se incubó durante 2 minutos a 37 °C sin agitación en una cámara incubadora termostataada Selecta (JP Selecta SA, Barcelona).

**Etapa Gástrica:** después de la etapa oral, a cada tubo falcon que contenía el bolo alimenticio se le añadió el fluido gástrico simulado (FGS; pH 3) en una relación bolo: FGS de 1:1 (v/v). Al FGS se le añadió pepsina para alcanzar una concentración en la mezcla gástrica de 2000 U / mL. El pH de la mezcla se ajustó con HCl (1N) a un valor de pH  $2.8 \pm 0.1$  y las muestras se mantuvieron en una agitación constante a 55 rpm durante 120 minutos a 37 °C usando un Intell-Mixer RM-2 (Elmi Ltd, Riga , LV-1006, Letonia) colocado en la cámara incubadora termostataada (JP Selecta SA, Barcelona).

**Etapa Intestinal:** a cada tubo falcon que contenía el quimo gástrico, se le añadió fluido intestinal simulado (FIS; pH 7) que contenía sales biliares (1 o 10 mM) y pancreatina (0, 1000, 2000, 3000 o 4000 UL / g de grasa) según lo detallado en el diseño

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

experimental para cada matriz alimentaria digerida e indicada en un esquema al inicio de cada sección de resultados, en una relación de quimo: FIS de 1:1 (v/v). El pH de la mezcla se ajustó con NaOH (1N) al pH correspondiente de acuerdo con el diseño experimental ( $6 \pm 0.1$  o  $7 \pm 0.1$ ). Las muestras se mantuvieron en agitación a 55 rpm durante 120 minutos a 37 °C usando un Intell-Mixer RM-2 (Elmi Ltd, Riga, LV-1006, Letonia) colocados en la cámara incubadora termostataada (JP Selecta SA, Barcelona). El pH se controló durante el proceso de digestión intestinal y se reajustó si era necesario, ya que un pH por debajo de 5.7 podría inactivar la actividad lipasa (González-Bacero, Rodríguez Hernández, & del Monte Martínez, 2010).

Las digestiones se llevaron a cabo por triplicado, en tubos falcon independientes para cada condición de simulación.

#### 3.3. Determinaciones Analíticas

Las muestras digeridas se colocaron en hielo durante 10 min antes de realizar las determinaciones analíticas. Para separar la fracción sólida (no digerida) de la fase líquida (de ahora en adelante denominada "fase micelar") resultante del proceso de digestión, se centrifugó el contenido total del tubo falcon (4000 x g de fuerza durante 20 min 10 °C) y se filtró la fase micelar mediante un tamiz metálico (malla de 1.6 mm x 1.6 mm) para separarla de las partículas de alimentos no digeridas con el fin de determinar el índice de degradación de la matriz. Del filtrado (fase micelar) se recogió muestra para poder estimar el grado de lipólisis y proteólisis. En el caso del análisis del perfil de ácidos grasos libres por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), la fase micelar filtrada restante se liofilizó (-40 °C y 1.25 mbar, Telstar, Terrassa, España).

Para los análisis de polifenoles totales y capacidad antioxidante en la chía (valores iniciales-no digeridas) y el chocolate, se liofilizaron (-40 °C y 1.25 mbar, Telstar, Terrassa, España) y se almacenaron en la oscuridad hasta realizar los análisis posteriores.

Todas las determinaciones analíticas se llevaron a cabo por triplicado.

### 3.3.1. Índice de Degradación de la Matriz (IDM (%))

El índice de degradación de la matriz (IDM) en los digeridos, se determinó según el método propuesto por Lamothe et al. (2012) a partir de la proporción de sólidos del alimento dispersos en los fluidos de digestión al final de la digestión *in vitro*. Las partículas del alimento no digeridas (fracción sólida), previamente separadas mediante centrifugación, se transfirieron a un recipiente de aluminio previamente pesado. Luego, los recipientes de aluminio con el residuo sólido se colocaron en una estufa a 60 °C durante 48 horas y se pesaron nuevamente para determinar la materia seca. El IDM corresponde a la proporción de sólidos de los alimentos que pasan por el tamiz metálico y se calculó según la ecuación 1:

$$IDM (\%) = \frac{CSo - CSt}{CSo} \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde CSo corresponde a la masa inicial del alimento antes de la digestión (masa del alimento colocado en el tubo falcon para su digestión) y CSt corresponde a la masa de partículas de sólidos del alimento que quedan después de la digestión.

### 3.3.2. Digestibilidad Proteica -Parámetros cinéticos de la proteólisis.

El seguimiento de la proteólisis durante la etapa gástrica e intestinal se llevó a cabo analizando la fracción de proteína soluble en ácido tricloroacético (TCA).

Para ello, se extrajeron muestras a diferentes tiempos de digestión (0, 10, 20, 30, 45, 60 y 120 minutos de la etapa gástrica y 0, 10, 20, 30, 45, 60 y 120 min de la etapa intestinal). Las muestras se colocaron inmediatamente en hielo, y tras diez minutos, se añadió ácido tricloroacético (ATC) en una concentración final del 12% (p/p), La mezcla se agitó en vórtex y se incubó durante 60 min. Posteriormente, se

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

centrifugaron (1400 x g de fuerza durante 20 min). Transcurrido ese tiempo, se mezclaron 80 µL del sobrenadante que contenía los péptidos hidrolizados (proteína soluble en TCA) con 1.42 mL de tampón de glicina (33 mM, pH 10.3) en una cubeta de cuarzo y se midió la absorbancia (densidad óptica (OD)) a 280 nm, usando un espectrofotómetro (UV / vis, Beckman Coulter) en comparación con un blanco preparado con los fluidos de digestión apropiados. La fracción de proteína soluble en TCA al 12% está compuesta de pequeños péptidos y residuos de aminoácidos.

A partir de la curva de absorbancia en función del tiempo de digestión, se estimaron dos parámetros OD<sub>max</sub> y ΔOD / h inicial (Bax et al., 2012, Gatellier & Santé-Lhoutellier, 2009). OD<sub>max</sub> representa la máxima proteólisis teórica alcanzada en un tiempo infinito de digestión; este parámetro se relacionó con el “tiempo medio”, que representa el tiempo necesario para producir la mitad de cantidad de péptidos hidrolizados en comparación con OD<sub>max</sub>.

La ecuación 2 muestra la relación entre OD y el tiempo medio.

$$OD = OD_{max} \cdot e^{\left(\frac{-B}{tiempo}\right)} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde B= Tiempo medio.

Además, para analizar mejor la dinámica de la digestibilidad de la proteína se calculó la pendiente inicial de la curva (ΔOD / h) ya que este parámetro proporciona información relacionada con la cinética de la proteólisis al inicio de las etapas gástrica e intestinal. La ecuación 3 muestra la velocidad de la digestión calculada a partir de la derivada de la ecuación 2

$$\frac{d(OD)}{d(tiempo)} = 60 \cdot OD_{max} \cdot B \cdot \frac{1}{(tiempo)^2} \cdot \exp\left(-\frac{B}{tiempo}\right) \quad \text{Ecuación (3)}$$

Donde B= Tiempo medio

La pendiente inicial (ΔOD/h) se calculó durante los primeros 20 minutos de la etapa gástrica e intestinal (Bax et al., 2012).

### 3.3.3. Análisis de Ácidos Grasos Libres (AGL)

Se emplearon dos tipos de métodos para medir los ácidos grasos libre (AGL) en la fase micelar del digerido: 1) un método espectrofotométrico que permite estimar los AGL totales, y 2) un método cromatográfico que permite determinar el perfil de AGL; este último se empleó únicamente en una selección de muestras.

#### 3.3.3.1. *Determinación de ácidos grasos libres (AGL) mediante ensayo colorimétrico*

Los AGL totales liberados después de la digestión se midieron mediante un kit de ensayo espectrofotométrico (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EE. UU.) en un espectrofotómetro (UV / vis, Beckman Coulter) (Lamothe et al., 2012).

El principio de la determinación enzimática se basa en el hecho de que los AGL se convierten en acil-CoA por ATP y CoA en una reacción catalizada por Acyl CS, que produce AMP y pirofosfato. Además, la acil-CoA reacciona con el oxígeno en una reacción catalizada por la acil-CoA oxidasa (ACID), produciendo 2,3-enoil-CoA. El peróxido de hidrógeno resultante convierte el ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxibenzoico (TBHB) y la 4-aminoantipirina (4-AA) en un producto de color rojo en presencia de peroxidasa (POD). La concentración de dicho compuesto se mide en el rango de luz visible a 546 nm.

La solubilización de los AGL se logró mezclando 100 µL de fase micelar de las muestras digeridas con una solución hecha de 5.72% (p/p) de Tritón X-100 y 4.80% (p/p) de etanol en agua, lo que representa un total de 10 mL.

De acuerdo a la matriz analizada, se identificó el ácido graso mayoritario, empleando para estos análisis distintos estándares de ácidos grasos para la determinación cuantitativa de los AGL. Según las matrices analizadas hemos empleado los siguientes estándares de ácidos grasos:

- Frutos Secos: Nueces: Ácido Linoléico y en Cacahuetes: Ácido Oleico
- Chocolate: Ácido Oleico

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

- Productos de Panadería: Ácido Linoléico
- Chía: Acido Alfa-Linolénico

El resultado fue expresado como mg AGL por gramo de grasa, o como extensión de la lipólisis (%) la cual se estimó asumiendo la liberación de 2 moles de ácidos grasos por 1 mol de triglicéridos y considerando los pesos moleculares promedios de ácidos grasos mayoritarios en cada matriz (Lamothe, Azimy, Bazinet, Couillard, & Britten, 2014).

#### 3.3.3.2. *Determinación de AGL por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)*

*Preparación de la muestra:* El perfil de AGL fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), tras una transesterificación a metil esterres (FAMEs del inglés: fatty acid methyl esters) con una mezcla de BF<sub>3</sub> metanol (14% metanol) a 20 °C de acuerdo al método estandarizado IUPAC (IUPAC, 1992; Yaich et al., 2011).

La fracción lipídica digerida de las muestras se extrajo de la siguiente manera de la fase micelar previamente liofilizada: se pesaron 60 mg cuando las muestras presentaban un contenido de grasa superior al 30% o 100 mg con contenido de grasa inferior al 30%. La extracción fue realizada en tubos falcon de 15 mL añadiendo a la muestra 3 mL de hexano y manteniendo la mezcla en agitación a 55 rpm durante 90 minutos usando un Intell-Mixer. RM-2 (Elmi Ltd, Riga, LV-1006, Letonia). Transcurrido ese tiempo, los tubos fueron centrifugados durante 5 minutos a 4000 x g-fuerza, y se pipeteó 1 mL del sobrenadante (que contenía la fracción lipídica) llevándolo a un vial de reacción; el hexano se evaporó bajo un flujo de nitrógeno y el residuo se sometió a metilación. Posteriormente, la fracción lipídica se colocó en viales de reacción de vidrio de 2 mL. El patrón interno (50 µL de una solución 1 mg /mL), el hexano (40 µL) y el BF<sub>3</sub> (100 µL) se agregaron a los viales, se agitaron con vórtex durante 15 segundos y luego se calentaron a 70 °C durante 90 min. Después, se añadió al medio de reacción

una disolución saturada de sal (100  $\mu\text{L}$ , NaCl al 25% (w/v)),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (40  $\mu\text{L}$ , 10% (w/v)) y hexano (0,7 mL), se agitó con vórtex por 15 segundos y luego se dejaron reposar por 30 min. Transcurrido ese tiempo, se tomaron 400  $\mu\text{L}$  de la capa superior y se transfirieron al vial de inyección para su análisis. El ácido pentadecanoico se utilizó como patrón interno.

*Análisis cromatográfico de AGL:* Las muestras se analizaron con un cromatógrafo Agilent 5977A GC equipado con un muestreador automático Agilent 5977A y una columna capilar HP-5MS UI (30m x 0.25 mm, espesor de película de 0.25  $\mu\text{m}$ ).

La temperatura del horno se programó a 90 °C durante 2 minutos, y se incrementó a 222 °C a 5 °C / min durante 5 minutos, y posteriormente se incrementó hasta 280 °C a 20 °C / min durante 2 minutos. Las temperaturas del inyector y del detector se establecieron a 250 °C. Los espectros de masas se registraron a 70 eV. Rango de masa de m / z 30 a 650. El gas portador fue helio a un flujo constante de 1.0 mL / min (Split ratio 10:1).

La identificación y cuantificación del análisis de datos de FAME se realizó al comparar los tiempos de retención de los picos con los de los estándares puros (Supelco®37 Component FAMES Mix, Sigma), los cuales fueron previamente analizados en las mismas condiciones. Asimismo, también se realizó una comparación con las bibliotecas comerciales (Nis 11t, Nist\_msms, mainlib, replib, wiley7n).

Los resultados se expresaron como mg de AGL/g de grasa identificados individualmente en las muestras digeridas.

#### 3.3.4. Contenido total de polifenoles

Los polifenoles totales fueron determinados de acuerdo al protocolo modificado de Paz-Yépez et al. (2019b); Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós (1998). La extracción de polifenoles se llevó a cabo en los liofilizados de las muestras digeridas (50mg) usando metanol (1 mL, 30:70 solución metanol-agua (v:v) para el caso de

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

chocolates y 70:30 metanol-agua (v:v) para el caso de chía) por agitación a 55 rpm, durante 120 min a 25 °C utilizando un Intell-Mixer RM-2 (Elmi Ltd, Riga, LV-1006, Letonia). La mezcla fue posteriormente centrifugada a 14.1 x g-fuerza por 20 min (Eppendorf® Minispin®). Después de la centrifugación, el extracto metanólico (125 µL) se añadió a una cubeta plástica de 4 mL, con agua destilada (0.5 mL) y el reactivo de Folin-Ciocalteu (125 µL). Después de 5 minutos, se añadió 1.25 mL de una disolución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7% (p/v)) y agua destilada (1 mL), y se midió su absorbancia a 760 nm. La curva patrón se realizó utilizando ácido Gálico (0-700 µmol de ácido gálico/ L) como estándar. Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico (AG) equivalentes por gramos de alimento o g de materia seca, según producto.

#### 3.3.5. Actividad antioxidante total

La determinación de la capacidad antioxidante total se realizó espectrofotométricamente haciendo uso del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil generado (DPPH). En este caso, se evalúa la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar dicho radical (Antolovich et al., 2001).

La extracción se llevó a cabo como se indica en la sección 3.3.4, en los liofilizados de las muestras digeridas (50mg) usando metanol (1 mL, 70:30 metanol-agua (v: v)) por agitación a 55 rpm, durante 120 minutos a 25 °C utilizando un Intell-Mixer RM-2 (Elmi Ltd, Riga, LV-1006, Letonia). La mezcla fue posteriormente centrifugada a 8000 rpm por 20 minutos. Se midió la absorbancia a 515 nm de 3 mL del reactivo DPPH (absorbancia a tiempo cero, A<sub>0</sub>). A continuación se añadieron 30 µL del extracto y se midió la absorbancia nuevamente a los 60 min, cuando la reacción se había estabilizado (A<sub>60</sub>). Se calculó el porcentaje de inhibición del DPPH en función de la ecuación (4)

$$\text{Inhibición del radical DPPH (\%)} = \frac{A_0 - A_{60}}{A_0} \times 100 \quad \text{Ecuación (4)}$$

Los resultados se expresaron como mg de trolox equivalente (TE)/ g de producto en base seca.

La **Tabla 3.6** resume los análisis realizados en las distintas matrices digeridas.

**Tabla 3.6.** Resumen de las determinaciones analíticas realizadas en las matrices alimentarias objeto de estudio.

Determinación Analítica	Chía	Frutos Secos	Chocolates	Productos de Panadería
Índice de Degradación de la Matriz (%)	-	√	√	√
Determinación de ácidos grasos libres (AGL) mediante ensayo colorimétrico	√	√	√	√
Determinación de AGL por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	-	√	-	-
Digestibilidad Proteica: Parámetros cinéticos de la proteólisis.	-	√	-	-
Contenido Total de polifenoles	√	-	√	-
Actividad Antioxidante	√	-	-	-



## **4. RESULTADOS**



## **4.1 Digestibilidad lipídica y bioaccesibilidad de antioxidantes en semillas y germinados de chía**



La chía (*Salvia hispánica L.*) es una planta herbácea, nativa del sur de México y del norte de Guatemala, que ha sido consumida desde la antigüedad por las poblaciones mesoamericanas (Capitani, Spotorno, Nolasco, & Tomás, 2012).

Las semillas de chía poseen una cantidad significativa de lípidos (alrededor del 40% del peso total de la semilla), casi el 60% como ácido linoléico (omega 3), por lo que se trata de un producto muy apreciado por su potencial como ingrediente funcional (Zettel & Hitzmann, 2018). Además, también contiene fibra dietética (más del 30% del peso total), proteínas de alto valor biológico (alrededor del 19% del peso total), calcio y vitaminas de grupo B (Reyes-Caudillo, Tecante, & Valdivia-López, 2008). Los principales compuestos fenólicos presentes en las semillas de chía son el ácido clorogénico y ácido cafeico, seguidos de miricetina, quercetina y kaempferol. El ácido cafeico y clorogénico protege contra los radicales libres e inhibe la peroxidación de grasas, proteínas y ADN; mientras que la quercetina se ha relacionado más con efecto cardioprotector (Muñoz, Cobos, Diaz, & Aguilera, 2013).

En este sentido, la comisión Europea en enero de 2013 (The European Commission, 2013) extendió el uso de chía como nuevo ingrediente alimentario en productos de panadería, cereales para el desayuno y mezclas de frutas, nueces y semillas, lo que ha motivado la aparición de numerosos estudios de caracterización e incorporación de chía en distintas formulaciones. Así por ejemplo, Costantini et al. (2014) y Huerta et al. (2018) emplearon harina de semillas de chía en diferentes tipos de pan con el objetivo de mejorar su valor nutricional al aumentar la cantidad de proteína (20%), fibras dietéticas insolubles (74%) y ácido alfa-linolénico (67.4%). En otro estudio realizado por Inglett, Chen, Liu, & Lee (2014) mezclaron productos de avena (harina de avena integral orgánica, concentrado de salvado de avena, y un preparado del concentrado de salvado de avena sometido a cocción por vapor, tamizado y secado en tambor) con chía molida concluyendo que, las semillas de chía solas no son fácilmente usadas en productos alimenticios debido a su tamaño pequeño y la cubierta dura y baja cohesividad. Sin embargo, los productos avena-chía resultaron de

#### 4. RESULTADOS

interés por el alto contenido en fibra soluble aportado por la avena y los ácidos linolénico y linoleico de las semillas de chía. Además del interés de las semillas por su contenido y perfil lipídico, cabe resaltar las propiedades de su capa de mucílago la cual forma la testa (cascarilla) y se compone principalmente por polisacáridos. El mucílago es una potencial fuente de hidrocoloides con diferentes propiedades funcionales atractivas para la industria, tales como emulsificante, espesante, estabilizante en la formación de espumas, capacidad de retención de agua, y elevada solubilidad en agua fría y/o caliente. El mucílago de la chía además puede ser incorporado en diferentes alimentos y formulaciones, pues tiene la capacidad de formar películas comestibles, en combinación con proteínas mejorando, las propiedades mecánicas y funcionales de las mismas (Muñoz, Cobos, Diaz, & Aguilera, 2012). Un ejemplo del uso del mucílago de la chía se detalla en el estudio de Fernandes & Salas-Mellado (2017) en el que se prepararon panes y pasteles de chocolate con diferentes niveles de mucílago. La adición del mucílago de chía afectó ligeramente las características tecnológicas de los panes pero redujo el valor calórico del pan y pasteles de chocolates como resultado del reemplazo de la grasa por el mucílago. Así, un reemplazo del 75% dio como resultado panes y pasteles con un 36.7% y 51.6% menos de grasa, respectivamente. Al tratarse de semillas, estas constan de una capa externa (cubierta seminal o testa) lo que puede dificultar la hidrólisis de lípidos y proteínas, así como la liberación y solubilidad de compuestos bioactivos desde la matriz hacia los fluidos digestivos, limitando su bioaccesibilidad. Alternativamente al consumo directo de la semillas de chía, estas pueden ser sometidas a procesos como el remojado, germinado o fermentación para aumentar su digestibilidad. De entre estos procesos, el consumo de semillas germinadas, no solo de chía, sino también de lino, onagra, phacelia, fenogreco, ha ganado mucha popularidad. La germinación es un método económico y simple que permite mejorar el valor nutritivo de las semillas debido al incremento en proteínas, compuestos fenólicos y minerales, en comparación con sus homólogos no germinados (Zieliński,

Frias, Piskula, Kozłowska, & Vidal-Valverde, 2006). Según Kylen, & McCready (1975), el aumento de proteínas durante la germinación, podría estar relacionado parcialmente con una pérdida de azúcares, así como con una síntesis de proteínas *novo* en diversas partes de la plántula. Asimismo, tanto las semillas secas como sus germinados contienen enzimas proteolíticas, capaces de hidrolizar la proteína de almacenamiento de los cotiledones a aminoácidos libres y amidas, que a su vez son utilizados por las diversas partes del germinado (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1982).

En cuanto a la evolución de los lípidos, Kylen & McCready, 1975; Mostafa, Rahma, & Rady, (1987) observaron una disminución gradual de los mismos conforme progresaba la germinación debido a la acción de lipasas endógenas. Los ácidos grasos resultantes de la acción de la lipasa se acumulan en pequeñas cantidades en los germinados dado que la mayor parte de los mismos son metabolizados por la planta en una o varias rutas (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1982). Por otro lado, Bau, Villaume, Chandrasiri, Nicolas, & Mejean, (1994) analizaron el efecto de la germinación sobre la reducción de la actividad inhibitoria de la lipasa. Así, comprobaron que si bien existía un aumento de la actividad inhibitoria de la lipasa durante las primeras 24h, ésta disminuía progresivamente a partir del primer día, y conforme aumentaba el tiempo de germinación hasta reducirse en un 18% a los 5 días. Por lo tanto, la germinación presentaría un efecto positivo desde el punto de vista de la digestibilidad de las grasas (Bauer, Jakob, & Mosenthin, 2005) por el efecto que la actividad inhibitoria de la lipasa podría tener sobre las análogas digestivas.

El brote también elimina antinutrientes, lo que hace que los brotes sean más seguros para el consumo humano (Mbithi, Van Camp, Rodriguez, & Huyghebaert, 2002). En el entorno natural, los brotes de semillas sobreviven durante la germinación al mejorar sus respuestas defensivas a través de la biosíntesis de compuestos fenólicos (Randhir, Lin, & Shetty, 2004). Tanto en las semillas como en el germinado, una pequeña parte de los ácidos fenólicos y flavonoides existen como formas libres. La mayoría están unidos a componentes estructurales de la planta a través de enlaces éster, éter o

#### 4. RESULTADOS

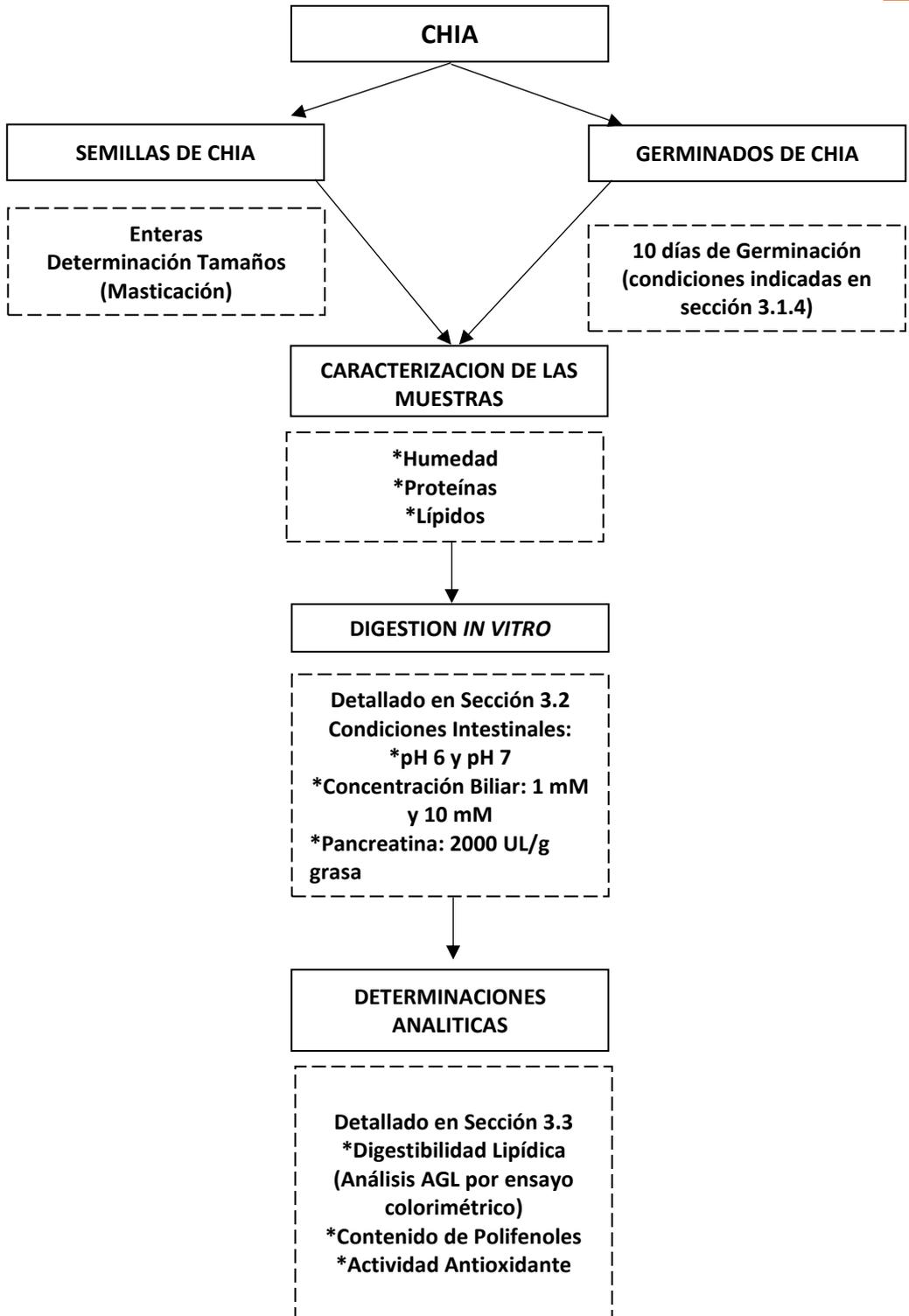
acetal, dando lugar a complejos de mayor tamaño molecular (Amin & Thakur 2014; Pandey, & Rizvi, 2009; Robbins, 2003). Las actividades biológicas de estos compuestos, incluida la actividad antioxidante, dependen tanto de las diferencias estructurales como de los patrones de glicosilación (Tsao, 2010).

Actualmente existe poca información científica sobre estudios comparativos de lipólisis, compuestos fenólicos, y actividad antioxidante en semillas de chía y sus germinados. En este contexto, en el presente estudio se planteó:

- analizar los cambios en el contenido lipídico y proteico como consecuencia de la germinación,
- comparar la digestibilidad de lípidos en semillas y germinados, y
- analizar el efecto de la digestión sobre el contenido total de compuestos fenólicos y sobre la capacidad antioxidante de semillas y germinados.

Dado que el eje conductor de esta tesis es analizar la influencia de las condiciones intestinales en la digestibilidad de distintas matrices alimentarias, la simulación del proceso de digestión se llevó a cabo tanto en condiciones intestinales correspondientes a un modelo de adulto sano como en condiciones intestinales alteradas características de un paciente de Fibrosis Quística.

A continuación, se presenta de forma esquematizada el plan experimental diseñado para llevar a cabo este estudio (**Figura 4.1**):



**Figura 4.1.** Esquema del desarrollo del plan experimental para la evaluación de la digestión lipídica y bioaccesibilidad de antioxidantes en semillas de chíá y sus germinados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1.1. Caracterización de las semillas de chía antes y después de la germinación

Previa a la digestión *in vitro* se determinó la humedad, contenido en proteína, lípidos, fenoles totales y actividad antioxidante tanto de semillas como de germinados de chía (**Tabla 4.1**). Tal y como se puede observar, el proceso de germinación modificó la composición en macronutrientes y micronutrientes de las semillas. Se produjo un incremento del contenido en humedad y proteínas, y una disminución del contenido lipídico. Según Kylen & McCready (1975), el aumento de proteínas durante la germinación puede estar relacionado con una pérdida de azúcares durante el proceso de germinación, así como con la síntesis de proteínas. Durante la germinación, los ácidos grasos resultantes después de la acción de la lipasa se acumulan en pequeñas cantidades. Sin embargo, la mayor parte de los ácidos grasos se descompone en una o varias reacciones metabólicas de  $\beta$ -oxidación y de  $\alpha$ -oxidación. Todos los ácidos grasos se metabolizan aproximadamente a la misma velocidad. Sin embargo, los ácidos grasos saturados desaparecen algo más rápido que los insaturados (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1982). En cuanto a los compuestos antioxidantes, los resultados obtenidos evidencian un ligero aumento del contenido en fenoles totales, pero un incremento sustancial de la capacidad antioxidante. La germinación por tanto, daría lugar a nuevos compuestos de carácter antioxidante diferentes a los fenólicos, resultando en un aumento global de capacidad antioxidante como consecuencia de los cambios biológicos en las plántulas en desarrollo (Guzmán-Ortiz, San Martín-Martínez, Valverde, Rodríguez-Aza, Berríos,, & Mora-Escobedo, 2017). Así, se produce un aumento del contenido vitamínico además de activarse la clorofila, con elevada capacidad antioxidante. Los resultados de la capacidad antioxidante obtenidos en semillas de chía en este trabajo ( $4.49 \pm 0.12$  mg TROLOX /g ms) fueron mayores a los registrados ( $0.76$  mg TROLOX /g ms) en los estudios de Pajak et al. (2019). Sin embargo, los valores en los germinados ( $6.3 \pm 1.7$  mg TROLOX /g ms)

fueron muy cercanos a los obtenidos en ese mismo estudio (8.3 mg TROLOX /g ms). Estas diferencias se deben probablemente a que la síntesis de compuestos antioxidantes durante la germinación es muy dependiente del tipo de semillas y del tiempo de germinación. Por último, cabe destacar que no se detecta un aumento notable de los compuestos fenólicos en germinados en comparación con las semillas ya que estos son empleados para el crecimiento de la planta conforme se van generando (Pająk et al., 2019).

**Tabla 4.1.** Caracterización de semillas y germinados de chía en términos de contenido en humedad, proteínas, lípidos, capacidad antioxidante, polifenoles totales y variación neta de masa y macronutrientes durante la germinación.

Parámetros	MATRIZ ALIMENTARIA	
	Semillas	Germinados
Humedad (g / 100 g materia seca)	6.110± 0.013	90.86 ± 1.1
Proteínas (g/ 100 g materia seca)	18.55 ± 0.7	22.59 ± 1.14
Lípidos (g/ 100 g materia seca)	32.2 ± 0.7	10 ± 2
Polifenoles Totales (mg AG eq./g materia seca)	2.48 ±0.03	2.87 ±0.06
Capacidad Antioxidante (mg TROLOX/g ms)	4.49 ± 0.12	6.3 ± 1.7
Variación neta de masa (%)	-	36
Variación neta de lípidos (%)	-	- 69
Variación neta de Proteínas (%)	-	22

## 4. RESULTADOS

### 4.1.2. Distribución del tamaño de partícula en semillas después de la simulación del proceso mecánico de masticación de semillas de chía

Un método común para estudiar la granulometría en el bolo alimenticio es el tamizado manual utilizando varios tamices en un ambiente húmedo o seco (Mandalari et al., 2018; Woda et al., 2010). En el presente estudio, y previamente a someter las semillas de chía al proceso de digestión *in vitro*, se determinó mediante tamizado, la distribución de tamaños de partícula generados en un bolo de semillas de chía masticados por un adulto sano obteniéndose los resultados mostrados en la **Tabla 4.2**. En base a este resultado, los experimentos de digestión *in vitro* con semillas de chía se llevaron a cabo en muestras parcialmente molidas y tamizadas con una distribución de tamaños equivalente a la obtenida *in vivo*.

**Tabla 4.2.** Distribución de tamaños de partícula (%) de semillas de chía obtenidos en la etapa de desestructuración previa a la digestión *in vitro*.

Tamaño partículas de semillas de chía ( $\mu\text{m}$ )	Distribución de tamaño de semillas de chía (%)
T > 1000 (enteras)	70 $\pm$ 2
700 < T < 1000	21.68 $\pm$ 1.07
500 < T < 700	4.4 $\pm$ 0.9
125 < T < 500	4.7 $\pm$ 1.3

Tal y como era posible observar, la desestructuración de las semillas de chía fue dificultosa lo que se refleja en el elevado porcentaje de las mismas (70%) que presentaron integridad física tras el proceso de desestructuración. Por otro lado, del

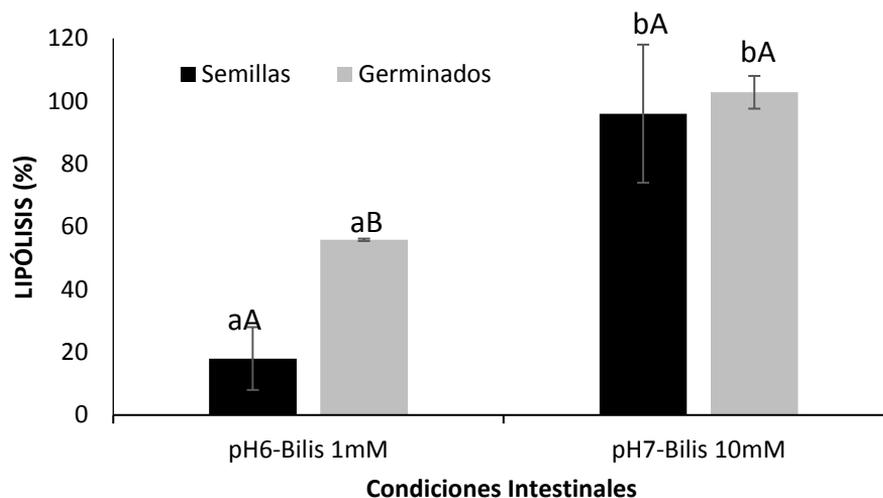
restante 30% correspondientes a aquellas desestructuradas, casi la totalidad de las mismas presentaron un tamaño de partícula entre 700 y 1000  $\mu\text{m}$ . La distribución de tamaños es uno de los factores que en gran medida condicionará la digestibilidad y bioaccesibilidad de nutrientes. De igual manera, resulta útil para estandarizar el proceso de desestructuración previo a la digestión.

#### 4.1.3. Influencia de la germinación y de las condiciones intestinales en la digestibilidad lipídica de la chía

Es importante mencionar, que tal y como era de esperar, la digestibilidad lipídica fue nula (valores de lipólisis igual a 0) en los digeridos de semillas enteras. Este resultado confirma la inalterabilidad e impermeabilidad del pericarpio de las semillas durante el proceso de digestión gástrica e intestinal (Inglett et al., 2014). Puede decirse por tanto, que la ingesta de semillas enteras aporta únicamente los beneficios derivados del mucílago, cuya hidratación y gelificación permite un incremento de volumen de las semillas aumentando la sensación de saciedad. La digestibilidad de lípidos saludables de semilla de chía exige por tanto, algún tipo de procesado previo a su consumo o incorporación como ingrediente en otras matrices alimentarias. La **Figura 4.2** recoge los porcentajes de extensión de la lipólisis obtenidos tras la digestión de partículas de semillas (con una distribución de tamaños  $700 > T > 125$  según **Tabla 4.2**) y germinados de chía en condiciones intestinales estándar (pH 7 y concentración biliar 10 mM) y en condiciones de insuficiencia pancreática exocrina (pH 6 y concentración biliar 1 mM). Los resultados muestran una mayor desviación estándar en los digeridos de semillas que en los germinados probablemente debido a que resulta difícil controlar la rotura de las semillas de manera reproducible. Por otro lado, resaltar que únicamente el 30.78% de las semillas se parten y subdividen, de manera que su interior queda accesible a la penetración de los fluidos de la digestión y a una mayor difusión de las enzimas digestivas. Este rango de tamaños de partícula puede generar

#### 4. RESULTADOS

variaciones entre las muestras digeridas lo que se refleja en la elevada desviación estándar de los resultados de lipólisis en semillas.



**Figura 4.2.** Extensión de la lipólisis (%) en semillas y germinados de chíá sometidos a digestión *in vitro* en condiciones intestinales subóptimas de fibrosis quística (pH 6 y concentración biliar 1 mM) y adulto sano (pH 7 y concentración biliar 10mM con dosis de suplemento enzimático 2000 UL g grasa).

Letras en minúscula: relacionan las diferencias estadísticas obtenidos entre cada condición intestinal para cada chíá (semillas y germinadas). Letras mayúsculas: relacionan las diferencias significativas entre semillas y germinados en cada condición.

En cuanto al efecto de las condiciones intestinales, pH del medio y concentración biliar, sobre la lipólisis, éstas presentaron una influencia significativa en la extensión de la lipólisis tanto en semillas como en germinados, aunque en mayor medida en semillas. Así, en condiciones estándar de adulto sano (pH 7 y concentración biliar de 10 mM), se alcanzaron valores muy superiores de extensión de la lipólisis, pero similares en semillas y germinados, que en condiciones intestinales subóptimas propias de insuficiencia pancreática exocrina (pH 6 y concentración biliar 1 mM). En estas últimas condiciones, en cambio, la extensión de la lipólisis fue mayor en germinados que en semillas. Durante la germinación, tiene lugar una generación de ácidos grasos libres como consecuencia de la actividad lipasa endógena. Si bien es cierto que a medida que éstos son generados son metabolizados en el ciclo de Krebs,

una cierta cantidad residual de los mismos se acumula en la planta. Por tanto, estos ácidos grasos con efecto emulsificante, conjuntamente con la lipasa endógena y la reducción de la actividad inhibitoria lipasa que tiene lugar durante la germinación (Armand et al., 1996) podrían estar potenciando la digestibilidad lipídica en la etapa intestinal. Este fenómeno parece ser más relevante en condiciones intestinales subóptimas de pH 6 y baja concentración biliar que en condiciones óptimas de pH 7 y concentración biliar 10 mM. Así, se puede concluir que si bien en condiciones intestinales estándar no se obtuvieron diferencias de digestibilidad lipídica entre semillas y germinados, en condiciones subóptimas las diferencias son significativas, siendo los lípidos de los germinados más eficientemente digeridos que los lípidos de las semillas. Aun así y teniendo en cuenta la diferente concentración de lípidos en semillas y germinados, 32 y 10 % respectivamente, en individuos con fibrosis quística la ingesta de semillas groseramente desestructuradas resultaría en un aporte similar de ácidos grasos que la ingesta de germinados. En cambio, en condiciones no alteradas de pH intestinal y concentración biliar estándares, la ingesta de las semillas desestructuradas sí conllevaría un aporte total de ácidos grasos libres, superior al de los germinados.

#### 4.1.4. Influencia de las condiciones intestinales en la bioaccesibilidad de fenoles totales y en la capacidad antioxidante de los digeridos de semillas y germinados de chía.

Cualquier compuesto bioactivo puede considerarse potencialmente efectivo para la salud humana, solo si se mantiene bioaccesible tras las fases involucradas en la digestión gastrointestinal (Rein, Renouf, Cruz-Hernandez, Actis-Goretta, Thakkar, & da Silva Pinto, 2013). La literatura científica contiene contribuciones relacionadas con el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de las semillas de chía. Sin embargo, son escasos los estudios que abordan los cambios experimentados

#### 4. RESULTADOS

por los compuestos fenólicos de las semillas o germinados de chía durante la digestión gastrointestinal, y en ningún caso bajo condiciones intestinales alteradas.

La **Tabla 4.3** muestra los resultados de polifenoles totales y capacidad antioxidante obtenidos en los digeridos de semillas y germinados, tanto en condiciones estándares como en condiciones subóptimo como las que se dan en la insuficiencia pancreática exocrina.

**Tabla 4.3.** Valores de polifenoles totales (mg ácido gálico (AG) eq./g materia seca) y capacidad antioxidante (mg TROLOX eq./g materia seca) analizados en semillas y germinados de chía tras la digestión gastrointestinal. Condiciones intestinales de fibrosis quística (pH 6 y concentración biliar 1 mM) y estándares de adulto sano (pH 7 y concentración biliar 10 mM) con dosis de suplemento enzimático 2000 UL/ g grasa. Valores de bioaccesibilidad (%) de compuesto fenólicos entre paréntesis.

FENOLES TOTALES		
mg AG eq./g materia seca		
	SEMILLAS	GERMINADOS
<b>INICIAL</b>	2.48 ±0.03bA	2.87 ±0.06aB
<b>pH7- Bilis 10 mM</b>	1.7 ±0.2 aA (68.6 ±0.8)	4.39 ±0.5 cB (153 ± 3)
<b>pH6 -Bilis 1 mM</b>	1.9 ±0.2aA (75.08 ±0.96)	3.52 ±0.17bB (123 ±3)
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE		
mg TROLOX eq./g materia seca		
	SEMILLAS	GERMINADAS
<b>INICIAL</b>	4.49 ±0.12cA	6.3 ±1.7cA
<b>pH7- Bilis 10 mM</b>	1.17 ±0.07bA	4.53 ±1.14 bB
<b>pH6 -Bilis 1 mM</b>	1.06 ±0.09aA	2.9 ±0.7aB

Letras en minúscula: relacionan las diferencias estadísticas obtenidos en cada análisis (Fenoles Totales y capacidad antioxidante) comparando los valores iniciales y las dos condiciones intestinales. Letras mayúsculas: relacionan las diferencias significativas entre semillas y germinados en cada condición (inicial, pH6 -Bilis 1 mM, pH7- Bilis 10 mM).

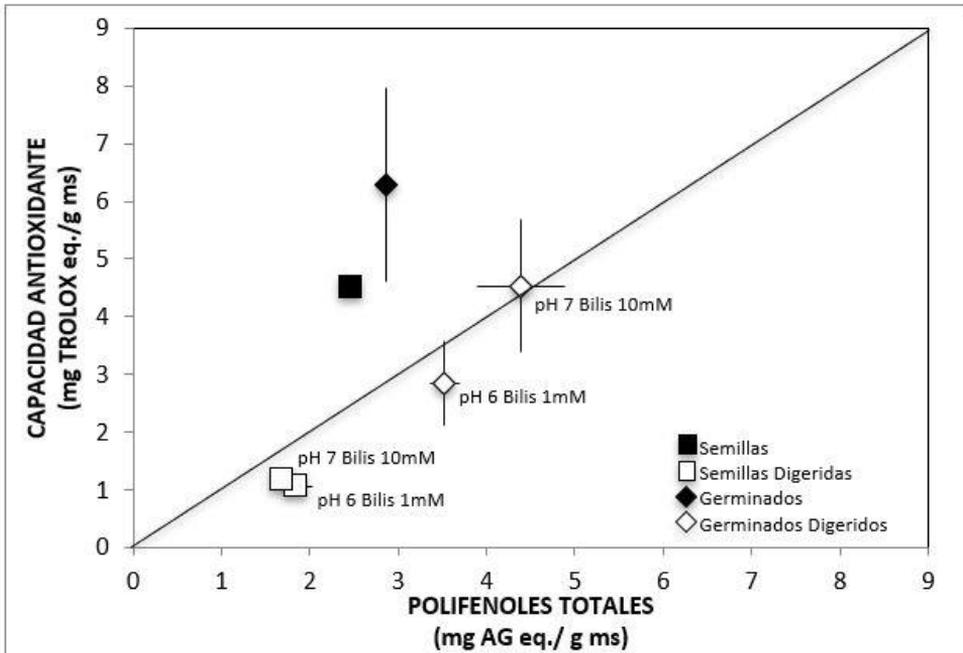
En relación a los cambios experimentados por los compuestos fenólicos durante la digestión y a la influencia de las condiciones intestinales sobre estos compuestos (**Tabla 4.3**), se registró un aumento en el contenido de polifenoles en los germinados digeridos, con respecto al contenido inicial, como consecuencia de su liberación de la matriz y solubilización favorecida por las condiciones gastrointestinales (Tagliazucchi,

Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010). En el caso de las semillas digeridas, se produjo, en cambio, una disminución, lo que se refleja en una menor bioaccesibilidad de estos compuestos en comparación con los germinados (**Tabla 4.3**). Este hecho coincide con la afirmación de que los nutrientes de los germinados suelen ser más bioaccesibles y biodisponibles en comparación con las semillas latentes (Pająk et al., 2019). De igual forma, Lucas-Gonzalez et al. (2016), obtuvieron un bajo grado de recuperación de los fenoles totales en extractos de bayas de Maqui después de la etapa intestinal. Las condiciones de pH y concentración biliar resultaron clave en la liberación y solubilización de estos antioxidantes únicamente en la digestión de los germinados, obteniéndose una mayor bioaccesibilidad en condiciones estándares de adulto sano frente a condiciones de insuficiencia pancreática exocrina (IPE) tal y como muestran los valores de bioaccesibilidad calculados. Por otro lado, se observa una interacción negativa del contenido graso sobre la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de forma que a mayor contenido en grasa, menor bioaccesibilidad de estos compuestos. Así, el menor contenido lipídico de los germinados en comparación con las semillas, podría ser en parte responsable de la mayor bioaccesibilidad en germinados que en semillas. Al parecer un mayor contenido de grasa en el producto, como ocurre en las semillas, favorecería la estabilidad y retención de los compuestos fenólicos, reduciendo su bioaccesibilidad final. Este hecho, ha sido observado por Ortega et al., (2009) en licor de cacao. De igual forma, el alto contenido en fibra en las semillas (Reyes-Caudillo et al., 2008) podría ser también responsable de la menor bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos. Argyri, Komaitis, & Kapsokefalou (2006) y Saura-Calixto, Serrano, & Goñi (2006) obtuvieron que la solubilidad y la disponibilidad de los compuestos fenólicos están influenciados por el pH y la interacción con otros componentes dietéticos, como el hierro, la fibra o las proteínas. Las interacciones entre los compuestos fenólicos y otros constituyentes favorecen la formación de complejos de baja solubilidad y elevado peso molecular, causando una reducción en la concentración de compuestos fenólicos (Rodríguez-Roque, Rojas-

#### 4. RESULTADOS

Graü, Elez-Martínez, & Martín-Belloso, 2013), y en su absorción intestinal conforme aumenta su peso molecular (Scalbert, & Williamson (2000).

En cuanto a los cambios experimentados por la capacidad antioxidante durante la digestión, ésta disminuye tanto en semillas como germinados, siendo mayor, sin embargo, en condiciones de individuo sano que en condiciones de IPE. Este hecho podría estar relacionado con que en el presente estudio solo se ha considerado para la determinación de la actividad antioxidante, aquella fracción de compuestos bioactivos presentes en la fase líquida del digerido, pero no en la fase sólida no digerida. Así, en la fase sólida no digerida podrían quedar retenidas una cantidad importante de especies químicas de carácter antioxidante no bioaccesibles, ni potencialmente absorbibles, al menos en las condiciones ensayadas. En cambio, en el estudio de Pellegrini et al. (2018), se obtuvo un aumento de la capacidad antioxidante de semillas de chía tras la etapa intestinal, asumiendo la totalidad de compuestos presentes en todo el digerido (fase líquida y sólida). Por último, cabe destacar que la capacidad antioxidante y contenido fenólico de los digeridos presentaron una buena correlación, (**Figura 4.3.**) de forma que, la capacidad antioxidante de la fracción bioaccesible podría ser atribuida fundamentalmente a los compuestos fenólicos presentes en dicha fracción (Pellegrini et al. 2018). Por otro lado, la **Figura 4.3** también muestra que la capacidad antioxidante puede estar atribuida a otras sustancias antioxidantes, además de a los compuestos fenólicos, presentes en semillas y germinados no digeridos ya que en esos casos no existe una buena correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido en compuestos fenólicos.



**Figura 4.3.** Correlación entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los digeridos de semillas y germinados de chíá, así como de las muestras no digeridas.

### 4.1.5. Conclusiones

En relación a los resultados obtenidos en este capítulo, se puede concluir que el proceso de germinación de semillas de chía, disminuyó el contenido en lípidos y aumentó el de proteínas, y su capacidad antioxidante, en comparación con las semillas.

En base a los resultados obtenidos, el proceso de germinación mejora la digestibilidad lipídica en comparación con las semillas latentes, en especial en condiciones intestinales subóptimas de insuficiencia pancreática exocrina.

Los compuestos fenólicos de la chía son más bioaccesibles en el producto germinado que en las semillas, si bien la capacidad antioxidante de la fracción bioaccesible disminuyó en ambos casos en comparación a las muestras no digeridas. Existe, sin embargo, una correlación lineal entre el contenido en compuestos fenólicos de la fracción bioaccesible y su capacidad antioxidante de los digeridos. En este sentido, podría resultar interesante llevar a cabo un estudio de identificación de compuestos fenólicos, y de otras especies antioxidantes en las semillas de chía, y sus germinados, antes y después de la digestión gastrointestinal en condiciones intestinales variables.

Por último, los resultados muestran que el germinado, así como otros procesos y tratamientos de las semillas, pueden modular la digestibilidad y bioaccesibilidad de macro y micronutrientes, por lo que su impacto ha de ser evaluado para obtener información sobre los beneficios derivados de la ingesta de semillas de chía y sus derivados.

## **4.2 Influencia del tamaño de partícula y de las condiciones intestinales en la digestibilidad *in vitro* de lípidos y proteínas en nueces y cacahuetes**

Paz-Yépez, C., Peinado, I., Heredia, A., & Andrés, A. (2019a). Influence of particle size and intestinal conditions on in vitro lipid and protein digestibility of walnuts and peanuts. *Food Research International*, *119*, 951–959.



Son numerosos los estudios epidemiológicos que establecen la relación entre la ingesta regular de frutos secos y la reducción en la incidencia de enfermedades coronarias (Kris-Etherton, Hu, Ros, & Sabaté, 2008) y ciertos tipos de cáncer como de próstata (Jain, Hislop, Howe, & Ghadirian, 1999) o colon rectal (Yeh, You, Chen, & Sung, 2006). Asimismo, los últimos estudios científicos asocian positivamente la ingesta de nueces con una mejora de la función cognitiva en personas de edad avanzada (O'Brien et al., 2014).

Hay diferentes tipos de frutos secos. Las nueces (*Juglans regia*) se consideran uno de los frutos secos de árbol comestible más populares, junto con las almendras (*Prunus amygdalis*), las avellanas (*Corylus avellana*) y los pistachos (*Pistachia vera*). Los cacahuetes (*Arachis hypogaea*) son botánicamente leguminosas, pero se identifican ampliamente como parte del grupo de frutos secos ya que su perfil nutricional es comparable al de estos (Griel & Eissenstat, Juturu, Hsieh, Kris-Etherton, 2004).

Los frutos secos son ricos en energía debido a su alto contenido en proteínas y lípidos. Su perfil de ácidos grasos se caracteriza por un predominio de ácidos insaturados. Los principales ácidos grasos que se encuentran en el aceite de nuez son los ácidos oleico (18: 1 n-9), linoleico (18: 2 n-6) y linolénico (18: 3 n-3) (Zwarts, Savage, & McNeil, 1999). Los ácidos oleico (18: 1v 9) y linoleico (C18: 2v6) representan el 80% de los ácidos grasos de los cacahuetes; el ácido palmítico (16: 0) representa entre un 5 y 10% del contenido total de ácidos grasos; y los ácidos esteárico (18: 0), araquídico (20: 0), eicosenoico (20: 1v9), behénico (22: 0) y lignocérico (24:0) representan entre 1 y 3% del perfil total (Andersen, Hill, Gorbet, & Brodbeck, 1998; Ozcan & Seven, 2003). Al mismo tiempo, los frutos secos se consideran alimentos nutricionalmente densos ya que proporcionan fibra dietética, vitaminas (por ejemplo ácido fólico, niacina y vitaminas E y B6), minerales (por ejemplo, cobre, magnesio, potasio, zinc) y muchos otros compuestos bioactivos (Dreher, Maher, & Kearney, 1996). A pesar del contenido lipídico de los frutos secos (entre 50 y 55%), un ensayo de meta-análisis aleatorio controlado indicó que su consumo no produce un aumento del peso

#### 4. RESULTADOS

corporal o del índice de masa corporal (Flores-Mateo, Rojas-Rueda, Basora, Ros, & Salas-Salvadó, 2013). Uno de los motivos atribuibles a este hecho podría ser la inaccesibilidad de los lípidos por parte de los enzimas digestivos por el bajo grado de desestructuración de la matriz alcanzado durante la digestión (Hollis & Mattes, 2007). En este sentido Novotny, Gebauer, & Baer (2012) indicaron que solo el 76% de la energía de las almendras se metaboliza debido a que las paredes celulares intactas protegen los lípidos encapsulados durante su paso a través del tracto gastrointestinal (Ellis et al., 2004; Mandalari et al., 2008). Es por esto que la masticación es un factor clave que determina la naturaleza y el grado de fractura celular, y por tanto la digestibilidad de los lípidos. Algunos estudios indican que la desestructuración en fase oral de nueces enteras conduce a una liberación del 8-11% de las gotas de aceite, aumentando así la lipólisis (Mandalari et al., 2014).

Las proteínas en la saliva humana (mucinas) son responsables de la floculación de algunas emulsiones, según el tiempo de residencia en la boca (Gallier & Singh, 2012). En el estómago, el proceso enzimático principal que sufren las almendras es la proteólisis (38%) (Mandalari et al., 2008), mientras que la lipólisis ocurre principalmente en el duodeno y es altamente dependiente de las condiciones intestinales (pH, pancreatina y secreciones biliares). El cambio abrupto de pH cuando el quimo pasa a través del píloro provoca cambios en las propiedades físico-químicas de los lípidos. Principalmente, los lípidos se ionizan parcialmente y contribuyen al proceso de emulsificación (Hernell et al., 1990). Simultáneamente, los lípidos biliares excretados por la vesícula biliar en forma de micelas mixtas se diluyen rápidamente en el medio y juegan un papel fundamental en la digestión y absorción intestinal de los lípidos de la dieta y las vitaminas liposolubles. Además, las sales biliares presentan una alta capacidad para solubilizar los fosfolípidos y los productos de la lipólisis pancreática (Reis, Holmberg, Watzke, Leser, & Miller, 2009). En consecuencia, cuando las condiciones intestinales son subóptimas, como es el caso de algunos individuos con patologías crónicas, la hidrólisis intestinal de las proteínas, y especialmente de las

grasas, puede verse comprometida. Este es el caso de individuos que sufren de insuficiencia pancreática exocrina, como ya se ha descrito en la sección introductoria de esta tesis.

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar, mediante un modelo de digestión *in vitro*, el impacto que el tamaño de partícula generado en la digestión oral, el pH intestinal, la concentración biliar y la concentración de enzimas pancreáticas tienen sobre el índice de degradación de la matriz, la proteólisis y la lipólisis de nueces y cacahuets. El esquema del plan experimental se presenta a continuación (**Figura 4.4**).

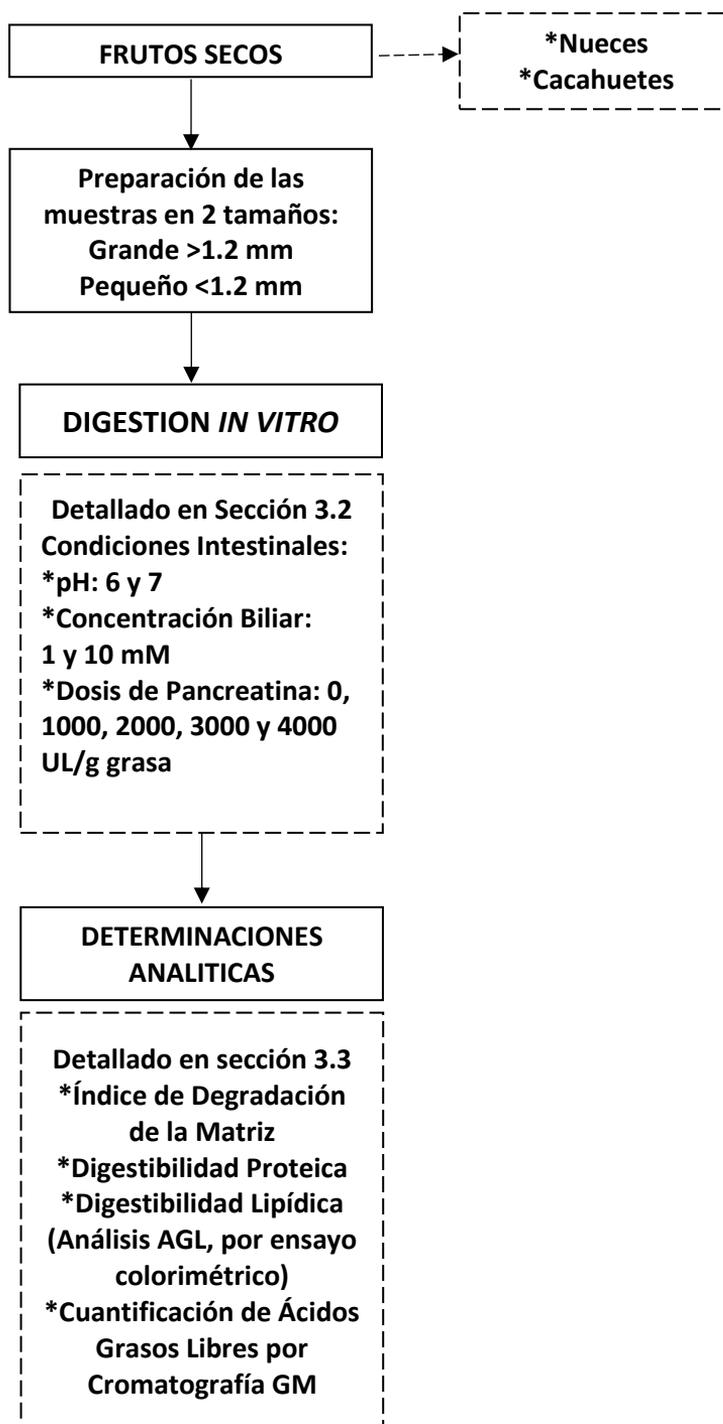


Figura 4.4. Esquema del desarrollo del plan experimental de frutos secos

#### 4.2.1 Influencia de las condiciones intestinales del individuo y del tamaño de partícula sobre el índice de degradación de la matriz.

La **Tabla 4.4** muestra el efecto estadístico del pH intestinal, la concentración biliar, el tamaño de partícula y sus interacciones sobre el Índice de Degradación de la Matriz (IDM (%)) de nueces y cacahuets digeridos a una concentración fija de pancreatina de 2000 UL / g de grasa. Como se puede observar, el tamaño de partícula fue la variable con el mayor efecto sobre el IDM de nueces y cacahuets. Cabe recordar que se digirieron frutos secos de tamaño de partícula “grande” (>1.2 mm) y “pequeños” (<1.2 mm).

**Tabla 4.4.** F-ratio y significancia estadística obtenido del análisis ANOVA factorial para el índice de degradación de la matriz. Los factores para el análisis fueron: pH, concentración biliar, tamaño de partícula, y su interacción.

EFECTOS Y SUS INTERACCIONES	Índice de Degradación de la Matriz (%)	
	NUECES	CACAHUETES
pH	1.37 ns	13.64**
Bilis	0.04 ns	3.85 ns
Tamaño de partícula	1554.79***	3138.39***
pH-Bilis	0.69 ns	2.59 ns
pH-Tamaño de partícula	4.28 ns	2.00 ns
Bilis-Tamaño de partícula	0.34ns	0.62 ns
pH-Bilis-Tamaño de partícula	0.01ns	2.05 ns

ns: diferencias no-estadísticas ( $p > 0.05$ ). \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ . \*\*\*  $p < 0.001$ .

La **Tabla 4.5** muestra el Índice de Degradación de la Matriz (IDM (%)) de las nueces y cacahuets correspondientes a dos tamaños de partícula distintos, digeridos en diferentes condiciones de pH y concentración biliar y a una concentración de enzima

#### 4. RESULTADOS

pancreática fija de 2000 UL / g de grasa (valor promedio recomendado para EPI) (Turck et al., 2016). También se incluyen los resultados de IDM obtenidos a distintas concentraciones de pancreatina (0-4000 UL / g de grasa), en condiciones intestinales fijas de pH 6 y concentración biliar 1 mM.

**Tabla 4.5.** Índice de degradación de la matriz (IDM (%)) tras la digestión *in vitro* a diferentes condiciones intestinales pH (6 o 7), concentración biliar (1 o 10 mM) y dosis de pancreatina (0-4000 UL/g grasa) de nueces y cacahuets con dos tamaños de partículas (grande o pequeño).

Condiciones Intestinales			IDM (%)			
Pancreatina (UL/g grasa)	pH	Concentra ción biliar (mM)	Nueces Grandes (>1.2 mm)	Nueces pequeñas (<1.2mm)	Cacahuets grandes (>1.2 mm)	Cacahuets pequeños (<1.2mm)
2000	6	1	36 ± 2(c)(B)	86 ± 7(a)(D)	25 ± 3(a)(A)	69 ± 2(a)(C)
	6	10	35.2 ± 1.5(bc)(B)	84 ± 3(a)(D)	25.9 ± 1.2(a)(A)	74.046 ± 1.114(b)(C)
	7	1	30.5 ± 0.2(a)(B)	86.3 ± 0.5(a)(D)	26.816 ± 1.007(a)(A)	76 ± 2(b)(C)
	7	10	32.20 ± 1.15(ab)(B)	86.2 ± 0.4(a)(D)	27.7 ± 1.3(a)(A)	76 ± 2(b)(C)
0			30 ± 9(a)(A)	63 ± 3(a)(B)	19 ± 4(a)(A)	52 ± 7(a)(B)
1000			35.9 ± 0.4(a)(B)	72 ± 4(ab)(C)	26.7 ± 1.5(a)(A)	71.2 ± 1.5(b)(C)
2000	6	1	36 ± 2(a)(B)	86 ± 7(c)(D)	25 ± 3(a)(A)	69 ± 2(b)(C)
3000			36.0 ± 1.3(a)(A)	71 ± 7(ab)(B)	27 ± 6(a)(A)	71 ± 4(b)(B)
4000			33 ± 2(a)(A)	82 ± 6(bc)(B)	26.8 ± 0.9(a)(A)	81 ± 9(b)(B)

Letras a-c se refieren a los grupos homogéneos obtenidos de la aplicación de ANOVA a los datos en las mismas columnas y provee información acerca del efecto de la concentración de pancreatina o de pH-concentración biliar en el IDM (%). Letras A-D se refieren a los grupos homogéneos obtenidos del ANOVA comparando los datos en la misma fila, provee información relacionada con el efecto del tamaño de partícula y del tipo de fruto seco, sobre el IDM (%) (p-value<0.05).

## 4. RESULTADOS

Así, el IDM osciló entre el 19 y el 36% (valores promedio) en los frutos secos de mayor tamaño de partícula (que simularían las partículas de frutos secos tras una masticación leve); mientras que este parámetro alcanzó el 52-86% (valor promedio) en muestras de partículas pequeñas (que simulan una masticación más intensa). Cabe señalar que el valor mínimo de los intervalos antes mencionados de IDM se observó en los cacahuets y el valor máximo en las nueces. Estos resultados confirmaron que la masticación es un factor clave que determina la degradación de la matriz durante la digestión en este tipo de productos. La primera transformación física de los alimentos durante la ingesta ocurre en la boca, produciendo superficies fracturadas con algunas células parenquimáticas rotas y partículas de menor tamaño. Este fenómeno aumenta el área de la superficie de contacto de los nutrientes intracelulares con los fluidos digestivos y aumentando por tanto su disponibilidad para la hidrólisis enzimática; en definitiva puede decirse que la desestructuración de la matriz alimentaria mejora la eficiencia general de la digestión (cuanto mayor es el IDM, mayor es la digestibilidad de las proteínas y los lípidos) y la absorción gastrointestinal de nutrientes (Mandalari, Faulks, Rich, Lo Turco, Picout, Lo Curto, & Ellis, 2008; Parada & Aguilera, 2007). Además del tamaño de partícula generado durante la masticación, la degradación de la matriz durante la digestión depende de su composición y otros factores como la naturaleza de los enlaces y la permeabilidad de la matriz a moléculas pequeñas, la dureza, la cohesión y la elasticidad (Lamothe et al., 2012).

### 4.2.2 Influencia de las condiciones intestinales y del tamaño de partícula de los frutos secos en la digestibilidad de las proteínas

La proteína de la nuez es altamente digerible y tiene un buen equilibrio de aminoácidos esenciales, siendo las glutelinas ( $\approx 70\%$ ) la fracción proteica principal seguidas de las globulinas ( $\approx 18\%$ ), las albúminas ( $\approx 7\%$ ) y las prolaminas ( $\approx 5\%$ ) (Sze-Tao & Sathe, 2000). Los cacahuets son en realidad una leguminosa y su contenido en

proteína es mayor que cualquier otro fruto seco. Las proteínas de los cacahuets se han clasificado habitualmente como albúminas o globulinas; las globulinas representan en este caso el 87% de la proteína total y están compuestas por dos proteínas principales, la araquina y la conaraqhina (Arya, Salve, & Chauhan, 2016). En este estudio, para caracterizar la digestibilidad de la proteína se utilizaron dos parámetros: la densidad óptica máxima (OD<sub>max</sub>), que es un indicador indirecto de la extensión de la proteólisis máxima, y la pendiente inicial de la curva de evolución de la OD con el tiempo ( $\Delta OD / h$ ) relacionada con la velocidad inicial de la reacción proteolítica (Bax et al., 2012). En la **Tabla 4.6** se muestran los resultados del análisis estadístico y que ilustran el efecto del pH intestinal, de la concentración de sales biliares y del tamaño de partícula, así como sus interacciones, sobre los parámetros característicos de la proteólisis (OD<sub>max</sub> y  $\Delta OD / h$ ).

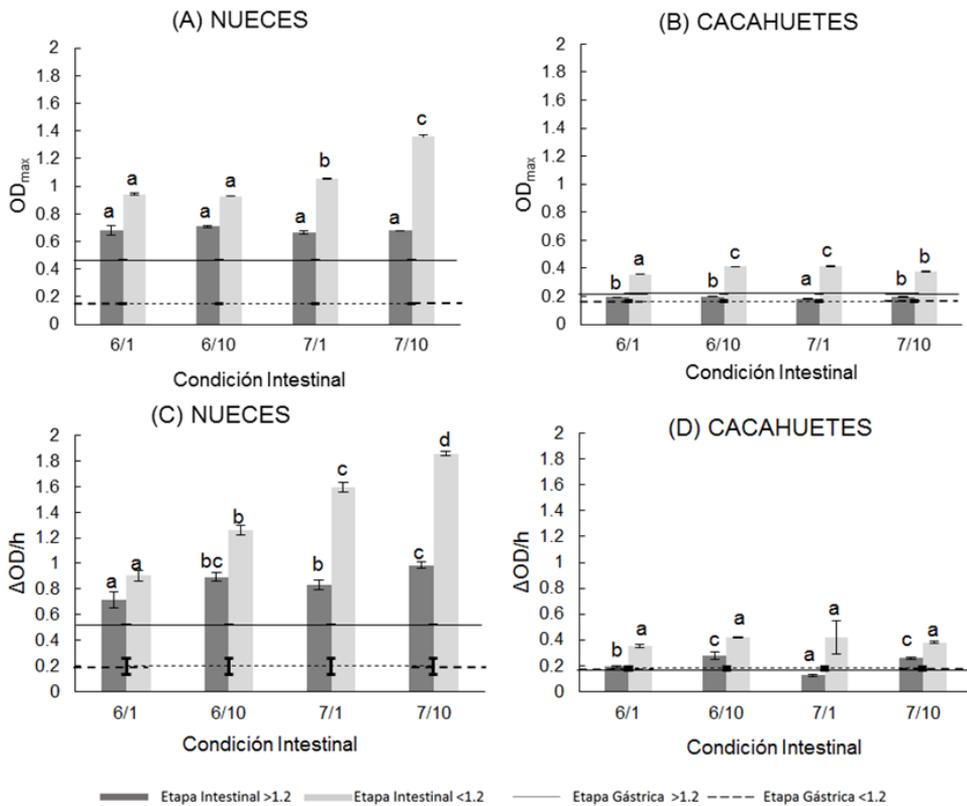
**Tabla 4.6.** F-ratio obtenido del análisis de ANOVA factorial de los parámetros de digestibilidad proteica (OD<sub>max</sub>, y pendiente inicial). Los factores del análisis fueron pH, concentración biliar, tamaño de partícula, y sus interacciones.

EFECTOS E INTERACCIONES	PROTEÓLISIS			
	NUECES		CACAHUETES	
	OD <sub>max</sub>	$\Delta OD/h$	OD <sub>max</sub>	$\Delta OD/h$
pH	214.63***	130.37***	5.00 ns	0.32 ns
Bilis	71.49***	20.21**	35.32***	6.53*
Tamaño de partícula	3674.20***	1279.06***	14540.68***	56.99***
pH-Bilis	56.87***	84.70***	155.07***	0.39 ns
pH-Tamaño de partícula	637.51***	460.31***	33.75***	1.48 ns
Bilis-Tamaño de partícula	165.19***	128.97***	0.29 ns	4.17 ns
pH-Bilis-Tamaño de partícula	254.30***	46.72***	251.55***	2.43 ns

ns: diferencias no-estadísticas ( $p > 0.05$ ). \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ . \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4. RESULTADOS

En las nueces, las tres variables analizadas (pH intestinal, concentración biliar y tamaño de partícula) influyeron significativamente en ambos parámetros de digestibilidad de la proteína, mientras que el pH intestinal no lo hizo en la proteólisis del cacahuete. En el caso de las nueces, las interacciones entre las variables de digestión también presentan una influencia significativa en la cinética (pendiente inicial) y en la proteólisis máxima esperada (ODmax). Sin embargo, en el cacahuete, la interacción pH-bilis-tamaño de partícula únicamente influyó de forma significativa en el valor de extensión máxima de la proteólisis (ODmax). Con respecto al efecto de las condiciones intestinales (**Figura 4.5**), la cinética ( $\Delta OD/h$ ) y la extensión máxima (ODmax) de la proteólisis en nueces de tamaño de partícula pequeño fueron los parámetros más afectados. Así, aumentó la hidrólisis enzimática conforme lo hizo tanto el de pH intestinal como la concentración biliar (**Figura 4.5**). Asimismo, la digestión proteica, en términos cinéticos, de los frutos secos de tamaño de partícula grande mejoró ligeramente en condiciones de adulto sano estándar (pH 7 y concentración biliar 10 mM) en comparación con los condiciones subóptimas de pH 6 y concentración biliar 1 mM (**Figura 4.5**).

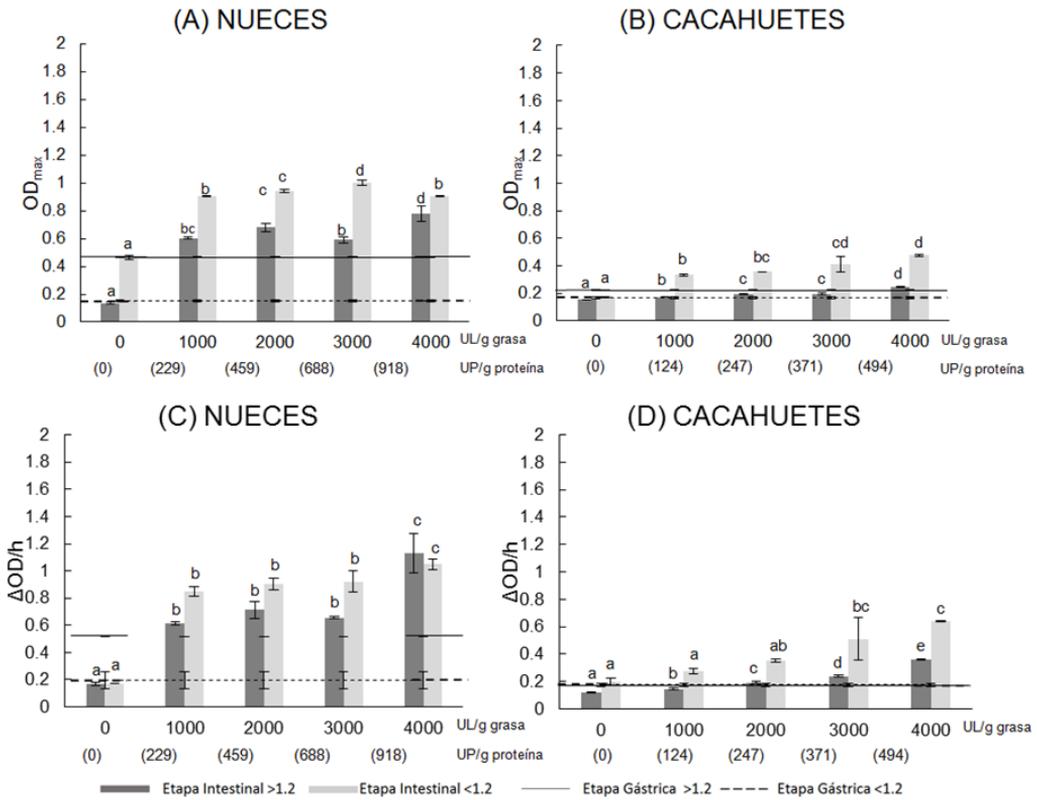


**Figura 4.5.** Parámetros de digestibilidad proteica ( $OD_{max}$  y  $\Delta OD/h$ ) de nueces y cacahuets con tamaño de partícula grande ( $> 1.2$  mm) y pequeño ( $< 1.2$  mm) digeridas a diferentes condiciones intestinales pH (6 o 7), concentración biliar (1 o 10 mM) usando una dosis fija de enzima pancreatina (2000 UL/ g grasa equivalentes a 459 UP/g proteína en nueces y 247 UP/g proteína en cacahuets).

Letras a-d se refiere a los grupos homogéneos obtenidos por el ANOVA aplicado a los datos de cada fruto seco con el mismo tamaño de partícula y proporciona información sobre el efecto de las condiciones intestinales (pH-concentración biliar) en los parámetros de digestibilidad de la proteína (p-valor  $< 0.05$ ). La línea indica el valor en la etapa gástrica para el tamaño de partículas  $< 1.2$  mm, la línea segmentada indica los valores en la etapa gástrica para el tamaño de partículas  $> 1.2$  mm, la barra oscura indica los valores en la etapa intestinal para el tamaño de partículas  $> 1.2$  mm, la barra clara indica valores en la etapa intestinal para partículas de tamaño  $< 1.2$  mm.

Por otro lado, la **Figura 4.6** muestra la proteólisis de ambos tipos de frutos secos digeridas a distintas concentraciones de pancreatina (0 a 4000 UL / g de grasa que son equivalentes a 0, 229, 459, 688, 918 UP / g de proteína en las nueces y 0,124, 247, 371, 494 UP / g de proteína en el cacahuete) y a pH intestinal de 6 y concentración biliar de 1 mM.

## 4. RESULTADOS



**Figura 4.6.** Parámetros de digestibilidad de proteínas ( $OD_{MAX}$  y pendiente inicial  $\Delta OD/h$ ) de nueces y cacahuets con tamaños de partícula grandes ( $> 1.2$  mm) y pequeños ( $<1.2$  mm) digeridos en condiciones intestinales de pH 6 y concentración biliar 1 mM, con diferentes dosis de pancreatina (0 -4000 UL / g de grasa equivalente a 0-229-459-688-918 UP / g de proteína en las nueces, y de 0-124-247-371-494 PU / g de proteína en el cacahuete). Las letras a-d se refieren a los grupos homogéneos obtenidos por el ANOVA aplicado a los datos de cada fruto seco del mismo tamaño y proporciona información sobre el efecto de la concentración de pancreatina en los parámetros de digestibilidad de la proteína ( $OD_{max}$  y pendiente inicial) (valor de  $p < 0.05$ ). La línea indica el valor en la etapa gástrica para el tamaño de partículas  $<1.2$  mm, la línea segmentada indica los valores en la etapa gástrica para el tamaño de partículas  $>1.2$  mm, la barra oscura indica los valores en la etapa intestinal para el tamaño de partícula  $>1.2$  mm, la barra clara indica valores en la etapa intestinal para partículas de tamaño  $<1.2$  mm.

Como se puede observar, independientemente de la dosis, la suplementación con pancreatina condujo a un aumento de tanto de la cinética como de la extensión máxima de la proteólisis, siendo más acusado su efecto en nueces que en cacahuets. Así, la simple suplementación con 129 o 224 UP/ g proteína (1000 UL/ g grasa) para cacahuets y nueces respectivamente, fue suficiente para mejorar la proteólisis; mientras que una dosis de 494 UP/ g proteína para cacahuets o de 918 UP/ g

proteína para nueces (4000 UL / g de grasa) fue necesaria para lograr un aumento significativo, con respecto a dosis inferiores, en ambos frutos secos. Por otro lado, es importante tener en cuenta que los parámetros de proteólisis mostrados en la **Figura 4.5**, no son directamente comparables debido a las diferentes unidades de proteasas por gramo de proteína utilizadas en los estudios de digestión de nueces (459 UP / g proteína) y cacahuets (247 UP / g proteína). A pesar de este hecho, la mayor afinidad de las proteasas a las proteínas de la nuez que a las de los cacahuets, queda confirmada de nuevo a los valores de la pendiente inicial ( $\Delta OD / h$ ) y la extensión potencial de la proteólisis (ODmax) para nueces y cacahuets en unidades de proteasas similares a través de la **Figura 4.6**. Concretamente, serían comparables los valores de los parámetros alcanzados a una dosis de 1000 UL / g grasa equivalente a 229 UP / g proteína en nueces y de 2000 UL / g grasa equivalente a 247 UP / g proteína en cacahuets. Las diferencias, en cuanto a la digestibilidad de las proteínas, observadas entre los dos tipos de frutos secos podrían deberse a su diferente composición aminoacídica. Los valores más bajos de proteólisis en el cacahuete también podrían estar relacionados con los cambios estructurales de proteínas que ocurren durante el tostado. Estudios previos indican que el tostado de cacahuete a 160 °C durante 30 min, afecta negativamente a la calidad de las proteínas y lípidos en los granos de cacahuete (Damame, Chavan, & Kadam, 1990). Tras un tostado por aire caliente, se observan daños significativos en la epidermis y el tejido celular, lo que resulta en una separación celular, la destrucción de la red endoplásmica, la alteración de los cuerpos proteicos y el aumento del tamaño de los cuerpos oleosos (Altan, McCarthy, Tikekar, McCarthy, & Nitin, 2011; Perren & Escher, 2013). La estructura nativa de las proteínas se desnaturaliza con un despliegue inicial de una molécula de proteína, la pérdida de la estructura secundaria y terciaria, la formación de interacciones covalentes y no covalentes intra y/o intermoleculares (Davis & Williams, 1998; Rahaman, Vasiljevic, & Ramchandran, 2016). El tratamiento térmico también puede alterar la susceptibilidad de las proteínas a la digestión gastrointestinal. Tras el

## 4. RESULTADOS

tostado, la proteína del cacahuete, como la Ara h1, forma polímeros compactos mediante interacciones hidrofóbicas. Esta agregación hace que la proteína sea inaccesible, en cierta medida, para las proteasas digestivas (Rahaman et al., 2016). Además, a partir de la comparación de los valores de las pendiente iniciales en la etapa gástrica (nueces > 1.2 mm = 0.196  $\Delta OD / h$  nueces <1.2mm = 0.521  $\Delta OD / h$ ; cacahuetes > 1.2mm = 0.178  $\Delta OD / h$  cacahuetes <1.2mm = 0.169  $\Delta OD / h$ ) y etapas intestinales (**Figura 4.5 y Figura 4.6**), es posible afirmar que la cinética de la proteólisis es más rápida en el intestino delgado que en el estómago, y especialmente en nueces. En base a estos resultados es posible afirmar que las proteínas de la nuez son más fácilmente digeribles que las de cacahuete bajo las mismas condiciones ensayadas. De igual forma, el tamaño de partícula modula tanto la velocidad ( $\Delta OD/h$ ) como la extensión máxima ( $OD_{max}$ ) de la proteólisis en frutos secos y especialmente en nueces (**Tabla 4.7**) (**Figuras 4.5 y 4.6**). Se puede evidenciar el impacto en la proteólisis con el mayor acceso de las enzimas proteolíticas a las proteínas favorecido por la gran área de superficie en las muestras con tamaño de partícula pequeño. Las partículas más pequeñas maximizan la exposición de la superficie de la proteína a zonas hidrófilas, promoviendo así el acceso de las enzimas a los sitios de unión. Las enzimas proteolíticas, la pepsina en el estómago y la tripsina en el duodeno, se unen a aminoácidos aromáticos hidrófobos como la alanina, leucina, isoleucina, prolina y valina, que son predominantes en la composición de los frutos secos y especialmente en nueces (Sze-Tao & Sathe, 2000).

### 4.2.3 Influencia de las condiciones intestinales y del tamaño de partícula de las nueces sobre la digestibilidad lipídica

En los frutos secos, los lípidos son el principal componente de almacenamiento y la mayor proporción de energía disponible, que comprende aproximadamente el 50% del peso total del grano y se encuentra en cuerpos de aceite intracelulares en forma

de triacilglicerol (TAG) (Ellis et al., 2004). Los cuerpos oleosos tienen un diámetro promedio de 2-3  $\mu\text{m}$ , aproximadamente, y están rodeados por una sola capa de fosfolípidos en los que se encuentran incrustadas proteínas, principalmente oleosinas (Beisson, Ferté, Vouloury, & Arondel, 2001). El mecanismo por el cual se liberan los lípidos intracelulares, y otros nutrientes, dependerá de las propiedades fisicoquímicas del tejido del fruto seco en la luz intestinal. Por lo tanto, un factor crítico será si las paredes celulares se rompen durante el procesamiento oral (masticación) y el tránsito adicional a lo largo del tracto gastrointestinal (Ellis et al., 2004; Guo et al., 2017). El presente estudio analizó el efecto de la masticación (tamaño de partícula) y las condiciones intestinales (pH, bilis y concentración de pancreatina) en la extensión de la lipólisis lograda después de la digestión *in vitro* de cacahuets y nueces. La **Tabla 4.7** muestra el efecto estadístico del pH, la concentración biliar, el tamaño de las partículas y sus interacciones en la lipólisis (mg de AGL / g de grasa) de nueces y cacahuets digeridos a una concentración fija de pancreatina de 2000 UL / g de grasa. El pH y el tamaño de partícula, y su interacción, fueron las variables con el mayor efecto en la digestión de los lípidos del cacahuete, mientras que solo el pH intestinal pareció influir en la hidrólisis de la grasa en nueces. Así, una reducción en el tamaño de partícula en cacahuets fue esencial para lograr una mejora significativa de la lipólisis en cualquier de las condiciones intestinales ensayadas.

#### 4. RESULTADOS

**Tabla 4.7.** F-ratio y significancia estadística obtenidos del ANOVA factorial aplicado a la lipólisis (mg Ácidos Grasos Libres (AGL)/g grasa) alcanzada en nueces y cacahuets digeridos. Los factores para el análisis fueron pH, concentración biliar, tamaño de partícula, y su interacción.

EFECTOS E INTERACCIONES	Lipólisis	
	(mg AGL/ g grasa)	
	NUECES	CACAHUETES
pH	16.73**	130.09***
Bilis	0.01ns	0.01 ns
Tamaño de partícula	0.18 ns	431.81***
pH-Bilis	13.51**	8.96*
pH-Tamaño de partícula	0.01 ns	115.15***
Bilis-Tamaño de partícula	0.01 ns	8.74*
pH-Bilis-Tamaño de partícula	0.03 ns	0.05 ns

ns: diferencias no estadísticas ( $p > 0.05$ ). \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ . \*\*\*  $p < 0.001$ .

La mayor concentración de ácidos grasos libres (AGL) por gramo de grasa registrada en cacahuets digeridos de tamaño de partícula pequeño, en comparación con los de mayor tamaño (**Tabla 4.9**), puede ser atribuida al mayor número de células de ruptura y, por lo tanto, a un aumento en la bioaccesibilidad de los lípidos (Ellis et al., 2004; Grassby et al., 2014; Grundy, Wilde, Butterworth, Gray, & Ellis, 2015; Mandalari et al., 2014). De hecho, los valores de lipólisis en cacahuete con tamaño de partícula grande fueron los menores de entre todos los obtenidos en los frutos secos digeridos, incluso en condiciones estándares de pH y concentración biliar (7/10). Aparentemente, las paredes celulares que se mantienen intactas tras la masticación podrían reducir significativamente la velocidad y la extensión de la lipólisis durante la digestión en semillas leguminosas (Edwards, Warren, Milligan, Butterworth y Ellis, 2014; Tovar, De Francisco, Bjork, & Asp, 1991). Un estudio *in vivo* en humanos sometidos a una dieta suplementada con cacahuets durante 6 días apoya esta

afirmación al evidenciar que los lípidos no digeridos son transportados a los sitios más distales del tracto gastrointestinal para finalmente ser excretados (Levine, 1980). De manera similar, estudios más recientes indicaron que cantidades significativas de lípidos eran excretadas por sujetos que seguían dietas ricas en almendras y nueces (Sabaté, 2003). Sin embargo, los resultados de esta tesis doctoral muestran que existen diferencias significativas en cuanto a la digestibilidad de los lípidos, y también de proteínas, en función del tipo de fruto seco y de su procesado, siendo más efectiva en nueces crudas que en cacahuets tostados. De hecho, diferencias importantes se han registrado en cuanto a la lipólisis de almendra cruda y tostada, donde la distribución de lípidos es desigual debido a la coalescencia parcial de los lípidos inducida por el calor (Mandalari et al., 2014). Paralelamente, es posible que el proceso de tostado resulte en un aumento de la porosidad de la pared celular, lo que permite un mayor acceso de los fluidos digestivos, pero sin un aumento de la lipólisis intracelular debido a la presencia de lípidos fusionados (es decir, baja relación área de superficie: volumen) (Grundy et al., 2015).

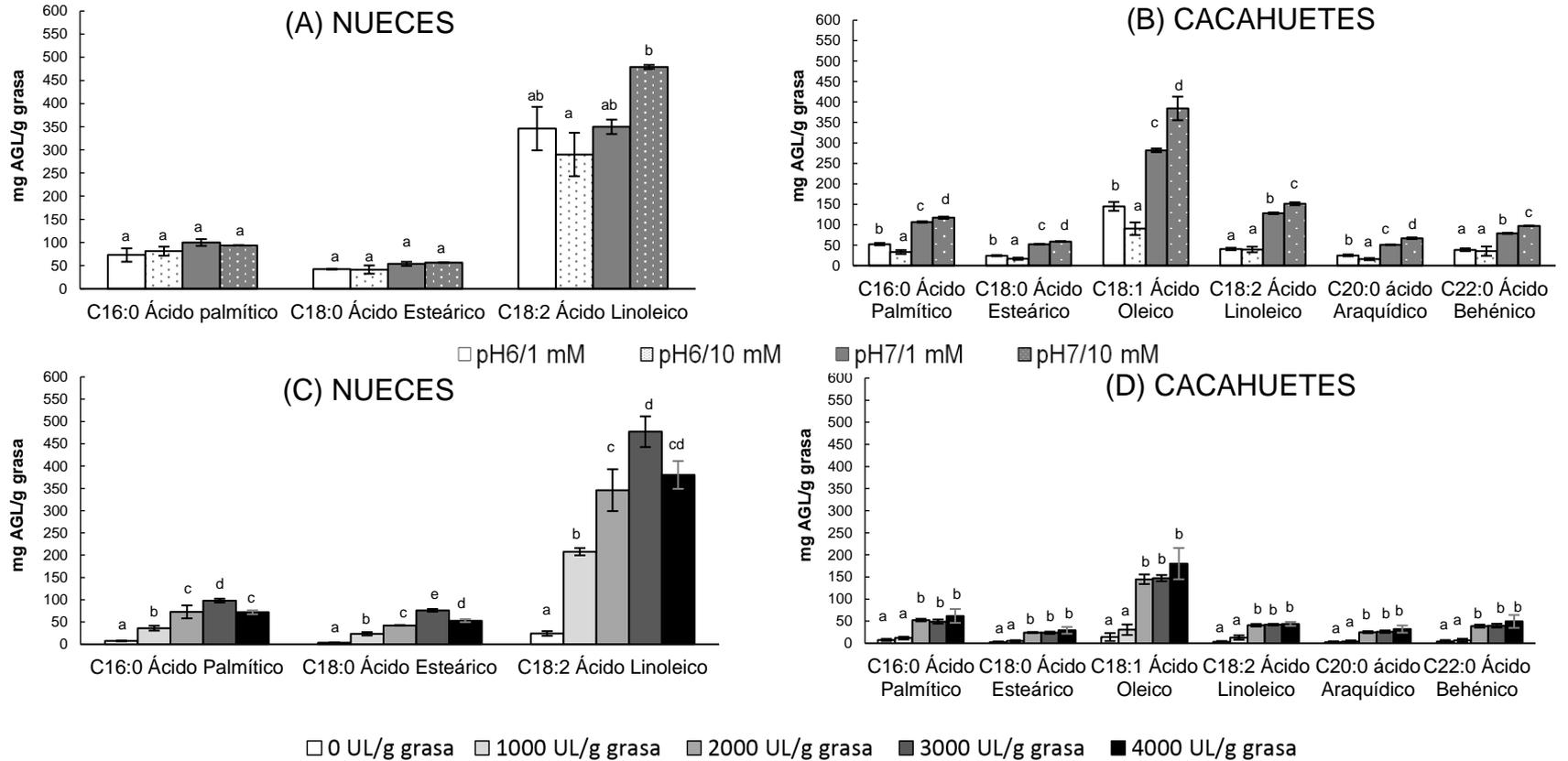
En cuanto al efecto de la suplementación con pancreatina (a 4000 UL/ g grasa) (**Tabla 4.8**), se produjo un incremento significativo de la lipólisis bajo la presencia de lipasa pancreática hasta alcanzarse un máximo a partir del cual un aumento en la dosis no supuso una mayor lipólisis. Concretamente, los resultados indicaron que la concentración de pancreatina que maximiza la lipólisis, bajo digestión *in vitro* con pH intestinal 6 y concentración biliar de 1 mM, es de 2000 UL / g de grasa para las nueces y cacahuets de tamaño de partícula pequeño y de 3000 UL / g de grasa para cacahuete de tamaño de partícula grande.

**Tabla 4.8.** Lipólisis (mg ácidos grasos libres (AGL)/g grasa) alcanzada en nueces y cacahuetes digeridos con dos tamaños de partícula (grande (> 1.2 mm) o pequeño (< 1.2 mm)) y bajo diferentes condiciones intestinales de pH (6 o 7), concentración biliar (1 o 10 mM) y dosis de pancreatina (0-4000 UL/ g grasa)

<i>Condiciones Intestinales</i>			<b>Lipólisis (mg AGL/ g grasa)</b>			
<b>Pancreatina</b> (LU/g grasa)	<b>pH</b>	<b>Bilis</b> (mM)	<b>Nuez grande</b> (<1.2mm)	<b>Nuez pequeña</b> (>1.2mm)	<b>Cacahuete grande</b> (<1.2mm)	<b>Cacahuete pequeño</b> (>1.2mm)
<b>2000</b>	6	1	567 ± 61(ab)(C)	585 ± 63(ab)(C)	134 ± 30(a)(A)	398 ± 25(a)(B)
	6	10	459 ± 70(a)(B)	460 ± 70(a)(B)	135 ± 20(a)(A)	273 ± 35(a)(A)
	7	1	582 ± 44(ab)(B)	596 ± 45(ab)/(B)	92 ± 28(a)(A)	777 ± 86(b)(C)
	7	10	689 ± 65(b)(B)	708 ± 68(b)(B)	205 ± 1 (b)(A)	780 ± 35(b)(B)
<b>0</b>			29 ± 8(a)(A)	44 ± 12(a)(A)	26 ± 4(a)(A)	41 ± 4(a)(A)
<b>1000</b>			342 ± 57(b)(B)	348 ± 58(b)(B)	179 ± 24(bc)(A)	156 ± 37(b)(A)
<b>2000</b>	6	1	567 ± 61(c)(C)	585 ± 63(c)(C)	134 ± 30(b)(A)	398 ± 25(c)(B)
<b>3000</b>			615 ± 35(c)(C)	661 ± 28(c)(C)	255 ± 25(d)(A)	415 ± 8(c)(B)
<b>4000</b>			586 ± 4(c)(C)	591 ± 4(c)(C)	198 ± 20(c)(A)	437 ± 12(c)(B)

Las letras (a-d "minúsculas") se refieren a los grupos homogéneos obtenidos por ANOVA que comparan diferentes concentraciones de lipasa o condiciones intestinales en el mismo fruto seco, y las letras (A-C "letras mayúsculas") se refieren al grupo homogéneo que compara diferentes frutos secos y tamaños de partícula en cada condición experimental (valor de p <0.05).

Complementariamente, se analizó el perfil de ácidos grasos libres en las muestras de frutos secos de tamaño de partícula pequeño, por ser en estos donde se registra una mayor lipólisis en cacahuets. Cabe recordar que en el caso de nueces no existe efecto significativo del tamaño de partícula sobre la lipólisis (**Figura 4.7**). Primeramente, los ácidos grasos libres registrados en nueces fueron: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico; y para cacahuets: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquídico, ácido behénico. En cuanto al perfil lipídico de las nueces, únicamente se produjo una mayor liberación del ácido linoleico (ácido graso  $\omega$ -6) en condiciones estándares y óptimas de pH intestinal 7 y concentración biliar 10 mM siendo este el mayoritario (Sze-Tao y Sathe, 2000); mientras que no se observó ningún efecto de pH y concentración biliar sobre los ácidos palmítico y esteárico. En el caso de los cacahuets, el análisis del perfil de ácidos grasos libres reveló una influencia significativa no sólo del pH intestinal, sino también de la concentración biliar, sobre la liberación de casi todos los ácidos grasos y no solo para el ácido graso predominante, que en este caso es el oleico. La influencia demostrada de las sales biliares está relacionada con sus propiedades surfactantes, las cuales desempeñan un papel crucial en la digestión de lípidos (Maldonado-Valderrama et al., 2011) al promover la colipasa y posterior absorción de la lipasa en la interfaz de los glóbulos grasos. Las sales biliares también son necesarias para eliminar los productos resultantes de la lipólisis acumulada en la interfaz y prevenir las inhibiciones de la lipasa (Grundy et al., 2015). Cabe resaltar, que si bien no existió una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de la extensión de la lipólisis a partir de 2000 UL/ g grasa nueces de pequeño tamaño de partícula (**Tabla 4.8**), sí se registró una mayor liberación de los ácidos libres a una dosis de 3000 UL/ g grasa. En cuanto a los cacahuets de pequeño tamaño, los valores más altos de ácidos grasos libres se detectaron a una dosis de 2000 UL/ g grasa, coincidiendo con la dosis a la que se alcanza el máximo de lipólisis total (**Tabla 4.8**).



**Figura 4.7.** Perfil de ácidos grasos libres en nueces y cacahuetes digeridos. A y B representan los digeridos *in vitro* con una concentración de pancreatina fija (2000 UL / g de grasa) y diferentes combinaciones de pH intestinal y concentración de bilis (pH 6 o 7, concentración de sales biliares de 1 o 10 mM); C y D representan los digeridos *in vitro* en condiciones intestinales fijas (pH 6 y concentración biliar 1 mM) y diferentes concentraciones de pancreatina (0-4000 UL / g de grasa). Las letras a-e se refieren a los grupos homogéneos obtenidos por el ANOVA aplicado a los datos en cada liberación individual de ácidos grasos libres bajo diferentes concentraciones de pH-bilis o dosis de pancreatina.

#### 4.2.4 Conclusiones

Del presente estudio se puede concluir que el tipo de fruto seco, su procesado así como el tamaño de partícula, son factores determinantes en la digestibilidad y bioaccesibilidad de proteínas y lípidos. Los resultados revelaron que el índice de degradación de la matriz se vio afectado por el tamaño de partícula en ambos frutos secos, independientemente de las condiciones intestinales y la dosis de suplementación enzimática con pancreatina. Así, los valores más elevados se obtuvieron en partículas pequeñas 52-86% (valor promedio) frente a 19-36 % (valor promedio) en partículas grandes. Este parámetro proporciona información sobre la relevancia de la masticación en el acceso efectivo de las enzimas digestivas a los macronutrientes.

Los resultados de la digestión *in vitro* que simulaban las condiciones intestinales alteradas permitieron cuantificar las diferencias en la digestión de macronutrientes de frutos secos en condiciones sanas y de insuficiencia pancreática exocrina (IPE). Las proteínas de nueces crudas, y en especial aquellas de menor tamaño de partícula inicial, presentaron una mayor digestibilidad en términos cinéticos y de extensión de la proteólisis que los cacahuets tostados, con independencia de su tamaño de partícula y de las condiciones intestinales ensayadas. La suplementación con pancreatina mejoró sustancialmente la proteólisis, sobretodo en el caso de las nueces. Con respecto a la lipólisis, los resultados revelan un papel esencial del tamaño de partícula en la digestibilidad lipídica de cacahuets, pero no en nueces. Asimismo, cabe destacar que los valores de lipólisis alcanzados en cacahuets de pequeño tamaño de partícula en condiciones intestinal de pH7 fueron incluso superiores a los registrados en las nueces. Por otro lado, las nueces presentaron valores de lipólisis muy superiores a los de cacahuets en condiciones de IPE, por lo que su ingesta sería más recomendable por parte de individuos con esta afección. Finalmente, la lipólisis

#### 4. RESULTADOS

en ambos frutos secos, aumentó conforme lo hizo la suplementación hasta alcanzar un valor máximo. De acuerdo con los resultados obtenidos, la dosis recomendada de pancreatina en condiciones de IPE sería de 2000 UL/g de grasa para nueces en ambos tamaños y cacahuets de pequeño tamaño de partícula, y 3000 UL/g para cacahuets de elevado tamaño de partícula.

### **4.3 Influencia de las condiciones intestinales en la digestibilidad lipídica y liberación de polifenoles en distintos tipos de chocolate (negro, con leche y blanco)**

Paz-Yépez, C., Peinado, I., Heredia, A., & Andrés, A. (2019b). Lipids digestibility and polyphenols release under in vitro digestion of dark, milk and white chocolate. *Journal of Functional Foods*, 52, 196–203.



El chocolate es una matriz grasa continua dentro de la cual hay partículas de polvo de cacao, azúcar y, en el caso del chocolate con leche, leche en polvo. A pesar de su elevado contenido graso, que en general supera el 30%, presenta propiedades lipídicas y antioxidantes de interés para la salud humana, derivadas de la presencia del cacao como principal ingrediente. La manteca de cacao, tiene un perfil lipídico caracterizado principalmente por los ácidos oleico, esteárico ( $\approx 34\%$  p/p) y palmítico ( $\approx 27\%$  p/p), seguido de pequeñas fracciones de ácido linoleico, araquídico, palmitoleico, margárico,  $\alpha$ -linoleico y mirístico. Además, el cacao es un producto rico en polifenoles, siendo una de las fuentes alimentarias conocidas más importantes de flavan-3-oles, principalmente epi-catequina, catequina y en particular procianidinas (Beckett, 2008; Jalil & Ismail, 2008). En los últimos años, son numerosos los estudios que han demostrado una estrecha relación entre el consumo de productos a base de cacao, especialmente de chocolate negro, y la prevención de ciertas enfermedades cardiovasculares y degenerativas. Almoosawi et al. (2012) evidencian los beneficios metabólicos derivados del chocolate negro concluyendo que la importancia de los polifenoles en el chocolate puede radicar en su capacidad para evitar los efectos adversos en comparación al consumo de chocolate deficiente en polifenoles. Cooper et al., (2008) detalla los cambios producidos en diferentes biomarcadores relacionados con el estado oxidativo y / o la función vascular tras el consumo de cacao, así como la relación existente entre la ingesta de cacao durante largos períodos de tiempo y una menor mortalidad general y cardiovascular en hombres de edad avanzada. En su artículo de revisión Keen et al., (2005) indican que existe una notable evidencia científica que apoya la capacidad de los flavanoles y las procianidinas del cacao para actuar como antioxidantes *in vivo*. Estos compuestos influirían en el sistema cardiovascular al mejorar la función vascular y disminuir la reactividad plaquetaria, reduciendo así el riesgo cardiovascular. Otro estudio llevado a cabo con un cohorte de mujeres postmenopáusicas encontró una asociación inversa

#### 4. RESULTADOS

entre la ingesta de chocolate y la mortalidad derivada de enfermedades de vascularización cerebral.

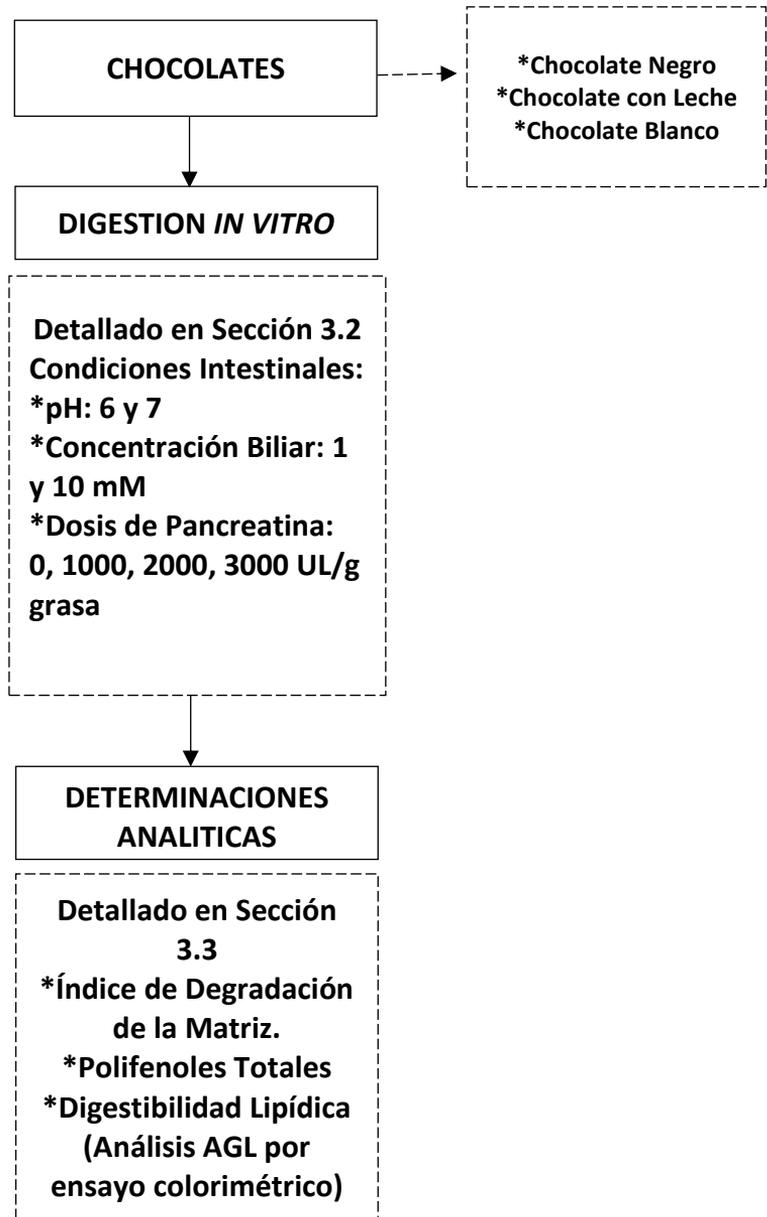
En relación a los efectos saludables descritos, es importante señalar que las operaciones unitarias a las que está sometido el grano del cacao durante su procesado (fermentación del grano, tostado, molienda, alcalinización, templado, moldeado o envoltura, enfriamiento y/o envasado) (Beckett, 2008; Ortega et al., 2009; Wollgast & Anklam, 2000), pueden modificar las propiedades químicas de los compuestos polifenólicos, y por lo tanto sus efectos en la salud. Así, durante la fermentación de los granos de cacao, los polifenoles se oxidan a taninos condensados de alto peso molecular, en su mayoría insolubles. La aparición de reacciones de condensación se ve confirmada por la fuerte disminución del contenido de epicatequina, entre un 80 y 90%, entre el segundo y el tercer día de fermentación. Asimismo, las antocianinas se hidrolizan a antocianidinas, y hasta últimas a su vez puede polimerizarse, junto con catequinas simples, para formar taninos complejos. Otra alteración a nivel del contenido de polifenoles se genera en el tostado. A medida que la temperatura de tostado aumenta de 127 a 181°C, el nivel de polifenoles totales disminuye de 24618 a 12786 µg / g y el de procianidina de 1953 a 425 µg / g (Wollgast & Anklam, 2000).

Resulta importante también tener en cuenta cómo los polifenoles pueden interaccionar con otros macro o microcomponente de la matriz alimentaria (en este caso chocolate), ya que dichas interacciones pueden aumentar o disminuir su bioaccesibilidad y biodisponibilidad (Jakobek, 2015). En este sentido, el estudio llevado a cabo por Ortega et al. (2009) sugiere un efecto protector de la grasa sobre los polifenoles presentes en el licor de cacao al aumentar la micelarización y estabilidad de éstos durante la digestión gastrointestinal. Por otro lado y a la inversa, también ha sido demostrado el efecto de los polifenoles sobre la digestibilidad de las grasas. Su presencia parece afectar el mecanismo de emulsificación del glóbulo graso por parte de las sales biliares en el intestino delgado, al inducir un aumento del

tamaño de gota, y por tanto una reducción del área superficial y disminución de la actividad lipasa (Shishikura, Khokhar, & Murray, 2006; Sugiyama et al., 2007; Uchiyama, Taniguchi, Saka, Yoshida, & Yajima, 2011). La bioaccesibilidad de los macro y micronutrientes depende por tanto, de diferentes factores inherentes al alimento, como son la composición del alimento, su estructura matricial, el tipo de nutrientes y condiciones de procesado, entre otros (Granado-Lorencio et al., 2007; Nimalaratne, Savard, Gauthier, Schieber, & Wu, 2015; Pineda-Vadillo et al., 2017; Ryan, O'Connell, O'Sullivan, Aherne, & O'Brien, 2008). Y a su vez de las condiciones fisiológicas del entorno digestivo, o factores individuales, bajo las cuales tiene lugar la digestión (pH, secreción y composición de los fluidos digestivos, tiempo de tránsito...). Estas condiciones modulan la cinética y extensión de liberación de nutrientes en la matriz alimentaria (Ryan et al., 2008; Whitcomb et al., 2010). En base a lo expuesto anteriormente, resulta de interés analizar en qué medida no solo la matriz alimentaria, sino otros factores del entorno digestivo pueden modificar la estabilidad y bioaccesibilidad final de los compuestos polifenólicos, y estos a su vez modular la lipólisis en alimentos grasos y ricos en estos antioxidantes, como lo son los chocolates. Por tanto, el objetivo del presente estudio es evaluar las diferencias entre el chocolate negro, chocolate con leche y el chocolate blanco en términos del índice de degradación de la matriz, digestibilidad lipídica y bioaccesibilidad de los polifenoles totales en diferentes condiciones intestinales (pH, concentración de bilis y distintas dosis de enzimas pancreáticas). Asimismo, se pretende evidenciar la efectividad de la suplementación enzimática con pancreatina sobre la lipólisis en condiciones intestinales subóptimas características de la insuficiencia pancreática exocrina en función del tipo de chocolate.

A continuación, se presenta de forma esquematizada el plan experimental diseñado para llevar a cabo este estudio (**Figura 4.8**):

#### 4. RESULTADOS



**Figura 4.8.** Esquema del desarrollo del plan experimental para la evaluación de la digestión lipídica y bioaccessibilidad de antioxidantes en chocolates.

#### 4.3.1 Efecto de las condiciones intestinales sobre el índice de degradación de la matriz (IDM) en los chocolates digeridos

El índice de degradación de la matriz (IDM) corresponde al porcentaje de partículas digeridas y proporciona información global sobre el alcance de los diferentes procesos (solubilización, ruptura mecánica, reacciones químicas y enzimáticas) que experimenta la matriz alimentaria durante las etapas oral, gástrica e intestinal. Durante la digestión, los alimentos absorben una cantidad significativa de agua que, junto con la acción de las enzimas digestivas, promueve el ablandamiento de la matriz y la reducción de las fuerzas cohesivas. Dependiendo de la composición y estructura de la matriz alimentaria, resultará en un grado de degradación diferente (Kong & Singh, 2009). Además, en productos de grasa continua como el chocolate, el ablandamiento y la rotura de la matriz se deben principalmente a la fusión de la grasa a la temperatura fisiológica de 37°C aprox. La **Tabla 4.9** muestra los resultados del IDM (%) de los diferentes tipos de chocolates (negro, con leche y blanco) digeridos bajo diferentes concentraciones intestinales de pH (6 o 7) y concentración biliar (1 y 10 mM) y concentración fija de 2000 UL/g grasa de suplementación enzimática con pancreatina; así como a concentración creciente del suplemento (0-3000 UL/ g grasa) y condiciones fijas intestinales de pH 6 y concentración biliar 1 mM.

#### 4. RESULTADOS

**Tabla 4.9.** Índice de degradación de la matriz (IDM (%)) de chocolate negro, con leche y blanco digerido *in vitro* bajo diferentes condiciones intestinales de pH (6 o 7), concentración biliar (1 o 10 mM) y distintas dosis de pancreatina (0-3000 UL/g grasa).

Condiciones Intestinales			IDM (%)					
Pancreatina (UL/g grasa)	pH	Concentración biliar (mM)	Chocolate Negro		Chocolate con Leche		Chocolate Blanco	
2000	6	1	71.21	± 1.08aA	89.5	± 0.4abB	92.0	± 0.8aB
	6	10	75	± 2bA	92.17	± 1.14bB	92.3	± 0.6aB
	7	1	71.0	± 0.2aA	89.3	± 1.4aB	92.9	± 0.9aC
	7	10	70.6	± 0.4aA	89.7	± 0.7abB	92.7	± 0.6aC
0			54	± 6aA	87.92	± 0.03aB	90	± 3aB
1000	6	1	63	± 7abA	92.1	± 0.8aB	93	± 1aB
2000			71.21	± 1.08bA	89.5	± 0.4aB	92.0	± 0.8aB
3000			69.2	± 1.2bA	90	± 3aB	91.7	± 0.2aB

Las letras en minúscula se refieren a los grupos homogéneos obtenidos por la prueba post-hoc de Fisher LSD después de que el ANOVA se aplicara a los datos a cada tipo de chocolate. Letras en mayúscula se refieren a los grupos homogéneos obtenidos por la prueba post-hoc de Fisher LSD después de la aplicación del ANOVA a los datos entre todos los tipos de chocolates para cada condición intestinal y cada concentración de pancreatina individual; por lo tanto, proporcionan información relacionada con el efecto del tipo de chocolate (valor de  $p < 0.05$ ).

El IDM osciló entre el 50 y 75% (valor promedio) en chocolate negro, y entre el 87 y 94% (valor promedio) en los otros dos tipos de chocolates (leche y chocolate blanco), siendo el tipo de chocolate la única variable que afectó significativamente a este parámetro ( $p < 0,001$ ) y no las condiciones de la digestión estudiadas. La microestructura del chocolate es el resultado de muchos factores que incluyen el tamaño de las partículas, la cantidad y la distribución de la grasa, el tipo y la cantidad

de emulsionante (lecitina u otros) y partículas sólidas (Afoakwa, Paterson, Fowler, & Vieira, 2009). Entre los principales componentes del chocolate, el más soluble es el azúcar, lo que podría explicar la mayor degradación registrada en los chocolates que contienen un alto contenido de este ingrediente. Además, la cantidad de grasa afecta las interacciones entre partículas, relacionadas con la distancia y distribución de las mismas en la matriz alimenticia (Glicerina, Balestra, Dalla Rosa, & Romani, 2016). En su estudio, Glicerina et al. (2016) compararon las propiedades microestructurales y reológicas de chocolate negro, con leche y blanco. Concretamente, el chocolate negro presentó una estructura más agregada, con menor distancia entre partículas y menor número de espacios abiertos (reellenos con grasas), que las muestras de chocolate con leche. Estas propiedades microestructurales también podrían explicar el IDM más bajo obtenido en chocolate negro digerido en comparación al resto (**Tabla 4.9**). Los valores de IDM del chocolate blanco fueron los más altos, aunque muy similares a los valores obtenidos para las muestras de chocolate con leche, probablemente debido a la cantidad similar de grasa de ambos alimentos (**Tabla 3.2** en sección metodología experimental). Sin embargo, la microestructura altamente agregada debido a la presencia de partículas de cacao entre las azúcares en el chocolate con leche, explicaría los valores ligeramente inferiores de IDM, en comparación con el chocolate blanco.

#### 4.3.2 Efecto de las condiciones intestinales en la liberación y bioaccesibilidad final de polifenoles de chocolate

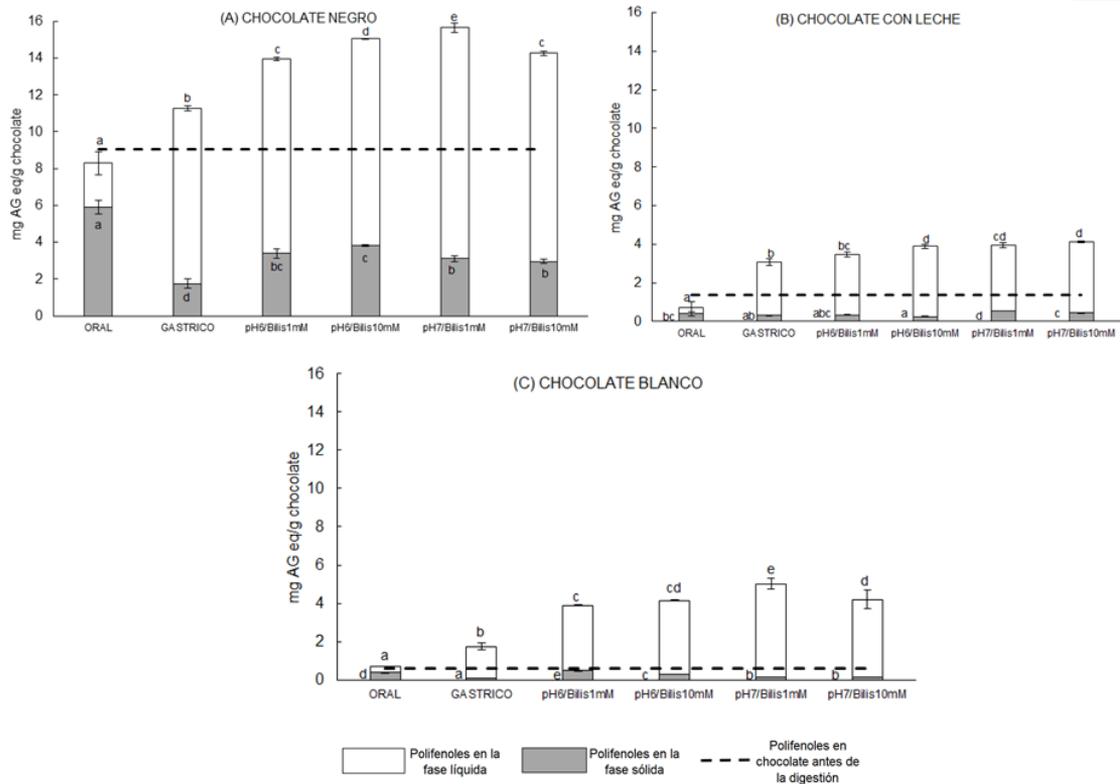
La **Figura 4.9** muestra la evolución del contenido de polifenoles solubles (mg equivalente de ácido gálico/ g de chocolate) tras las distintas etapas de la digestión *in vitro* (oral, gástrica e intestinal) para los tres chocolates del estudio: negro, con leche y blanco. Cabe recordar que, si bien las condiciones de la etapa oral y gástrica fueron similares en todos los experimentos, no lo fueron en la etapa intestinal.

#### 4. RESULTADOS

Adicionalmente, y tal y como se describe en metodología experimental (Determinaciones analíticas 3.3.4), el contenido de polifenoles totales fue determinado espectrofotométricamente tanto en la fase líquida digerida como en el residuo sólido no digerido.

Como se puede observar, la cantidad inicial de polifenoles está directamente relacionada con el contenido de cacao en el producto. Así, el chocolate negro con un contenido cinco veces superior de cacao que el chocolate con leche y siete veces que el blanco, presentó el mayor contenido en polifenoles totales. Además, es importante destacar que si bien el chocolate blanco y con leche están hechos principalmente de manteca de cacao extraída a partir del licor de cacao, el chocolate negro se formula directamente con el licor, lo cual influye tanto en la cantidad como en las características químicas de los compuestos fenólicos presentes.

En cuanto a los cambios observados durante la digestión, la etapa oral caracterizada por la masticación simulada y la hidrólisis primaria de los glúcidos por la  $\alpha$ -amilasa, resultó en una baja solubilización de los compuestos polifenólicos debido principalmente a la corta duración de esta etapa. Consecuentemente, la mayoría de los polifenoles permanecieron en la fase sólida no digerida tras la masticación simulada.



**Figura 4.9.** Contenido de polifenoles (mg de ácido gálico eq / g de chocolate) tras la digestión oral, gástrica e intestinal de los diferentes tipos de chocolates (negro, leche y blanco). Las condiciones intestinales han sido de pH 6, concentración biliar de 1 o 10 mM y cantidad de enzima pancreática de 2000 UL / g de grasa. El contenido de polifenoles se ha medido en el chocolate antes de la digestión (línea discontinua) y en las fases líquida y sólida en el chocolate digerido. Las letras a-e se refieren a los grupos homogéneos obtenidos por la prueba post-hoc de Fisher LSD después de la aplicación del ANOVA a los datos de cada tipo de chocolate, estos brindan información sobre el efecto de las diferentes etapas de digestión en la liberación de polifenoles bioaccesibles (valor de  $p < 0.05$ ).

#### 4. RESULTADOS

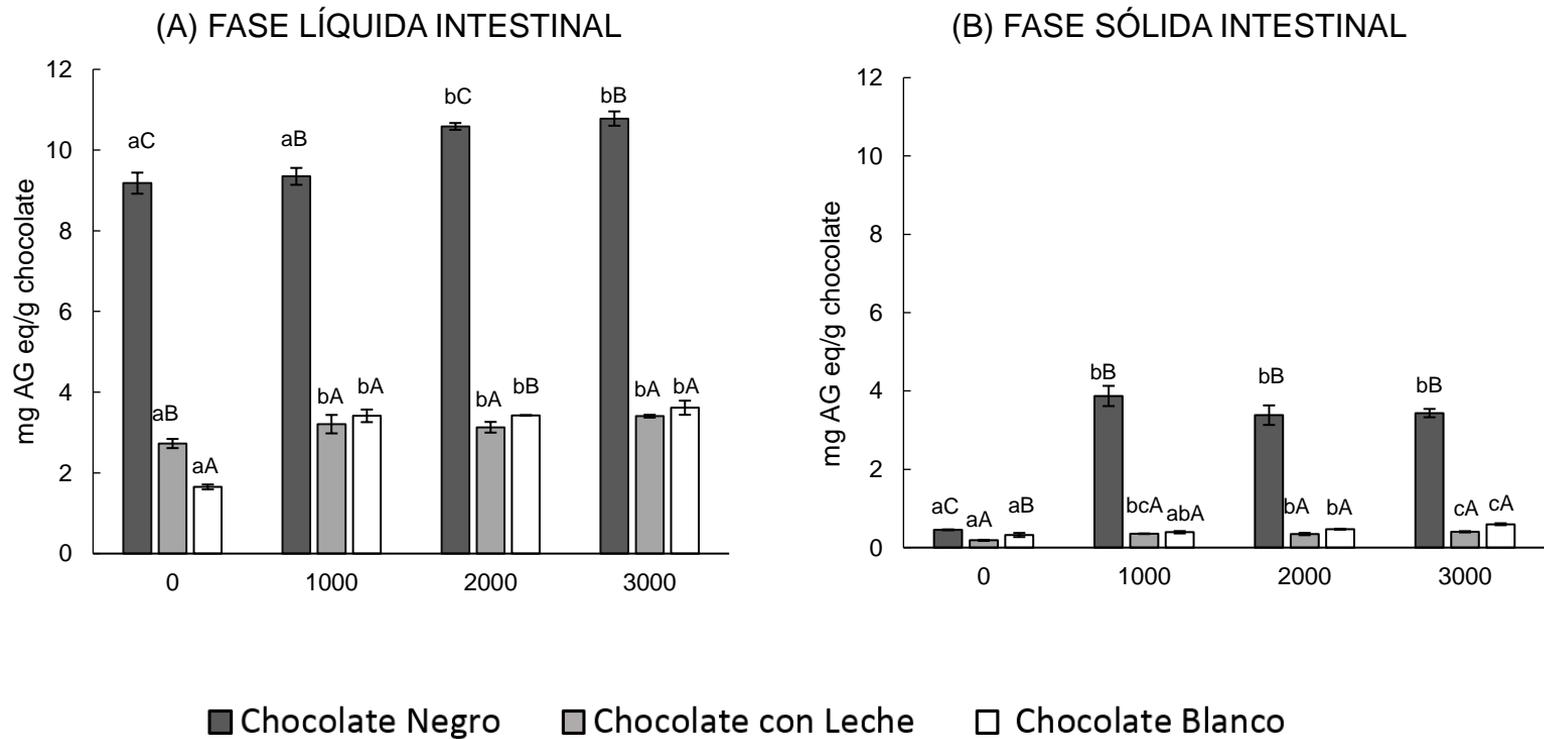
En la sucesiva etapa gástrica, el pH ácido, junto con la hidrólisis enzimática llevada a cabo por la pepsina sobre las proteínas del chocolate (6, 7 y 10.4% en blanco, leche y chocolate negro, respectivamente) y la degradación mecánica durante los 120 minutos que dura esta etapa, resultó en un aumento del contenido total de polifenoles. Es importante indicar que el método analítico para la determinación de polifenoles sólo cuantifica las especies solubles. Según estos resultados, los compuestos fenólicos participantes en moléculas complejas en el alimento no digerido, serían liberados de la estructura alimentaria y solubilizados en los fluidos digestivos en las etapas gástricas e intestinales. Este hecho se ve reflejado en un aumento de la concentración total de estos compuestos y en particular en la fase líquida digerida. En los alimentos, los polifenoles se encuentran principalmente formando ésteres, glucósidos y polímeros los cuales, generalmente, no son absorbibles. Por ello, han de ser solubilizados en presencia de las diferentes enzimas digestivas al pH de cada etapa o/y metabolizados por la microflora intestinal, para poder ser absorbidos. Los polifenoles representan un grupo heterogéneo de compuestos con diferentes propiedades químicas, los cuales se ven afectados de distintas formas por las condiciones de las etapas de digestión. En el cacao se pueden distinguir tres grupos de polifenoles: catequinas o flavan-3-ols (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%). La catequina principal es (-) –epicatequina (Wollgast & Anklam, 2000). Así, los oligómeros de flavonoides son hidrolizados a moléculas de menor tamaño molecular debido al bajo pH en el estómago. Algunos subgrupos como los flavon-3-ols, en cambio, llegan intactos al duodeno en forma de agliconas. En el intestino delgado, tienen lugar diferentes reacciones de desglicosilación, glucuronidación, metilación, sulfonación y/o hidroxilación de flavonoides, dando lugar finalmente, a la absorción de ácidos fenólicos libres en el intestino delgado. Las subfamilias de polifenoles no digeridas llegan al intestino grueso, donde la microflora colónica es la encargada de metabolizarlas igualmente a ácidos fenólicos, siendo estos absorbidos en el colon (Tarko, Duda-Chodak, & Zajac, 2013). Por tanto, es posible

afirmar que son diversos los factores que contribuyen positivamente a la liberación físico-química de los compuestos fenólicos, lo que resulta en un aumento del contenido total soluble a lo largo de la digestión. En base a los resultados obtenidos, la mayoría de los polifenoles se encontraron presentes en la fase líquida (fluidos digestivos), y no en la fase sólida no digerida tras las etapas gástrica e intestinal, y por lo tanto serían más bioaccesibles y potencialmente absorbibles en comparación con los polifenoles presentes en el alimento sin digerir. Cabe destacar que la solubilización y liberación de polifenoles en el chocolate blanco digerido alcanzó su valor máximo durante la etapa intestinal, siendo sus valores comparables al chocolate con leche, a pesar de su bajo contenido inicial en polifenoles en el producto no digerido. En cuanto al efecto del pH intestinal y concentración biliar sobre la liberación de polifenoles, si bien un aumento del pH de 6 a 7 favoreció la solubilización de estos compuestos a baja concentración biliar (1 mM), este efecto no se reprodujo a la concentración biliar estándar de 10 mM. Asimismo, la contribución de las sales biliares (incremento de 1 a 10 mM) a la liberación de polifenoles solo fue significativa a bajo pH intestinal (6). Este hecho presenta similitud con lo obtenido en estudios previos en cuanto a la relevancia variable de la concentración biliar en función del pH intestinal. Así, Peinado, Larrea, Heredia, & Andrés, (2018) evidenciaron un efecto más marcado de la concentración biliar a pH 6, que a 7 u 8. A pH intestinal subóptimo, resulta más crucial que las sales biliares motiven el transporte de productos de la lipólisis (principalmente ácidos grasos libres y monoglicéridos) desde la superficie de los lípidos hasta el fluido intestinal, y su posterior micelación, facilitando así la solubilización de otros productos de la digestión como son los antioxidantes (Maldonado-Valderrama et al., 2011).

La **Figura 4.10** muestra la liberación y solubilización de compuestos fenólicos (mg equivalentes de AG / g chocolate) en función de diferentes concentraciones pancreáticas (0-3000 LU / g de grasa), y pH 6 y concentración biliar 1 mM. El primer resultado destacable es la influencia positiva de la presencia de suplemento

#### 4. RESULTADOS

enzimático sobre la concentración de polifenoles en la fase líquida digerida (1000, 2000 o 3000 UL/ g grasa), frente a la ausencia del mismo (0 UL/ g grasa).



**Figura 4.10.** Contenido de polifenoles (mg eq. de ácido gálico / g de chocolate) después de la digestión *in vitro* de diferentes tipos de chocolates (negro, leche y blanco) digeridos en condiciones intestinales fijas de pH 6 y concentración biliar 1 mM pero variables de concentración de pancreatina (0- 3000 UL / g de grasa). (A) Valores de la fase líquida (B) de la fase sólida.

Las letras en minúscula a-c se refieren a los grupos homogéneos obtenidos por la prueba post-hoc de Fisher LSD después de que el ANOVA se aplicara a los datos a cada tipo de chocolate y dan información sobre la liberación de polifenoles a diferentes concentraciones de pancreatina. Letras en mayúscula A-C se refieren a los grupos homogéneos obtenidos por la prueba post-hoc de Fisher LSD después de la aplicación del ANOVA a los datos entre todos los tipos de chocolates para cada concentración de pancreatina individual; por lo tanto, proporcionan información relacionada con el efecto del tipo de chocolate en la liberación de polifenoles (valor de  $p < 0.05$ ).

#### 4. RESULTADOS

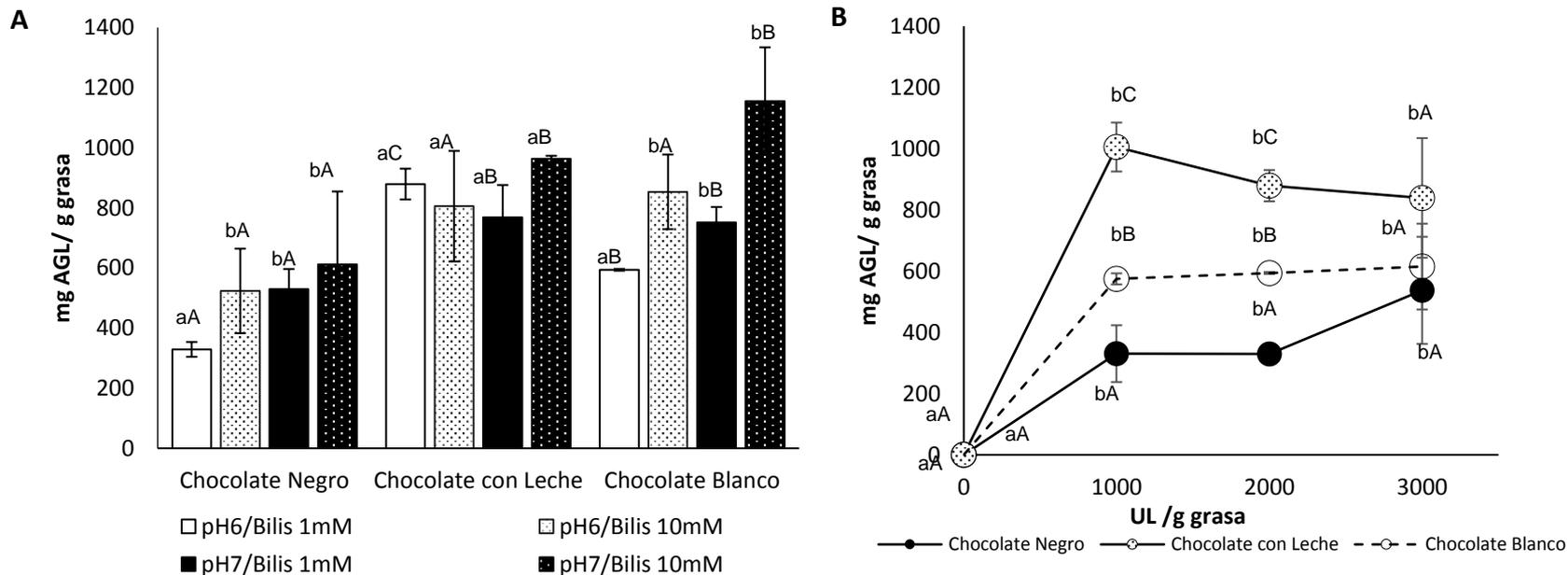
De acuerdo con estos resultados, la suplementación oral con pancreatina encapsulada mejoría significativamente la liberación de estos compuestos antioxidantes en patologías que cursan insuficiencia pancreática exocrina. La dosis de suplementación, sin embargo, solo presentó un efecto estadísticamente significativo en la liberación de los compuestos polifenólicos de chocolate negro. Cabe destacar que este efecto de la dosis de pancreatina se vio reflejada tanto en el contenido de polifenoles de la fase líquida como en la fase sólida no digerida. Este hecho podría estar vinculado a una mayor digestibilidad de los macronutrientes del producto, y concretamente de lípidos, en presencia del suplemento. Este hecho favorecería la incorporación de fenoles de cacao a la fase lipídica (Ortega, Reguant, Romero, Macià, & Motilva, 2009). Por otro lado, las posibles interacciones de los polifenoles con otros compuestos presenten en la formulación de los chocolates, también es un factor a tener en cuenta en relación a la posible influencia que estas interacciones pueden ejercer en la bioaccesibilidad. De hecho, la ausencia de compuestos de origen lácteo en el chocolate negro parece ser favorable a la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes, pues se ha descrito un efecto negativo de las caseínas sobre la liberación de polifenoles (Keogh, McInerney, & Clifton, 2007). Concretamente, su carácter antioxidante parece estar comprometido en productos con presencia de compuestos lácteos por la interacción química que la  $\alpha$ -caseína (Bourassa, Côté, Hutchandani, Samson, & Tajmir-Riahi, 2013) y  $\beta$ -lactoglobulinas ejercen sobre los compuestos fenólicos (Kanakakis et al., 2011; Kilmartin & Hsu, 2003; O'Connell, Fox, Tan-Kintia, & Fox, 1998). Fenómeno que podría darse tanto en chocolate con leche como blanco.

Por último, algunos estudios han destacado una correlación positiva entre el porcentaje de cacao del etiquetado y la concentración en polifenoles (Vinson & Motisi, 2015). Esta información podría permitir a los consumidores identificar aquellos chocolates con mayor biodisponibilidad de antioxidantes en función del contenido de cacao puro de los productos. También es importante mencionar que el

consumo de chocolate negro ha sido relacionado con un efecto antioxidante y antiinflamatoria post-pandrial en estudios *in vivo* llevados a cabo en humanos, pese a su alto contenido en grasas y azúcares (Keen et al., 2005; Ortega et al., 2009).

#### 4.3.3 Afectación de la extensión de la lipólisis por el tipo de chocolate y las condiciones intestinales.

Durante la digestión, el chocolate se mezcla con fluidos digestivos y, por lo tanto, se produce la hidratación de la matriz, lo que lleva a la solubilización de algunos componentes como los azúcares, junto con la fusión y emulsificación de la grasa. Además, la actividad de las enzimas digestivas es responsable de la hidrólisis de los macronutrientes, y debido al alto contenido de grasa de los chocolates, es importante analizar la extensión de la lipólisis en estos productos. Dado que la digestión de las grasas se realiza principalmente en el duodeno, y debido a que puede verse afectada por el pH, la concentración biliar y la actividad de la enzima pancreática en el caso de insuficiencia pancreática exocrina, se analizaron diferentes condiciones. La **Figura 4.11A** muestra la concentración de ácidos grasos libres (AGL) /g de grasa en las muestras digeridas en diferentes condiciones intestinales. Estos resultados indican que el efecto del pH intestinal y la concentración biliar varía en función del tipo de chocolate. Si bien la lipólisis en chocolate con leche no fue dependiente del pH intestinal o concentración biliar, sí se encontró una influencia estadísticamente significativa de ambos factores en la lipólisis alcanzada en chocolate blanco y negro, siendo más significativa en el caso del chocolate blanco.



**Figura 4.11. A)** Lipólisis (mg de ácido grasos libres (AGL)/ g de grasa) después de la digestión *in vitro* con una concentración de pancreatina fija (2000 UL / g de grasa) y diferentes combinaciones de pH intestinal y concentraciones de bilis (pH 6 o 7 concentración de sales biliares 1 o 10 mM); **B)** Lipólisis (mg de AGL / g de grasa) después de la digestión *in vitro* en condiciones intestinales fijas (pH 6 y concentración biliar 1 mM) y diferentes concentraciones de pancreatina (0-3000 UL / g de grasa).

Las letras (a-b "minúsculas") se refieren a los grupos homogéneos obtenidos por la prueba post-hoc de Fisher LSD después de la aplicación del ANOVA en comparación con diferentes concentraciones de lipasa o condiciones intestinales dentro del mismo tipo de chocolate, y las letras (A-C "mayúsculas") se refieren a los grupos homogéneos obtenidos por la prueba post-hoc de Fisher LSD después de que se aplicó el ANOVA comparando los diferentes tipos de chocolates para cada condición experimental (valor de  $p < 0.05$ ).

Pese a los contenidos de grasa de los tres chocolates evaluados (40, 31 y 31%, para chocolate negro, con leche y blanco, respectivamente) resulta interesante observar los factores que influyen en la digestibilidad lipídica de estas matrices. Los resultados de lipólisis están relacionados con los factores mencionados anteriormente y que afectan a su vez al IDM y la liberación de polifenoles. Los lípidos de los alimentos deben ser accesibles a las enzimas digestivas y especialmente a la lipasa pancreática, por lo que sería de esperar que las muestras con un IDM más bajo fueran las que presentan una menor extensión de la lipólisis. Así, el chocolate negro fue el que presentó los valores más bajos de AGL/g de grasa tras la digestión en todas las condiciones intestinales ensayadas. La estructura de este tipo de chocolate es más agregada, dificultando no solo la desestructuración de la matriz alimentaria, sino también la digestión de las grasas. Por el contrario, en el chocolate con leche, que presenta una estructura menos agregada con más espacios abiertos (llenos de grasas) que el chocolate negro, se obtuvieron valores más altos de lipólisis. Además, las proteínas de la leche que caracterizan al chocolate con leche son principalmente 80% caseínas y el 20% proteínas de suero. La fracción de caseína actúa como surfactante reduciendo la viscosidad del chocolate (Afoakwa, Paterson, & Fowler, 2007) y ésta, disminución de la viscosidad, mejora la digestibilidad de los lípidos (Guo et al., 2017). Así, el efecto de las sales biliares y el pH intestinal no resultó ser tan importante en el chocolate con leche como en el caso de los otros dos tipos.

Con el fin de analizar la influencia de la concentración de enzimas pancreáticas en la extensión de la lipólisis, las muestras de chocolate se digirieron *in vitro* en presencia de diferentes UL/ por g de grasa (0-3000 UL/ g grasa). Se aplicaron las condiciones intestinales más críticas, mimetizando la situación fisiológica de insuficiencia pancreática exocrina (pH 6 y bilis 1 mM) (**Figura 4.11 B**). De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible afirmar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la extensión de la lipólisis registrada a dosis por encima o por debajo de la recomendación médica (2000 UL / g de grasa). Sin embargo, se

#### 4. RESULTADOS

evidenció una tendencia al alza a 3000 UL/ g grasa en chocolate negro, a pesar de no ser significativa por la elevada desviación de los datos a este nivel de dosificación. Es de destacar que el chocolate blanco alcanzó valores de lipólisis inferiores a los registrados en chocolate con leche, a pesar de presentar mayores valores tanto del índice de degradación de la matriz (IDM) como de leche en su formulación. Este hecho podría ser explicado en base a la diferencia en términos de la formulación de ambos chocolates, y especialmente a los ingredientes que actúan como emulsionantes, ya que generalmente desempeñan un papel clave durante la digestión de los lípidos. El efecto de las moléculas interfaciales en la lipólisis ha sido ampliamente descrito en la literatura científica. Borgström & Erlanson (1973) y Borgström & Erlanson (1978) describieron que una alta concentración de surfactante inhibía la lipólisis incluso en presencia de colipasa. La baja concentración de bilis utilizada en este trabajo junto con la presencia de ciertos emulsionantes explicaría los resultados obtenidos. E476 es una grasa vegetal sintética obtenida mediante una combinación de poliglicerol y aceite de ricino, que según se ha descrito en la literatura, puede retrasar la lipólisis (Shima, Tanaka, Kimura, Adachi, & Matsuno, 2004). Cabe señalar que el polirricinoleato de poliglicerol (E476) se encuentra entre los emulsionantes incluidos en la formulación del chocolate blanco, mientras que no está incluido en el chocolate negro ni en el con leche. En el caso del chocolate negro, también es importante resaltar el efecto de los antioxidantes en la digestibilidad de los lípidos. Los polifenoles afectan al mecanismo de emulsificación que ocurre durante el tránsito digestivo, aumentando el tamaño de partícula y disminuyendo el área de superficie específica, y actividad enzimática de las lipasas (Sugiyama et al., 2007; Uchiyama et al., 2011). Por lo tanto, pequeñas diferencias en la formulación de los chocolates, especialmente aquellos con ingredientes con propiedades emulsificantes, puede tener un impacto significativo en la digestión de grasas, especialmente en condiciones anormales de secreción biliar.

#### 4.3.4 Conclusiones

En base a los resultados obtenidos, es posible concluir que el tipo de chocolate es el principal factor que afecta al índice de degradación de la matriz durante la digestión. Los diferentes ingredientes que conforman la matriz alimenticia, como la grasa, los emulsionantes o la lactosa, presentan un impacto significativo en la estructura y, en consecuencia, en la degradación estructural durante la digestión.

En cuanto a la bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos, se confirmó que la presencia de ingredientes lácteos interacciona negativamente con los compuestos fenólicos del cacao limitando su liberación de la matriz y solubilización en los fluidos digestivos. En base al elevado contenido de estos compuestos en el chocolate negro y por la ausencia de leche en su formulación, sería recomendable el consumo de éste tipo de chocolate si el aporte bioaccesible de compuestos fenólicos es el principal objetivo. Sin embargo, y desde el punto de vista de la maximizar la lipólisis en individuos con insuficiencia pancreática, es preferible el consumo de chocolates que contengan aditivos emulsionantes en su formulación y baja presencia de antioxidantes, por la interacción negativa de estos últimos sobre la lipólisis. Asimismo, los resultados muestran la importancia de la suplementación oral con pancreatina tanto para mejorar la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, y en especial en chocolate negro, como para alcanzar una extensión elevada de la lipólisis en chocolate negro y blanco. No se observaron, sin embargo, diferencias significativas en la extensión de la lipólisis alcanzada a diferentes dosis.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que no solo los factores relacionados con los alimentos, como la formulación, interacciones en la matriz alimentaria y estructura entre otros, sino también los parámetros fisiológicos de los individuos (pH intestinal y concentración biliar) pueden afectar la liberación de nutrientes y su bioaccesibilidad en chocolates. Sin embargo, se recomienda que se realicen estudios *in vivo* para complementar estos hallazgos y ayudar a la industria

#### 4. RESULTADOS

alimentaria a desarrollar productos alimenticios a base de cacao y de acuerdo a las necesidades nutricionales específicas de cada grupo poblacional.

#### **4.4 Digestibilidad lipídica en productos de panadería y propuesta de un modelo de estimación de la dosis de suplemento enzimático para su adecuada digestión**



El término “productos de panadería”, se aplica a una amplia gama de productos que incluye panes, pasteles, masas o bollerías y galletas. La característica más frecuentemente utilizada para su identificación es que se realizan con recetas basadas en harina de trigo. Esta definición debe ser ampliada para incluir a productos de panadería como los sin gluten, o el pan de centeno, que a pesar de ser fabricados con cereales diferentes siguen considerándose dentro de esta categoría. Los productos de panadería pueden ser también definidos como aquellos sometidos a un proceso de calentamiento (horneado o fritura), el cual produce en ellos cambios en su forma y estructura (Cauvain, Young, García Nogueiras & Galiano Gutiérrez, 2008).

Para la formulación de estos productos, se incorporan hidratos de carbono complejos y simples (harinas y azúcares), grasa, levadura, sal, leche y huevos, así como una variedad de aditivos alimentarios con función emulsionante, estabilizante, colorante o aromática. Los productos de panadería son estructuras porosas con una importante fase gaseosa atrapada en el interior y cuya extensión y tamaño de poros dependen, tanto de los ingredientes como del tipo de procesado. De este modo, los azúcares, junto con otros ingredientes, ayudan al desarrollo de la estructura durante el horneado o la fritura, y más específicamente a la retención de las burbujas de aire en el sistema, prolongando el período de expansión, lo que contribuye a un incremento del volumen en la mayoría de estos productos. En particular, el almidón juega un papel importante en la formación de la estructura, ya que determina la viscosidad de la masa durante el calentamiento, ayudando a retener los gases en expansión: dióxido de carbono (del impulsor), el aire (que se captura durante el batido) y el vapor (del agua añadida). La grasa también ayuda a incorporar aire durante la mezcla de la masa. Asimismo, la grasa contribuye a que el producto alcance una textura tierna, húmeda y suave, aumenta la palatabilidad del producto y mejora su masticabilidad (Corke, De Leyn, Nip, & Cross, 2008; Lai y Lin, 2006; Stauffer, 2005).

Tanto el pan como las galletas, bollería y pastelería son alimentos demandados por un gran porcentaje de consumidores apareciendo frecuentemente en su consumo diario.

#### 4. RESULTADOS

Durante los últimos años, se ha producido una proliferación de nuevas variedades en este conjunto de productos y, por tanto, la heterogeneidad es una característica intrínseca a la gran oferta de panes, galletas, y demás productos de bollería y pastelería (Cerdeño, 2008).

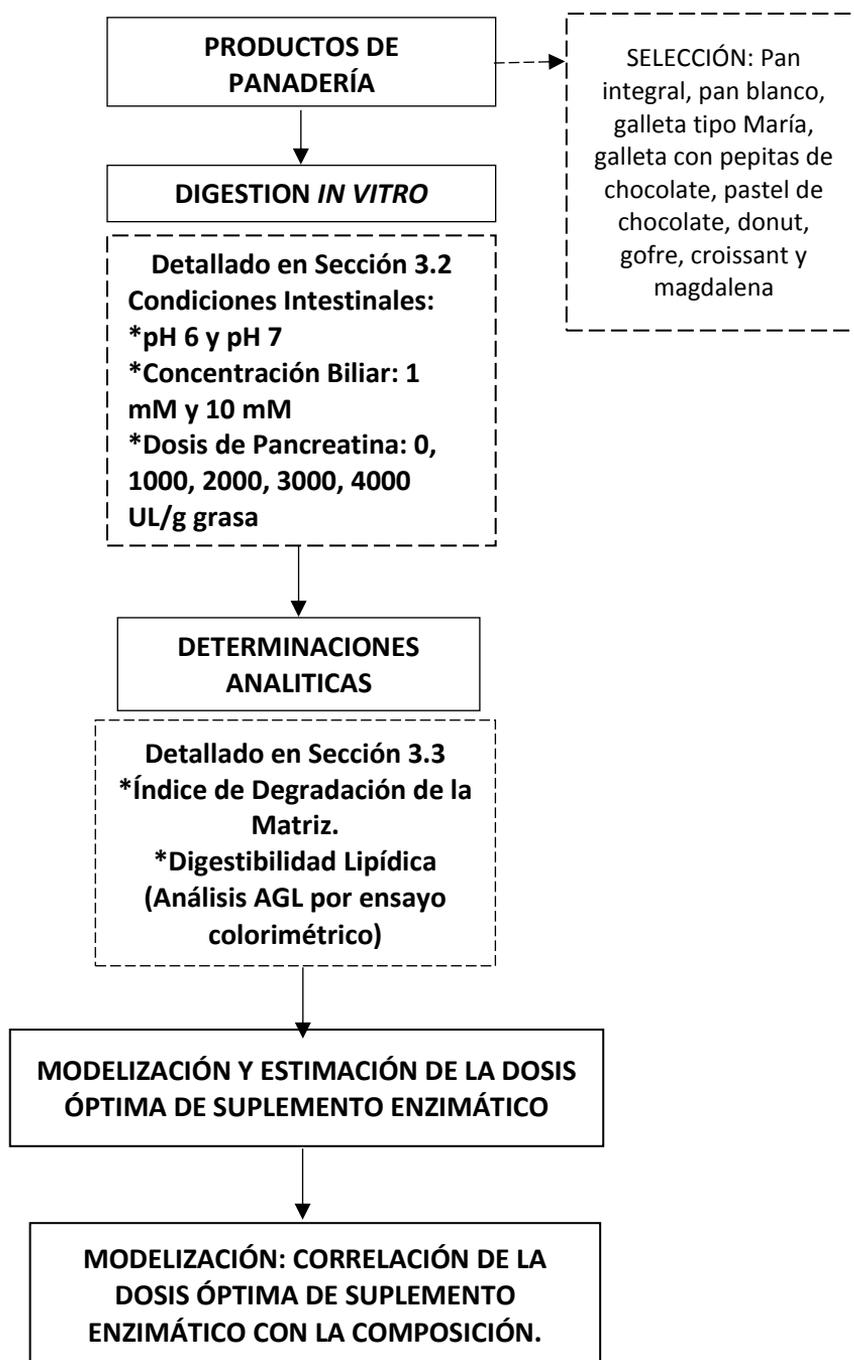
La elevada ingesta calórica, el tipo y la cantidad de grasa y azúcar utilizados en su formulación, han provocado un cierto rechazo entre muchos consumidores por las consecuencias que estos representan para la salud humana, y especialmente para la población infantil. A pesar de su "mala reputación", y según el informe del 2017 del consumo alimentario en España, el consumo de pan fue aproximadamente de 32.54 Kg /persona/año. En cuanto a los productos de bollería y pastelería, galletas, cereales, se consumen de media 13.45 kg por persona y año. La bollería y pastelería, así como las galletas son los productos más importantes dentro de esta categoría con 5.88 kg por persona y año y 5.21 kg por persona y año, respectivamente (MAPA, 2017). El mayor consumo de panadería se realiza durante el desayuno, aunque entre la población infantil también se extiende a la merienda. Debido a la creciente incidencia de la obesidad infantil, actualmente existe una tendencia creciente a reducir el contenido de grasas y azúcares de alto índice glucémico en este tipo de alimentos y/o reemplazarlos con otros ingredientes más saludables (Gómez, 2015).

Sin embargo, eliminar completamente las grasas de la dieta no es apropiado ni saludable, ya que son esenciales para el organismo humano. De hecho, en la mayoría de las dietas personalizadas destinadas a perder peso, se sugiere consumir al menos la cantidad mínima requerida de este macronutriente (de 20 a 35 % de la energía diaria requerida) (Latham, 2002; WHO & FAO, 2008). La grasa dietética contribuye al metabolismo energético, suministra los ácidos grasos esenciales al organismo y favorece la biodisponibilidad de los micronutrientes solubles en grasa, como ciertas vitaminas, entre otras funciones (Lamothe et al., 2012). Adicionalmente, la recomendación de reducir la ingesta de grasas no es extensiva a todas las condiciones nutricionales. Este sería el caso de los pacientes de fibrosis quística, a los que se les

recomienda la ingesta de alimentos con alto contenido de grasa porque favorece el estado nutricional del paciente ya que la eficiencia en la digestibilidad de la grasa se ve comprometida.

Partiendo del estudio europeo de hábitos nutricionales en niños con Fibrosis Quística desarrollado en el marco del proyecto MyCyFAPP, se ha obtenido un registro del consumo de alimentos de las ciudades participantes (Lisboa, Madrid, Valencia, Milán, Leuven y Rotterdam). El detalle de los grupos y subgrupos de alimentos más consumidos se han registrado en el artículo de Calvo-Lerma, et al. (2019). En él se enlistan los alimentos de panadería seleccionados para el presente estudio.

Así, este estudio tiene como objetivo el análisis de la influencia de los factores relacionados con el individuo (pH intestinal, concentración de sales biliares y del suplemento enzimático de pancreatina) sobre la digestibilidad lipídica. Es así como partiendo de los resultados de lipólisis obtenidos, se generará un modelo que describa la cinética de digestión de los lípidos para estimar la dosis óptima del suplemento enzimático necesaria para la adecuada digestión de productos de panadería en pacientes con insuficiencia pancreática. A continuación, se presenta, de forma esquematizada, el plan experimental diseñado para llevar a cabo este estudio (**Figura 4.12**):



**Figura 4.12.** Esquema del desarrollo del plan experimental para la evaluación de la digestión lipídica de productos de panadería.

#### 4.4.1. Influencia de las condiciones intestinales del individuo sobre el índice de degradación de la matriz y porcentaje de lipólisis en productos panadería

##### 4.4.1.1 *Influencia de distintas condiciones intestinales sobre el Índice de Degradación de la Matriz*

La **Tabla 4.10** detalla las diferencias en el índice de degradación de la matriz (IDM (%)) para distintos productos de panadería: pan integral, pan blanco, galleta tipo María, galleta con pepitas de chocolate, pastel de chocolate, donut, gofre, croissant y magdalena (ingredientes y composición en sección 3.1.4) tras ser digeridos en distintas condiciones intestinales de pH (6 y 7) y concentración biliar (1 y 10 mM).

Las características de textura y reológicas de los alimentos, la presencia de otros componentes como proteínas, lípidos y polisacáridos que no son almidón, y los cambios e interacciones que ocurren en ellos durante el procesamiento de los alimentos afectan en gran medida la digestibilidad de este tipo de matrices (Singh, Dartois, & Kaur, 2010). El resultado global de todos estos factores influye en el grado de desestructuración del alimento y por tanto en el índice de degradación de la matriz (IDM (%)). Los productos de panadería son productos con una estructura viscoelástica de fácil desestructuración física, como lo indican los elevados valores del IDM registrados (%). Así, el IDM alcanzado en la digestión de los productos de panadería estudiados fue superior al 80% en casi todos los casos independientemente de las condiciones intestinales, a excepción de tres productos: pan integral, pan blanco y galletas para los que no superó el 64%. Los valores registrados en estos productos pueden explicarse si se tienen en cuenta su composición y características. La grasa por ejemplo, que es uno de los ingredientes que ayuda en la incorporación de aire a la masa (Corke, De Leyn, Nip, & Cross, 2008; Lai y Lin, 2006; Stauffer, 2005) se encuentra en menor cantidad en el pan y en la galleta (pan integral: 4.4%, pan blanco: 1.5% galletas tipo María: 11.5%). El papel primordial de la grasa en las galletas es limitar la capacidad de las proteínas de la harina de trigo a formar redes de gluten. La

#### 4. RESULTADOS

interacción de la grasa con las proteínas durante el proceso de mezclado, limita la captación de agua de éstas. La hidratación de las proteínas con agua es justamente uno de los factores principales que contribuyen en la formación de la estructura del gluten y juega un papel fundamental en el desarrollo de las estructuras alveolares (Cauvain, Young, García, & Galiano Gutiérrez, 2008). Estos fenómenos que repercuten directamente en la menor cantidad de gas carbónico en las matrices (pan integral, pan blanco y galletas), podrían explicar el menor IDM de panes y galletas regular en comparación con matrices con mayor cantidad de estructuras alveolares. La mayor degradación del resto de productos podría estar relacionada con la presencia de otro tipo de ingredientes que no suelen formar parte de la formulación de panes y de este tipo de galletas. Así por ejemplo, la leche en polvo actúa como surfactante reduciendo la viscosidad y mejorando su digestibilidad (Afoakwa et al., 2007; Guo et al., 2017).

En el caso del pan integral también influye la fibra, cuya influencia en la viscosidad así como su interacción con los lípidos, disminuye la digestibilidad global lo que se traduce en un menor índice de degradación de la matriz (Pasquier et al. 1996).

**Tabla 4.10.** Índice de degradación de la matriz (IDM (%)) tras la digestión *in vitro* de productos de panadería digeridos a diferentes condiciones intestinales pH (6 o 7), concentración biliar (1 o 10 mM) y pancreatina 2000 UL/g grasa.

Productos de Panadería	Índice de degradación de la matrix (%)			
	pH 6		pH 7	
	Bilis 1 mM	Bilis 10 mM	Bilis 1 mM	Bilis 10 mM
Pan Integral (%)	58.4 ±0.9aA	64.19 ±0.98 bB	59.7 ±0.8 aA	64 ±2 bB
Pan blanco (%)	59 ±2 aA	60.7 ±0.7 abA	61.6 ±0.2 abA	63.3 ±1.3 bAB
Galleta tipo María (%)	60 ±3 aA	61.0 ±1.5 aA	59.8 ±0.9 aA	60.3 ±0.7 aA
Galleta con pepitas de chocolate (%)	81 ±2 dB	81.9 ±0.6 aC	78.8 ±0.7 aB	79.0 ±0.5 aC
Pastel de chocolate (%)	84.9 ±0.4 aB	88.3 ±0.6 aD	85 ±2 aC	87.0 ±1.4 aD
Donut (%)	85.7 ±1.3aB	89.6 ±0.7aD	85 ±2aC	87.270 ±1.004aD
Gofre (%)	87 ±4aBC	92.2 ±0.7aE	87.2 ±1.9 aC	91.0 ±0.4aE
Croissant (%)	86 ±5 aB	88.7 ±0.4 aD	85.2 ±1.8 aC	87 ±3 aD
Magdalena (%)	92 ±3 aB	92.37 ±0.08 aE	90.90 ±0.04 aD	92.54 ±1.08 aE

Letra minúscula: relacionan las diferencias estadísticas obtenidos entre las condiciones intestinales evaluadas para cada producto. Letras mayúsculas: relacionan las diferencias significativas por cada condición intestinal entre todos los productos digeridos.

#### 4.4.1.2 Influencia de las condiciones intestinales en la digestibilidad de los lípidos.

La extensión de la lipólisis (%) de diferentes productos de panadería bajo distintas condiciones intestinales de pH y concentración biliar, y una dosis fija de suplemento de 2000 UL/g grasa, se muestra en la **Figura 4.13**. En relación al efecto del pH intestinal y la concentración biliar; los resultados muestran que un aumento en la

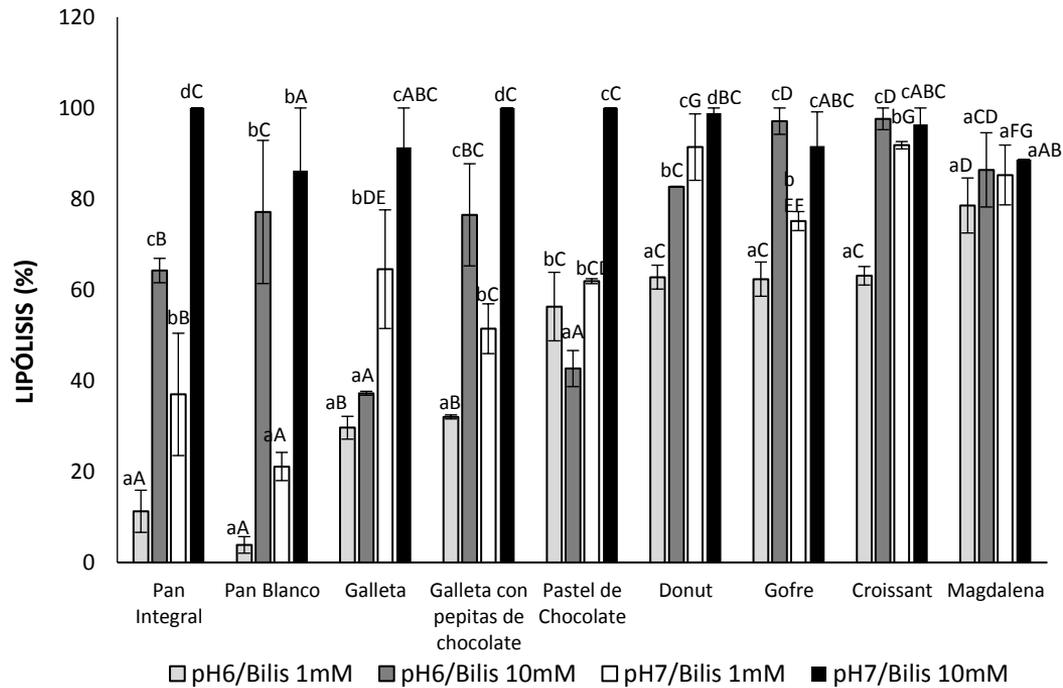
#### 4. RESULTADOS

concentración biliar de 1 a 10 mM, así como en el pH, produjeron, por lo general, un incremento en el porcentaje de la lipólisis independientemente del pH intestinal.

Una excepción a este comportamiento, se observó sin embargo en ciertos productos como croissant, donut, gofre y magdalena. En cuanto a gofre y croissant, se obtuvo la misma extensión de la lipólisis a pH 6 y concentración biliar 10 mM que a pH 7 y concentración biliar 10 mM. En donut, a pH 7, un incremento de la concentración biliar no supuso una mejoría en la extensión de la lipólisis. En la magdalena, la digestibilidad de los lípidos no se vio afectada por las condiciones intestinales, con una lipólisis de entorno al 85% a 2000 UL/g de grasa independientemente del pH y la concentración biliar. Este resultado apoya el hecho de que este producto sea una de los más recomendados para pacientes con FQ. La lipólisis alcanzada en las magdalenas podría estar relacionada con el tipo y la cantidad de grasa utilizada en su formulación. El aceite de girasol es un aceite líquido poliinsaturado, que facilita su digestión en comparación a otros lípidos como el aceite de soja, que contiene menos proporción de ácidos poliinsaturados, o palma y coco, que tienen una mayor proporción de ácidos saturados y monoinsaturados (Giang et al., 2016; Voituriez, 1997). Es importante recordar que las sales biliares actúan sobre el glóbulo graso, emulsionándolo y desplazando los componentes ubicados en la superficie interfacial, proteínas entre otras, favoreciendo así el acceso de lipasa y co-lipasa a la misma para que se pueda iniciar la lipólisis. Una vez que las enzimas han iniciado la hidrólisis lipídica, las sales biliares ayudan a transportar los productos de la lipólisis (principalmente ácidos grasos libres y monoglicéridos) desde la superficie interfacial a la fase acuosa circundante (fluido digestivo). Por último, pero no menos importante, promueven la micela de los ácidos grasos libres y los monoglicéridos para su absorción efectiva en la mucosa intestinal (Maldonado-Valderrama et al., 2011).

En un estudio realizado por Calvo-Ierma, Fornés-Ferrer, Heredia, & Andrés, (2018) se observó que cuando los alimentos evaluados tenían un contenido relativamente bajo de grasa, la combinación con una matriz rica en carbohidratos conduce a una

disminución significativa de la extensión de la lipólisis. Estos resultados son coherentes con los valores de lipólisis en condiciones de FQ (pH 6 bilis 1 mM) registrados en los dos panes evaluados cuyo contenido de grasa es menor al de los otros productos (4.4% pan integral 1.5% pan blanco).



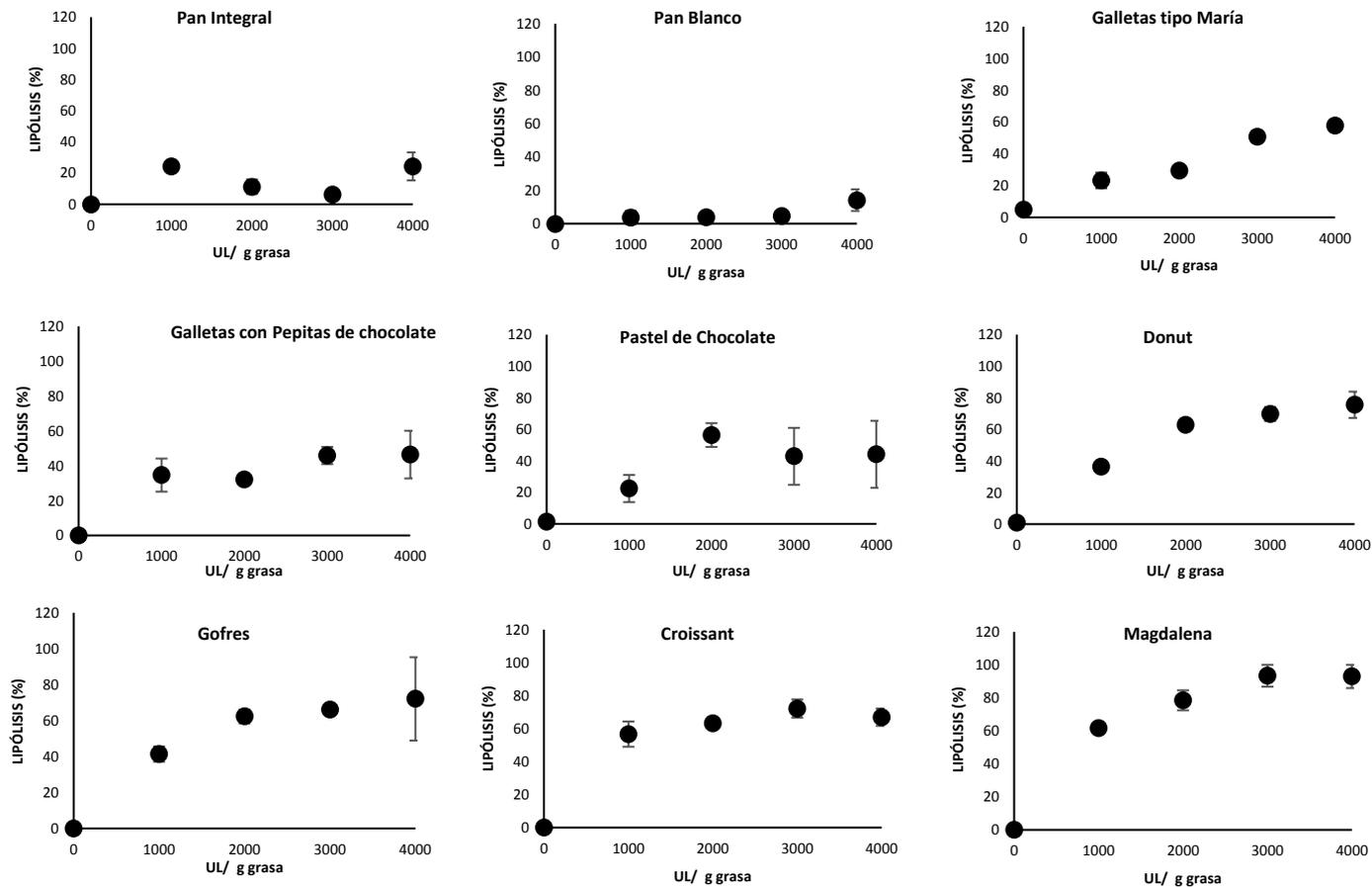
**Figura 4.13.** Lipólisis (%) después de la digestión *in vitro* con una concentración de pancreatina fija (2000 UL / g de grasa) y diferentes combinaciones de pH intestinal y concentraciones de bilis (pH 6 o 7, concentración de sales biliares 1 o 10 mM).

Letra minúscula: relacionan las diferencias estadísticas obtenidos entre las condiciones intestinales evaluadas para cada producto. Letras mayúsculas: relacionan las diferencias significativas por cada condición intestinal entre todos los productos digeridos.

#### 4.4.2. Estimación de la Dosis Óptima Teórica (DOT) del suplemento enzimático para una adecuada digestión de los productos de panadería.

Los resultados derivados de los estudios de digestión *in vitro* ponen de manifiesto que la dosis de suplemento enzimático que optimiza la digestión de las grasas en condiciones intestinales FQ dependen no solo de la cantidad de grasa en el medio de digestión sino también de otros factores inherentes a los alimentos que influyen en los procesos de emulsificación, accesibilidad y actividad de las enzimas digestivas y de la liberación de ácidos grasos. Es por ello que el objetivo final de este estudio, es utilizar los resultados experimentales para determinar la dosis óptima teórica (DOT) para la selección de alimentos estudiados.

La **Figura 4.14** muestra los resultados de extensión de la lipólisis obtenida a diferentes dosis de enzima (0, 1000, 2000, 3000 y 4000 UL / g de grasa) y en condiciones intestinales FQ (pH6 y 1 mM). En la **Figura 4.14** muestra que, la mayoría de productos presenta una relación dosis dependiente, en los que se alcanza un valor máximo de lipólisis (forma asintótica) a partir del cual no se obtienen mejores resultados con un aumento de la dosis de pancreatina (Donut, Gofres, Croissant, Magdalena). Sin embargo, hay productos (como es el caso de las galletas) en los que, al menos en el intervalo ensayado, la extensión de la lipólisis aumenta de manera lineal y no se llega a alcanzar un valor asintótico. Asimismo, llama la atención el caso del pan (integral y blanco) que son productos con bajo porcentaje de grasa, y en los que se obtiene un porcentaje de lipólisis bajo independientemente de la dosis de pancreatina empleada.



**Figura 4.14.** Lipólisis (%) en productos de panadería sometidos a digestión *in vitro* en condiciones intestinales de FQ (pH6 y concentración biliar 1 mM) a distintas dosis enzimáticas (0, 1000, 2000, 3000, 4000 UL/ g grasa).

En base a la naturaleza de los datos experimentales, los resultados para cada alimento se ajustaron a un modelo de dosis-respuesta asintótica con dos parámetros mediante métodos estadísticos bayesianos utilizando la siguiente función asintótica:

$$f(x) = d * (1 - e^{-\frac{x}{g}}) \quad \text{Ecuación (5)}$$

donde,

$f(x)$  = extensión de la lipólisis (%)

$d$  = representa el valor asintótico, es decir al valor máximo " $f(x)$ " (extensión de lipólisis (%)). Corresponde al límite de la función o punto de saturación.

$g$  = representa la concentración enzimática de saturación. Cuanto mayor es el valor de " $g$ ", menor es la velocidad de saturación.

$x$  = representa la dosis de suplementación enzimática (UL / g grasa)

Los dos parámetros ( $g$  y  $d$ ) estimados para cada producto de panadería estudiado se muestran en la **Tabla 4.11**

**Tabla 4.11.** Parámetros  $d$  y  $g$  del modelo propuesto

ALIMENTO	PARÁMETROS DEL MODELO	
	$d$ (Asíntota)	$g$ (concentración enzimática de saturación)
Pan Integral	45.4	2791.7
Pan blanco	21.4	2784.6
Galleta tipo María	81.2	2063.4
Galleta con pepitas de chocolate	60.2	1800.4
Pastel de chocolate	63.8	1739.3
Donut	82.2	1548.5
Gofre	75.8	1250.5
Croissant	69.2	610.8
Magdalena	94.2	973.0

## 4. RESULTADOS

### 4.4.2.1 Criterios para establecer la Dosis Óptima Teórica (DOT).

Si bien a partir de los parámetros obtenidos podría predecirse la dosis de enzimas necesaria para alcanzar un determinado valor de lipólisis, la dosis óptima teórica (DOT) se llevó a cabo utilizando los valores predichos por la ecuación 5 y aplicando los siguientes criterios clínicos:

1. La TOD asignada será 2000 en lugar de 1000 si la diferencia entre el porcentaje de lipólisis utilizando 1000 y 2000 aumenta  $> 10\%$  en relación al valor máximo (asíntota, valor de  $d$ )
2. La TOD asignada será 3000 en lugar de 2000 si la diferencia entre el porcentaje de lipólisis utilizando 2000 y 3000 aumenta entre un 5 y un 10% en relación al valor máximo (asíntota, valor de  $d$ ).
3. La TOD asignada será 4000 en lugar de 3000 si la diferencia entre el porcentaje de lipólisis utilizando 3000 y 4000 aumenta entre un 5-10% en relación con la asíntota ( $d$ ). Si el alimento tiene alta contenido de grasa, y solo si el valor asintótico de la lipólisis no se alcanza a 4000 LU / g de grasa.

La **Tabla 4.12** resume los valores de lipólisis predichos por el modelo para cada una de las dosis de suplemento, así como los incrementos de lipólisis y la correspondiente DOT (UL/g producto) finalmente asignada como resultado de aplicación de los criterios clínicos.

**Tabla 4.12.** Parámetros del modelo de predicción de lipólisis en productos de panadería y Dosis Óptima Teórica estimada por aplicación de criterios clínicos.

Alimento	Parámetros del modelo		Lipólisis estimada a diferentes dosis enzimática (UL/g grasa)				Aplicación de criterios clínicos: Incremento de Lipólisis (%)			DOT (UL/g producto)
	d (asíntota)	g (concentración enzimática de saturación)	1000	2000	3000	4000	Diferencia 2000 a 1000	Diferencia 3000 a 2000	Diferencia 4000 a 3000	
	Pan Integral	45.4	2791.7	14.3	23.2	29.6	34.2	19.6	14.1	
Pan Blanco	21.4	2784.6	6.5	10.7	13.8	15.8	19.8	14.5	9.6	<b>30</b>
Galletas tipo María	81.2	2063.4	31.9	50.3	62.0	69.1	22.6	14.4	8.7	<b>345</b>
Galletas pepitas chocolate	60.2	1800.4	26.7	40.3	48.2	52.8	22.5	13.2	7.6	<b>458.4</b>
Pastel de Chocolate	63.8	1739.3	29.1	43.5	51.9	56.8	22.6	13.1	7.7	<b>438</b>
Donut	82.2	1548.5	39.2	59.5	70.2	75.8	24.7	13.0	6.8	<b>488</b>
Gofre	75.8	1250.5	42.3	60.2	68.4	72.2	23.6	10.8	5.1	<b>819</b>
Croissant	69.2	610.8	55.7	66.2	68.6	69.2	15.2	3.5	0.8	<b>344</b>
Magdalena	94.2	973.0	60.7	82.0	89.6	92.5	22.6	8.1	3.0	<b>448</b>

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que más allá del contenido en grasa, el resto de componentes, es decir su composición global en macronutrientes, presenta un impacto significativo sobre la digestión de un alimento. De ahí, que la dosis óptima teórica de suplemento enzimático que maximiza la extensión de la lipólisis sea diferente incluso para alimentos con el mismo contenido de lipídico.

## 4. RESULTADOS

### 4.4.3. Correlación de la Dosis Óptima Teórica (DOT) de pancreatina con la composición de los productos de panadería.

Con el objetivo de correlacionar la dosis óptima estimada para cada alimento con sus características composicionales, se aplicó un modelo de regresión lineal mixta incluyendo como variables del estudio los porcentajes de grasa, proteína y carbohidratos como variables continuas, y la estructura de la matriz alimentaria como variable categórica con dos niveles (1 = gomosa y 0 = vítreo) (**Tala 4.13**). La **Tabla 4.14** resume los factores considerados con su estimación para la obtención de la ecuación predictiva de la DOT.

**Tabla 4.13.** Variables consideradas en el modelo de correlación de la DOT con la composición y estructura.

ALIMENTO	Carbohidratos (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Estructura	DOT (UL/g grasa)	DOT (UL/g producto)
Pan Integral	48.50	4.40	8.40	gomosa (1)	2000	88
Pan blanco	52.00	1.50	9.50	gomosa (1)	2000	30
Galleta	76.30	11.50	6.70	vítreo (0)	3000	345
Galleta con chispas de chocolate	64.30	22.92	6.20	vítreo (0)	2000	458.4
Pastel de chocolate	39.60	21.90	6.50	gomosa (1)	2000	438
Donut	42.00	24.40	6.00	gomosa (1)	2000	488
Gofre	53.7	27.3	7.6	gomosa (1)	3000	819
Croissant	55.00	17.20	7.50	gomosa (1)	2000	344
Magdalena	39.90	22.40	6.10	gomosa (1)	2000	448

**Tabla 4. 14.** Coeficientes del modelo de regresión mixta lineal y p-valor

Factores	coeficiente	p-valor
Término Independiente	8.13	0.001
Carbohidratos	-0.035	0.058
Grasa	-0.134	0.19
Proteína	-0.253	0.128
Factor (estructura de la matriz) gomosa	-0.443	0.071
Carbohidratos:grasa	0.001	0.193
Grasa:proteína	0.022	<0.001
R <sup>2</sup>	0.9416	
Ajuste R <sup>2</sup>	0.9295	

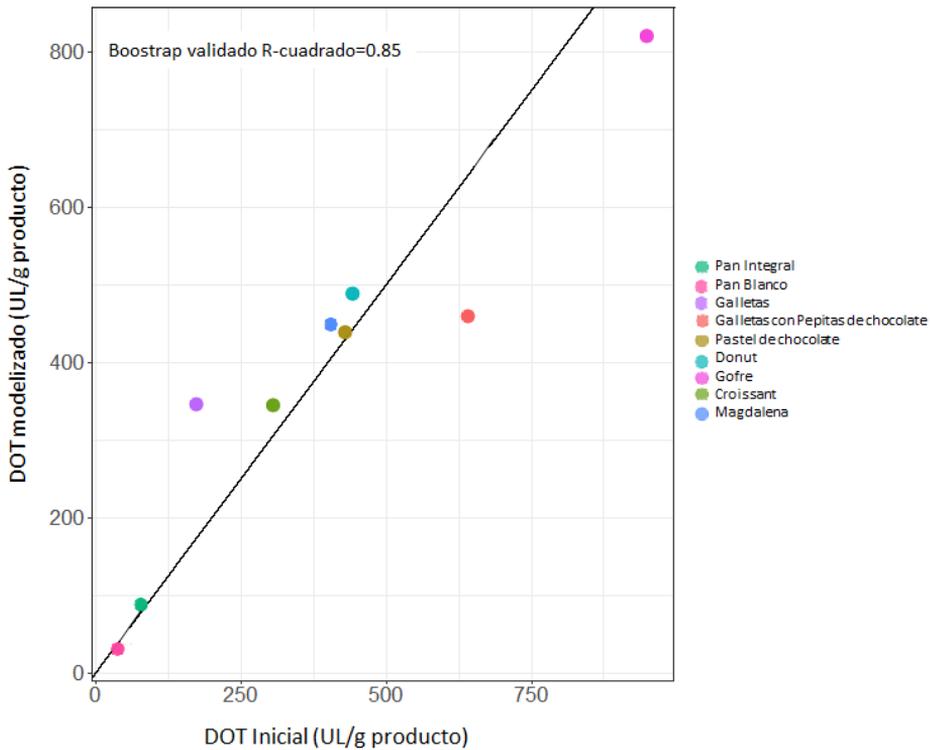
En base a estos parámetros, el modelo de regresión mixta lineal para la predicción de la DOT en productos de panadería se expresa según la siguiente ecuación:

$$\ln \text{DOT} = 8.13 - 0.035 \cdot \text{Carbohidratos (\%)} - 0.134 \cdot \text{Grasa (\%)} - 0.253 \cdot \text{Proteína(\%)} + (0.001 \cdot \text{carbohidratos} \cdot \text{grasa}) - (0.022 \cdot \text{grasa} \cdot \text{proteína}) - 0.443 \cdot \text{estructura}$$

Posteriormente a la obtención de los parámetros del modelo se procedió a la pre-validación del mismo mediante la herramienta Bootstrap de R<sup>2</sup>. Bootstrap es un tipo de enfoque estadístico que permite generar muchos datos aleatorios para probar una ecuación predictiva de un modelo. Luego, estos datos se utilizan para hacer predicciones con la ecuación del modelo. Si el modelo es adecuado para nuevos conjuntos de datos, se obtendría un Bootstrap R<sup>2</sup> altamente validado. Por el contrario, los modelos que solo son precisos para los datos utilizados para su modelado, se sobreestiman y el Bootstrap de R<sup>2</sup> validado es bajo. En otras palabras, el Bootstrap de R<sup>2</sup> validado indica si el modelo es adecuado para hacer buenas predicciones cuando

## 4. RESULTADOS

se usan datos distintos a los utilizados para crear el modelo. El  $R^2$  del modelo obtenido fue de 0.85, lo que indica que el modelo obtenido resulta una herramienta útil para estimar la DOT de productos de esta categoría siempre y cuando se conozca su composición. La **Figura 4.15** muestra la correlación entre los datos experimentales y los datos predichos.



**Figura 4.15.** Correlación entre los valores experimentales de DOT expresados en UL / g de producto versus los valores pronosticados de DOT por el modelo para productos de panadería.

Finalmente y a modo de ejemplo, en la **Tabla 4.15** se muestra la aplicación del modelo a tres productos de panadería distintos a los estudiados mediante simulación de la digestión *in vitro*. Concretamente, se han seleccionado productos comerciales con tres contenidos diferentes de grasa: bajo (pan de centeno), medio (rosquillas) y alto (ensaimada). La información nutricional de los tres productos se obtuvo de la Base de datos española de composición de los alimentos: <http://bedca.net/bdpub/>.

**Tabla 4.15.** Aplicación del modelo para la obtención de DOT en una selección de productos de panadería.

<b>Predicción en otros alimentos</b>			
	<b>Pan de Centeno</b>	<b>Rosquilla</b>	<b>Ensaimada</b>
CH (%)	45.8	49.3	38.4
Grasa (%)	1	13.2	31.3
Proteína (%)	6.21	7.8	5.7
Estructura	1	0	1
<b>DOT (UL/g producto)</b>	<b>95.7</b>	<b>264.6</b>	<b>341.6</b>

### 4.4.4. Conclusiones:

La fácil desestructuración matricial durante la digestión de los productos de panadería influye positivamente en una mayor digestibilidad.

En condiciones intestinales alteradas, se observa una mayor digestibilidad lipídica en aquellos formulados con aceite de girasol probablemente por presentar un perfil más insaturado en comparación con otras grasas. Este hecho se ha observado en el caso de la magdalena, formulada exclusivamente con aceite de girasol (20%). En ese sentido, los productos formulados con este tipo de grasa serían los más recomendables para pacientes con fibrosis quística.

Ha sido posible desarrollar, a partir de los datos experimentales un modelo predictivo de la dosis óptima de suplemento enzimático para productos de panadería en función de la composición nutricional y estructura matricial. La validez estadística de este modelo, avala su aplicación para estimar la dosis óptima en productos de la misma categoría.

## **5. OBSERVACIONES FINALES**



El modelo de digestión *in vitro* desarrollado en este estudio ha permitido analizar tanto la influencia de los factores inherentes a las matrices seleccionadas como de las condiciones intestinales sobre la digestibilidad de nutrientes. Tanto la composición nutricional, propiedades fisicoquímicas, e interacciones entre macro y micronutrientes juegan un papel determinante en la digestibilidad lipídica y en la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos. Los factores fisiológicos que afectan en mayor medida a la lipólisis, son el pH intestinal y la concentración de sales biliares, siendo su papel más o menos determinante según la matriz alimentaria y sus características. Los resultados obtenidos sugieren revisar los criterios actualmente utilizados en la terapia de sustitución enzimática que, en el mejor de los casos, únicamente considera el contenido de grasa de los alimentos. Las evidencias científicas generadas contribuyen, por un lado, a la generación de conocimiento sobre la digestión de alimentos y por otro, aportan información útil de fácil aplicación en la terapia de sustitución enzimática en pacientes de fibrosis quística. Asimismo, la metodología desarrollada, validada en un estudio *in vivo* como parte del proyecto en el que se enmarca esta tesis, puede resultar útil para abordar el tratamiento de otras enfermedades que cursen insuficiencia pancreática exocrina.

Por último promover el consumo de alimentos fuente de lípidos saludables, resulta de vital importancia dentro del marco del tratamiento de estos pacientes; por lo que no solo la elección de los alimentos en base a su contenido calórico sino también el conocimiento sobre cómo se digieren resulta esencial para la prevención de las complicaciones relacionadas con la salud nutricional del individuo.

## 5. *OBSERVACIONES FINALES*

Asimismo, conocer las características matriciales de los alimentos y su comportamiento bajo diferentes condiciones gastrointestinales, son sin duda factores a tener en cuenta para el diseño de nuevos alimentos que se ajusten a las necesidades nutricionales específicas de individuos que cursan patologías en las que se encuentra comprometida la digestión.

## **6. BIBLIOGRAFIA**



- Afoakwa, E. O., Paterson, A., & Fowler, M. (2007). Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate - a review. *Trends in Food Science and Technology*, 18(6), 290–298.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Vieira, J. (2009). Microstructure and mechanical properties related to particle size distribution and composition in dark chocolate. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(1), 111–119.
- Almaas, H., Cases, A., Devold, T. G., Holm, H., Langsrud, T., Aabakken, L., ... Vegarud, G. E. (2006). In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International Dairy Journal*, 16, 961–968.
- Almoosawi, S., Tsang, C., Ostertag, L. M., Fyfe, L., & Al-Dujaili, E. A. S. (2012). Differential effect of polyphenol-rich dark chocolate on biomarkers of glucose metabolism and cardiovascular risk factors in healthy, overweight and obese subjects: a randomized clinical trial. *Food & Function*, 3(10), 1035.
- Altan, A., McCarthy, K. L., Tikekar, R., McCarthy, M. J., & Nitin, N. (2011). Image Analysis of Microstructural Changes in Almond Cotyledon as a Result of Processing. *Journal of Food Science*, 76(2), 212–221.
- Amin, T., & Thakur, M. (2014). A Comparative Study on Proximate Composition , Phytochemical Screening , Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Linum usitatissimum* L . ( flaxseeds ). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(4), 465–481.
- Amin, R., & Ratjen, F. (2014). Emerging drugs for cystic fibrosis. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 19(1), 143–155.
- Andersen, P. C., Hill, K., Gorbet, D. W., & Brodbeck, B. V. (1998). Fatty Acid and Amino Acid Profiles of Selected Peanut Cultivars and Breeding Lines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 11(2), 100–111.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., Mcdonald, S., Robards, K., & Robards, K. (2001). Methods for testing antioxidant activity.
- Argyri, K., Komaitis, M., & Kapsokefalou, M. (2006). Iron decreases the antioxidant capacity of red wine under conditions of in vitro digestion. *Food Chemistry*, 96(2), 281–289.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Armand, M. (2007). Lipases and lipolysis in the human digestive tract : where do we stand ? *Current Opinion Nutrition and Metabolic Care*, 10, 156–164.
- Armand, M., Borel, P., Pasquier, B., Dubois, C., Senft, M., Andre, M., ... Lairon, D. (1996). Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *American Physiological Society*, 34, G172–G183.
- Armand, M., Borel, P., Peyrot, J., Salducci, J., Lafont, H., & Lairon, D. (1994). Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *American Journal of Physiology*, 266, G372–G381.
- Armand, M., Hamosh, M., Philpott, J. R., Resnik, A. M. Y. K., Rosenstein, B. J., Hamosh, A. D. A., ... Al, A. E. T. (2004). Gastric Function in Children with Cystic Fibrosis : Effect of Diet on Gastric Lipase Levels and Fat Digestion. *Pediatric Research*, 55(3), 457–465.
- Arterburn, L. M., Hall, E. B., & Oken, H. (2006). Distribution , interconversion , and dose response of n-3 fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1467S–1476S.
- Arya, S. S., Salve, A. R., & Chauhan, S. (2016). Peanuts as functional food: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 31–41.
- Asensio-Grau, A., Calvo-Lerma, J., Heredia, A., & Andrés, A. (2018). Fat digestibility in meat products: influence of food structure and gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 0(0), 1–10.
- Asensio-Grau, A., Peinado, I., Heredia, A., & Andrés, A. (2018). Effect of cooking methods and intestinal conditions on lipolysis, proteolysis and xanthophylls bioaccessibility of eggs. *Journal of Functional Foods*, 46(May), 579–586.
- Barrett, K. E. (2018). Gastrointestinal Physiology. *Current Gastroenterology Reports*, 136–152.
- Bau, H. M., Villaume, C., Chandrasiri, V., Nicolas, J. P., & Mejean, L. (1994). Effet de la germination sur la composition et la valeur nutritive des graines de soja chez le rat. *Sciences Des Aliments*, 14(5), 683–689.
- Bauer, E., Jakob, S., & Mosenthin, R. (2005). Principles of physiology of lipid

- digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(2), 282–295.
- Bax, M. L., Aubry, L., Ferreira, C., Daudin, J. D., Gatellier, P., Rémond, D., & Santé-Lhoutellier, V. (2012). Cooking temperature is a key determinant of in vitro meat protein digestion rate: Investigation of underlying mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2569–2576.
- Beckett, S. T. (2008). *The Science of chocolate. The Royal Society of Chemistry* (2nd. Ed). York, UK.
- Beisson, F., Ferté, N., Voultoury, R., & Arondel, V. (2001). Large scale purification of an almond oleosin using an organic solvent procedure. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(7–8), 623–630.
- Belli, D. C., Levy, E., Darling, P., Leroy, C., Lepage, G., Giguère, R., & Roy, C. C. (1987). Taurine Improves the Absorption in Patients With Cystic Fibrosis. *Pediatrics*, 80(4), 517–523.
- Bernbäck, S., Bläckberg, L., & Hernell, O. (1990). The complete digestion of human milk triacylglycerol in vitro requires gastric lipase , pancreatic colipase-dependent lipase , and bile salt-stimulated lipase. *Journal of Clinical Investigation*, 85, 1221–1226.
- Boden, G. (1997). Role of Fatty Acids in the Pathogenesis of Insulin Resistance and NIDDM. *Diabetes*, 46(July 1996), 3–10.
- Boisen, S., & Eggum, B. . (1991). Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 4, 141–162.
- Borgström, B., & Erlanson, C. (1973). Pancreatic Lipase and Co-Lipase: Interactions and effects of bile salts and other detergents. *European Journal of Biochemistry*, 37(1), 60–68.
- Borgström, B., & Erlanson, C. (1978). Interactions of serum albumin and other proteins with porcine pancreatic lipase. *Gastroenterology*, 75(3), 382–386.
- Borowitz, D., Baker, R. D., Stallings, V., Bachrach, L. K., Beall, R. J., Ph, D., ... Sokol, R. J. (2002). Consensus Report on Nutrition for Pediatric Patients With Cystic Fibrosis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 35, 246–259.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Borowitz, D., Gelfond, D., Maguiness, K., Heubi, J. E., & 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.
- Bourassa, P., Côté, R., Hutchandani, S., Samson, G., & Tajmir-Riahi, H. A. (2013). The effect of milk alpha-casein on the antioxidant activity of tea polyphenols. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *128*, 43–49.
- Bourre, J. M. (2006). EFFECTS OF NUTRIENTS ( IN FOOD ) ON THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE NERVOUS SYSTEM: UPDATE ON DIETARY REQUIREMENTS FOR BRAIN . PART 2 : MACRONUTRIENTS. *Journal of Nutrition Health and Aging*, *10*(5), 386–399.
- Bray, G. A., Paeratakul, S., & Popkin, B. M. (2004). Dietary fat and obesity : a review of animal , clinical and epidemiological studies. *Physiology & Behavior*, *83*, 549–555.
- Bruno, M. J., Haverkort, E. B., Tytgat, G. N., & Van Leeuwen, D. . (1995). Maldigestion associated with exocrine pancreatic insufficiency: implications of gastrointestinal physiology and properties of enzyme preparations for a cause-related and patient-tailored treatment. *American Journal of Gastroenterology*, *90*(9).
- Burdge, G. C., & Wootton, S. A. (2002). Conversion of a -linolenic acid to eicosapentaenoic , docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *British Journal of Nutrition*, *88*, 411–420.
- Calder, P. C. (2010). Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes. *Nutrients*, *2*, 355–374.
- Calvo-Lerma, J., Hulst, J., Boon, M., Martins, T., Ruperto, M., Colombo, C., ... & Garriga, M. (2019). The Relative Contribution of Food Groups to Macronutrient Intake in Children with Cystic Fibrosis: A European Multicenter Assessment. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*.
- Calvo-Lerma, J., Hulst, J. M., Asseiceira, I., Claes, I., Garriga, M., Colombo, C., ... & Ruperto, M. (2017). Nutritional status, nutrient intake and use of enzyme supplements in paediatric patients with Cystic Fibrosis; a European multicentre study with reference to current guidelines. *Journal*

- of Cystic Fibrosis*, 16(4), 510–518.
- Calvo-Ilerma, J., Fornés-Ferrer, V., Heredia, A., & Andrés, A. (2018). In Vitro Digestion of Lipids in Real Foods : Influence of Lipid Organization Within the Food Matrix and Interactions with Nonlipid Components. *Journal of Food Science*, 83(10), 2629–2637.
- Calvo-Lerma, J., Hulst, J., Boon, M., Martins, T., Ruperto, M., Colombo, C., ... Ribes-Koninckx, C. (2019). The Relative Contribution of Food Groups to Macronutrient Intake in Children with Cystic Fibrosis: A European Multicenter Assessment. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*.
- Campbell, G., Arcand, Y., & Mainville, I. (2011). Development of a tissue mimicking stomach construct for in-vitro digestive system. *In Plant Bioactives Research in Canada. Canada-United Kingdom Gut and Health Workshop, Saint-Hyacinthe, QC, Canada*, 24–25.
- Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 94–102.
- Carey, M. C., Small, D. M. and Bliss, C. M. (1983). Digestion and absorption of fat. *Annual Review of Physiology*, 45, 651–677.
- Carey, M. C., & Hernell, O. (1992). Digestion and absorption of fat. *Seminars in Gastrointestinal Disease*, 3, 189–208.
- Carrière, F., Renou, C., Lopez, V., De Caro, J., Ferrato, F., Lengsfeld, H., ... Verger, R. (2000). The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals. *Gastroenterology*, 119(4), 949–960.
- Carswell, K. A., Vincent, R. P., Belgaumkar, A. P., Sherwood, R. A., Amiel, S. A., Patel, A. G., & Roux, C. W. (2014). The Effect of Bariatric Surgery on Intestinal Absorption and Transit Time. *Obesity Surgery*, 24(5), 796–805.
- Casellas, F., Aparici, A., Casaus, M., & Rodri, P. (2013). Self-perceived lactose intolerance and lactose breath test in elderly. *European Geriatric Medicine*, 4, 372–375.
- Cauvain, S. P., Young, L. S., García Nogueiras, A., & Galiano Gutiérrez, A.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- (2008). *Productos de panadería: ciencia, tecnología y práctica*. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
- Chatterton, D. E. W., Heegaard, C. W., & Sørensen, E. S. (2004). In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Research on biological functions. *Food Science & Technology*, *15*, 373–383.
- Chow, C. K. (2000). *Fatty Acids in Foods and their Health implications*. New York: CRC Press.
- Clarke, L. L., Stien, X., & Walker, N. M. (2001). Intestinal bicarbonate secretion in cystic fibrosis mice. *JOP : Journal of the Pancreas*, *2*(4), 263–267.
- Coles, L. T., Moughan, P. J., & Darragh, A. J. (2005). In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. *Animal Feed Science and Technology*, *124*, 421–444.
- Colombo, C., Arlati, S., Curcio, L., Maiavacca, R., & Garatti, M. (1988). Effect of Taurine Supplementation on Fat and Bile Acid Absorption in Patients with Cystic Fibrosis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *23*, 151–156.
- Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. I., & Williamson, G. (2008). Cocoa and health: A decade of research. *British Journal of Nutrition*, *99*(1), 1–11.
- Corke, H., De Leyn, I., Nip, W. k., & Cross, N. . (2008). *Bakery products: science and technology*. Jhon Wiley & Sons.
- Costantini, L., Lukšič, L., Molinari, R., Kreft, I., Bonafaccia, G., Manzi, L., & Merendino, N. (2014). Development of gluten-free bread using tartary buckwheat and chia flour rich in flavonoids and omega-3 fatty acids as ingredients. *Food Chemistry*, *165*, 232–240.
- Cummings, J. H. (1981). Short chain fatty acids in the human colon. *Gut*, *22*, 763–779.
- Damame, S. V., Chavan, J. K., & Kadam, S. S. (1990). Effects of roasting and storage on proteins and oil in peanut kernels. *Plant Foods for Human Nutrition*, *40*(2), 143–148.
- Davenport, H. W. (1982). *Physiology of the Digestive tract: an Inductory Text* (Medical Pu). Chicago: Year Book.

- Davis, P. J., & Williams, S. C. (1998). Protein modification by thermal processing. *Allergy*, 53(46), 102–105.
- Day, J. P. R., Rago, G., Domke, K. F., Velikov, K. P., & Bonn, M. (2010). Label-Free Imaging of Lipophilic Bioactive Molecules during Lipid Digestion by Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microspectroscopy, 132(4), 8433–8439.
- DeBAUN, R. M., & Connors, W. M. (1954). Relationship Between in Vitro Enzymatic Digestibility And in Vivo Protein Evaluation of Powdered Whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2(10), 524–526.
- Denigris, S. J., Hamosh, M., Kasbekar, D. K., Lee, T. C., & Hamosh, P. (1988). Lingual and gastric lipases : species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 959, 38–45.
- Devraj, R., Williams, H. D., Warren, D. B., Mullertz, A., Porter, C. J. H., & Pouton, C. W. (2013). In vitro digestion testing of lipid-based delivery systems : Calcium ions combine with fatty acids liberated from triglyceride rich lipid solutions to form soaps and reduce the solubilization capacity of colloidal digestion products. *International Journal of Pharmaceutics*, 441(1–2), 323–333.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1473–1482.
- Dickinson, E. (2012). Emulsion gels : The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 224–241.
- Dreher, M. L., Maher, C. V., & Kearney, P. (1996). The traditional and emerging role of nuts in healthful diets. *Nutrition Reviews*, 54(8), 241–245.
- Dressman, J. B., Berardi, R. R., Dermentzoglou, L. C., Russell, T. L., Schmaltz, S. P., Barnett, J. L., & Jarvenpaa, K. M. (1990). Upper gastrointestinal GI pH in young, healthy men and women. *Pharmaceutical Research*, 7(7), 756–761.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and A. (NDA). (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats , including saturated fatty acids , polyunsaturated fatty acids , monounsaturated fatty. *EFSA*, 8(3), 1461.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ellis, P. R., Kendall, C. W. C., Ren, Y., Parker, C., Pacy, J. F., Waldron, K. W., & Jenkins, D. J. A. (2004). Role of cell walls in the bioaccessibility of lipids in almond seeds. *American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(3), 604–613.
- Farrell, P. M. (2008). The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *Journal of Cystic Fibrosis*, *7*, 450–453.
- Fernandes, S. S., & Salas-Mellado, M. de las M. (2017). Addition of chia seed mucilage for reduction of fat content in bread and cakes. *Food Chemistry*, *227*, 237–244.
- Ferrari, M., Valtueña, J., Moreno, L. A., Censi, L., Androutsos, O., Gilbert, C. C., & Huybrechts, I. (2015). Inflammation profile in overweight / obese adolescents in Europe : an analysis in relation to iron status. *European Journal of Clinical Nutrition*, *69*(2), 247–255.
- Fieker, A., Philpott, J., & Armand, M. (2011). Enzyme replacement therapy for pancreatic insufficiency : present and future. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, *4*, 55–73.
- Flores-Mateo, G., Rojas-Rueda, D., Basora, J., Ros, E., & Salas-Salvadó, J. (2013). Nut intake and adiposity: Meta-analysis of clinical trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, *97*(6), 1346–1355.
- Fuller, M. F. (1991). *In vitro digestion for pigs and poultry* (CAB Intern).
- Gallier, S., & Singh, H. (2012). The physical and chemical structure of lipids in relation to digestion and absorption. *Lipid Technology*, *24*(12), 271–273.
- Gaskin, K. J. (2013). Nutritional care in children with cystic fibrosis : are our patients becoming better ? *European Journal of Clinical Nutrition*, *67*(5), 558–564.
- Gatellier, P., & Santé-Lhoutellier, V. (2009). Digestion study of proteins from cooked meat using an enzymatic microreactor. *Meat Science*, *81*(2), 405–409.
- Gelfond, D., Ma, C., Semler, J., & Borowitz, D. (2013). Intestinal pH and gastrointestinal transit profiles in cystic fibrosis patients measured by wireless motility capsule. *Digestive Diseases and Sciences*, *58*(8), 2275–2281.
- Giang, T. M., Gaucel, S., Brestaz, P., Anton, M., Meynier, A., Trelea, I. C., & Le Feunteun, S. (2016). Dynamic modeling of in vitro lipid digestion:

- Individual fatty acid release and bioaccessibility kinetics. *Food Chemistry*, 194, 1180–1188.
- Glicerina, V., Balestra, F., Dalla Rosa, M., & Romani, S. (2016). Microstructural and rheological characteristics of dark, milk and white chocolate: A comparative study. *Journal of Food Engineering*, 169, 165–171.
- Golding, M., & Wooster, T. J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(1–2), 90–101.
- Gómez, A. C. (2015). Presente y futuro de la industria de panadería, bollería y pastelería: Las nuevas exigencias de los clientes y los nuevos estilos de vida y de consumo condicionan las estrategias de mercado. *Distribución Y Consumo*, 25(140), 37–42.
- González-Bacerio, J., Rodríguez Hernández, J., & del Monte Martínez, A. (2010). Lipases: enzymes with potential for the development of immobilized biocatalysts by interfacial adsorption. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 113–140.
- Gracia, J. De, Álvarez, A., Mata, F., Guarner, L., Vendrell, M., Gadtner, S., & Cobos, N. (2002). Fibrosis quística del adulto : estudio de 111 pacientes. *Medicina Clínica*, 119(16), 605–609.
- Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., Pérez-Sacristán, B., Blanco-Navarro, I., & Blázquez-García, S. (2007). Comparative in vitro bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6387–6394.
- Grassby, T., Picout, D. R., Mandalari, G., Faulks, R. M., Kendall, C. W. C., Rich, G. T., ... Ellis, P. R. (2014). Modelling of nutrient bioaccessibility in almond seeds based on the fracture properties of their cell walls. *Food & Function*, 41(1), 1–25.
- Griel, A., & Eissenstat, B., Juturu, V., Hsieh, G., Kris-Etherton, P. (2004). Improved Diet Quality with Peanut Consumption. *Journal of the American College of Nutrition*, 23(6), 660–668.
- Grundy, M. M. L., Carrière, F., Mackie, A. R., Gray, D. A., Butterworth, P. J., & Ellis, P. R. (2016). The role of plant cell wall encapsulation and porosity in regulating lipolysis during the digestion of almond seeds. *Food and*

## 6. BIBLIOGRAFÍA

*Function*, 7(1), 69–78.

- Grundy, M. M. L., Wilde, P. J., Butterworth, P. J., Gray, R., & Ellis, P. R. (2015). Impact of cell wall encapsulation of almonds on in vitro duodenal lipolysis. *Food Chemistry*, 185, 405–412.
- Grundy, S. M., & Denke, M. A. (1990). Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 31, 1149–1172.
- Guerra, A., Etienne-mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591–600.
- Guo, Q., Ye, A., Bellissimo, N., Singh, H., & Rousseau, D. (2017). Modulating fat digestion through food structure design. *Progress in Lipid Research*, 68(August), 109–118.
- Gurr, M. I., Harwood, J. L., & Frayn, K. . (2002). *Lipid Biochemistry: an introduction*. (Oxford, Ed.). Wiley-Blackwell.
- Guzmán-Ortiz, F. A., San Martín-Martínez, E., Valverde, M. E., Rodríguez-Aza, Y., Berríos, J. D. J., & Mora-Escobedo, R. (2017). Profile analysis and correlation across phenolic compounds, isoflavones and antioxidant capacity during germination of soybeans ( *Glycine max L.*). *CyTA - Journal of Food*, 15(4), 516–524.
- Haag, M. (2003). Essential Fatty Acids and the Brain. *Canadian Journal of Psychiatry*, 48(3), 195–203.
- Hamosh, M., Scow, R. O., Hamosh, M., & Scow, R. (1973). Lingual Lipase and Its Role in the Digestion of Dietary Lipid. *Journal of Clinical Investigation*, 52(1), 88–95.
- Harnack, K., Andersen, G., & Somoza, V. (2009). Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n6/n3 fatty acids. *Nutrition & Metabolism*, 6, 8.
- Harries, J.T., Muller, D.P.R, McCollum, J.P.K. , Lipson A., Roma E. and Norman, A. P. (1979). Intestinal bile salts in cystic fibrosis, 19–24.
- Hernell, O., Stiggers, J. E., & Carey, M. C. (1990). Physical-Chemical Behavior of Dietary and Biliary Lipids during Intestinal Digestion and Absorption. 2. Phase Analysis and Aggregation States of Luminal Lipids during Duodenal Fat Digestion in Healthy Adult Human Beings. *Biochemistry*, 29(8), 2041–

2056.

- Hilditch, T. P., & Williams, P. N. (1949). *The Chemical Constitution of Natural Fats* (Springer U). New York: Universitat Politecnica de Valencia.
- Hoad, C., Rayment, P., Risse, V., Cox, E., Ciampi, E., Pregent, S., ... Gowland, P. (2011). Encapsulation of lipid by alginate beads reduces bio-accessibility: An in vivo breath test and MRI study. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1190–1200.
- Hollis, J., & Mattes, R. (2007). Effect of chronic consumption of almonds on body weight in healthy humans. *British Journal of Nutrition*, 98(3), 651–656.
- Huerta, K., Soquetta, M., Alves, J., Stefanello, R., Kubota, E., & Rosa, C. S. (2018). Effect of flour chia (*Salvia hispanica* L.) as a partial substitute gum in gluten free breads. *International Food Research Journal*, 25(2), 755–761.
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 162–169.
- Hunter, E. J. (2001). Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids*, 36(7), 655–668.
- Hur, J. S., Ou, B., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1–12.
- Hur, S. J., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2009). Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 114(1), 253–262.
- Hvizdos, K. M., & Markham, A. (1999). Orlistat-A review of its use in the management of obesity. *Drugs*, 58, 743–760.
- Iborra, M., Beltrán, B., & Nos, P. (2011). Nuevos conocimientos en genética y enfermedad inflamatoria intestinal. ¿alguna utilidad? *Gastroenterología Y Hepatología*, 34(9), 591–598.
- Inglett, G. E., Chen, D., Liu, S. X., & Lee, S. (2014). Pasting and rheological properties of oat products dry-blended with ground chia seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 148–156.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Iqbal, J., & Hussain, M. M. (2009). Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 299, E1183–E1194.
- IUPAC. (1992). Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 1991, 1–151.
- Jain, M. G., Hislop, G. T., Howe, G. R., & Ghadirian, P. (1999). Plant Foods, Antioxidants, and Prostate Cancer Risk: Findings From Case-Control Studies in Canada. *Nutrition and Cancer*, 34(2), 173–184.
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556–567.
- Jalil, A. M. M., & Ismail, A. (2008). Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules*, 13(9), 2190–2219.
- Johnson, S. R. (1991). *Gastrointestinal Physiology*. St. Louis: Mosby-Year Book.
- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J. B., & Reppas, C. (2006). Characterization of the Human Upper Gastrointestinal Contents Under Conditions Simulating Bioavailability / Bioequivalence Studies. *Gastroenterology*, 23(1), 165–176.
- Kanakis, C. D., Hasni, I., Bourassa, P., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., & Tajmir-Riahi, H. A. (2011). Milk  $\beta$ -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 127(3), 1046–1055.
- Karupaiah, T., & Sundram, K. (2007). Effects of stereospecific positioning of fatty acids in triacylglycerol structures in native and randomized fats: a review of their nutritional implications. *Nutrition & Metabolism*, 17, 1–17.
- Keen, C. L., Holt, R. R., Oteiza, P. I., Fraga, C. G., & Schmitz, H. H. (2005). Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 298–303.
- Keogh, J. B., McInerney, J., & Clifton, P. M. (2007). The effect of milk protein on the bioavailability of cocoa polyphenols. *Journal of Food Science*, 72(3).
- Kilmartin, P. A., & Hsu, C. F. (2003). Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chemistry*, 82(4), 501–512.
- Kitabatake, N., & Kinekawa, Y. (1998). Digestibility of Bovine Milk Whey

- Protein and -Lactoglobulin in Vitro and in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4917–4923.
- Kong, F., & Singh, R. P. (2009). Digestion of raw and roasted almonds in simulated gastric environment. *Food Biophysics*, 4(4), 365–377.
- Kong, F., & Singh, R. P. (2010). A Human Gastric Simulator ( HGS ) to Study Food Digestion in Human Stomach. *Journal of Food Science*, 75(9), E627–E635.
- Kris-Etherton, P. M., Hu, F. B., Ros, E., & Sabaté, J. (2008). The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. *The Journal of Nutrition*, 138(9), 1746S–1751S.
- Kulkarni, B. V., & Mattes, R. D. (2014). Lingual lipase activity in the orosensory detection of fat by humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 306(10), 879–885.
- Kylen, A. M., & McCREADY, R. M. (1975). Nutrients in Seeds and Sprouts of Alfalfa, Lentils, Mung Beans and Soybeans. *Journal of Food Science*, 40(5), 1008–1009.
- Lai, H.M. y Lin, T. C. (2006). Bakery Products: Science and technology. In “Bakery Prodcuts-Science and Technology.”
- Lairon, D., Play, B., & Jourdheuil-rahmani, D. (2007). Digestible and indigestible carbohydrates : interactions with postprandial lipid metabolism. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 217–227.
- Lamothe, S., Azimy, N., Bazinet, L., Couillard, C., & Britten, M. (2014). Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food & Function*, 5(10), 2621–2631.
- Lamothe, S., Corbeil, M.-M., Turgeon, S. L., & Britten, M. (2012). Influence of cheese matrix on lipid digestion in a simulated gastro-intestinal environment. *Food & Function*, 3(7), 724.
- Latham, M. C. (2002). *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. Roma: Fao.
- Levine, M. J. (1993). Salivary macromolecules . A structure/ Function Synopsis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 649, 11–16.
- Levine AS, S. S. (1980). Absorption of whole peanuts, peanut oil, and peanut butter. *The New England Journal of Medicine*, 303, 917–918.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Li, L., & Somers, S. (2014). Digestive system dysfunction in cystic fibrosis: Challenges for nutrition therapy. *Digestive and Liver Disease*, 46(10), 865–874.
- Lowe, M. E. (2002). The triglyceride lipases of the pancreas. *Journal of Lipid Research*, 43(12), 2007–2016.
- Lucas-Gonzalez, R., Navarro-Coves, S., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., Muñoz, L. A., & Viuda-Martos, M. (2016). Assessment of polyphenolic profile stability and changes in the antioxidant potential of maqui berry (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) during in vitro gastrointestinal digestion. *Industrial Crops and Products*, 94, 774–782.
- Lucas-gonzález, R., Viuda-martos, M., Pérez-alvarez, J. A., & Fernández-lópez, J. (2018). In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, 107, 423–436.
- Lucca, P. A., & Tepper, B. J. (1994). Fat replacers and the functionality of fat in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 5, 12–19.
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Maclerzanka, A., & MacKie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 36–46.
- Maldonado-Valderrama, J., Woodward, N. C., Patrick Gunning, A., Ridout, M. J., Husband, F. A., Mackie, A. R., ... Wilde, P. J. (2008). Interfacial characterization of  $\beta$ -lactoglobulin networks: Displacement by bile salts. *Langmuir*, 24(13), 6759–6767.
- Malone, M. E., Appelqvist, I. A. M., & Norton, I. T. (2003). Oral behaviour of food hydrocolloids and emulsions . Part 1 . Lubrication and deposition considerations. *Food Hydrocolloids*, 17, 763–773.
- Mandalari, G., Faulks, R. M., Rich, G. T., Lo Turco, V., Picout, D. R., Lo Curto, R. B., ... & Ellis, P. R. (2008). Release of Protein , Lipid , and Vitamin E from Almond Seeds during Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 3409–3416.
- Mandalari, G., Parker, M. L., Grundy, M. M. L., Grassby, T., Smeriglio, A., Bisignano, C., ... Wilde, P. J. (2018). Understanding the effect of particle size and processing on almond lipid bioaccessibility through microstructural analysis: From mastication to faecal collection. *Nutrients*,

10(2), 213.

- Mandalari, G., Rigby, N. M., Bisignano, C., Lo Curto, R. B., Mulholland, F., Su, M., ... Sathe, S. K. (2014). Effect of food matrix and processing on release of almond protein during simulated digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 439–447.
- Marciani, L., Gowland, P. A., Fillery-travis, A., Manoj, P., Wright, J., Smith, A., ... As-, R. C. S. (2001). Assessment of antral grinding of a model solid meal with echo-planar imaging. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(5), G844–G849.
- Marciani, L., Gowland, P. A., Spiller, R. C., Manoj, P., Moore, R. J., Young, P., ... Young, P. (2001). Effect of meal viscosity and nutrients on satiety , intragastric dilution , and emptying assessed by MRI. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(6), G1227–G1233.
- Martin Cerdeño, V. . (2008). Consumo de pan, bollería, pastelería, galletas y cereales. *Distribución Y Consumo*, 101, 60–71.
- Mayer, A. ., & Poljakoff-Mayber, A. (1982). *Metabolism of Germinating Seeds. The Germination of Seeds* (3rd.).
- Mbithi, S., Van Camp, J., Rodriguez, R., & Huyghebaert, A. (2002). Effects of sprouting on nutrient and antinutrient composition of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Rose coco). *European Food Research and Technology*, 212(2), 188–191.
- Mcclements, D. J., Decker, E. A., & Park, Y. (2009). Controlling Lipid Bioavailability through Physicochemical and Structural Approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 48–67.
- Mcclements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., Julian, D., Decker, E. A., Park, Y., ... Decker, E. A. (2009). Controlling Lipid Bioavailability through Physicochemical and Structural Approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 48–67.
- Merli, M., Bertasi, S., Servi, R., Diamanti, S., Martino, F., De, A. S., ..., & Angelico, M. (1994). Effect of a medium dose of ursodeoxycholic acid with or without taurine supplementation on the nutritional status of patients with cystic fibrosis: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 19(2), 198–203.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Michalski, M. C., Genot, C., Gayet, C., Lopez, C., Fine, F., Joffre, F., ... Raynal-Ljutovac, K. (2013). Multiscale structures of lipids in foods as parameters affecting fatty acid bioavailability and lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 354–373.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5(5), 1113–1124.
- Mooij, M. G., Koning, B. A. E. De, & Huijsman, M. L. (2012). Ontogeny of oral drug absorption processes in children. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 8(10), 1293–1303.
- Moreau, H., Bernadac, A., Gargouri, Y., Benkouka, F., Laugier, R., & Verger, R. (1989). Immunocytolocalization of human gastric lipase in chief cells of the fundic mucosa. *Histochemistry*, 91, 419–420.
- Mostafa, M. M., Rahma, E. H., & Rady, A. H. (1987). Chemical and nutritional changes in soybean during germination. *Food Chemistry*, 23(4), 257–275.
- Mu, H., & Høy, C. (2004). The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, 43, 105–133.
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds : Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of Food Engineering*, 108(1), 216–224.
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J. M. (2013). Chia Seed (*Salvia hispanica*): An Ancient Grain and a New Functional Food. *Food Reviews International*, 29(4), 394–408.
- N'Goma, J. C. B., Amara, S., Dridi, K., Jannin, V., & Carrière, F. (2012). Understanding the lipid-digestion processes in the GI tract before designing lipid-based drug-delivery systems. *Therapeutic Delivery*, 3(1), 105–124.
- Nakamura, A., Yoshida, R., Maeda, H., & Corredig, M. (2006). Soy soluble polysaccharide stabilization at oil – water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 20, 277–283.
- Nimalaratne, C., Savard, P., Gauthier, S. F., Schieber, A., & Wu, J. (2015). Bioaccessibility and Digestive Stability of Carotenoids in Cooked Eggs

- Studied Using a Dynamic in Vitro Gastrointestinal Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(11), 2956–2962.
- Norris, F. A., & Mattil, K. F. (1947). A new approach to the glyceride structure of nature fats. *Journal AM. Oil Chem. Soc*, 24(8), 274–275.
- Novotny, J. A., Gebauer, S. K., & Baer, D. J. (2012). Discrepancy between the Atwater factor predicted and empirically measured energy values of almonds in human diets. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96(2), 296–301.
- O’Connell, J. E., Fox, P. D., Tan-Kintia, R., & Fox, P. F. (1998). Effects of tea, coffee and cocoa extracts on the colloidal stability of milk and concentrated milk. *International Dairy Journal*, 8(8), 689–693.
- O’keefe, S. J., Buchman, A. L., Fishbein, T. M., Jeejeebhoy, K. N., Jeppesen, P. B., & Shaffer, J. (2006). Short Bowel Syndrome and Intestinal Failure : Consensus definitions and overview. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(1), 6–10.
- O’Brien, J., Okereke, O., Devore, E., Rosner, B., Breteler, M., & Grodstein, F. (2014). Long-Term Intake of Nuts in Relation To Cognitive Function in Older Women. *THE JOURNAL OF NUTRITION, HEALTH & AGING*, 18(5), 496–502.
- Olveira, G., & Olveira, C. (2008). Nutrición , fibrosis quística y aparato digestivo, 23, 71–86.
- Ortega, N., Reguant, J., Romero, M.-P., Macià, A., & Motilva, M.-J. (2009). Effect of Fat Content on the Digestibility and Bioaccessibility of Cocoa Polyphenol by an in Vitro Digestion Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5743–5749.
- Ortega, N., Reguant, J., Romero, M. P., Macià, A., & Motilva, M. J. (2009). Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an in vitro digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5743–5749.
- Ozcan, M., & Seven, S. (2003). Physical and chemical analysis and fatty acid composition of peanut, peanut oil and peanut butter from COM and NC-7 cultivars. *Grasas Y Aceites*, 54(1), 12–18.
- Pająk, P., Socha, R., Broniek, J., Królikowska, K., & Fortuna, T. (2019).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Antioxidant properties , phenolic and mineral composition of germinated chia , golden fl ax , evening primrose , phacelia and fenugreek. *Food Chemistry*, 275(March 2018), 69–76.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, oxidative medicine and cellular longevity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278.
- Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), 21–32.
- Pasquier, B., Armand, M., Guillon, F., Castelain, C., Borel, P., Barry, J. L., ... Lairon, D. (1996). Viscous soluble dietary fibers alter emulsification and lipolysis of triacylglycerols in duodenal medium in vitro. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(5), 293–302.
- Paz-Valiñas, L., & García-Vega, F. J. (2004). Cribado neonatal de la fibrosis quística. *Serie Avaliación de Tecnoloxías. Informes de Avaliación: INF2004/02. Santiago de Compostela: Servicio Galego de Saúde, Axencia de Avaliación de Tecnoloxías Sanitarias de Galicia, Avalia-T.*
- Paz-Yépez, C., Peinado, I., Heredia, A., & Andrés, A. (2019a). Influence of particle size and intestinal conditions on in vitro lipid and protein digestibility of walnuts and peanuts. *Food Research International*, 119, 951–959.
- Paz-Yépez, C., Peinado, I., Heredia, A., & Andrés, A. (2019b). Lipids digestibility and polyphenols release under in vitro digestion of dark, milk and white chocolate. *Journal of Functional Foods*, 52, 196–203.
- Pedersen, A. M., Bardow, A., Jensen, S. B., & Nauntofte, B. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste , mastication , swallowing and digestion. *Oral Diseases*, 8(5), 117–129.
- Peinado, I., Larrea, V., Heredia, A., & Andrés, A. (2018). Lipolysis kinetics of milk-fat catalyzed by an enzymatic supplement under simulated gastrointestinal conditions. *Food Bioscience*, 23(August 2017), 1–8.
- Pellegrini, M., Lucas-Gonzalez, R., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2018). Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(1), 47–53.

- Perren, R., & Escher, F. E. (2013). Impact of roasting on nut quality. *Improving the Safety and Quality of Nuts*, 173–197.
- Pineda-Vadillo, C., Nau, F., Guerin-Dubiard, C., Jardin, J., Lechevalier, V., Sanz-Buenhombre, M., ... Dupont, D. (2017). The food matrix affects the anthocyanin profile of fortified egg and dairy matrices during processing and in vitro digestion. *Food Chemistry*, 214, 486–496.
- Polovic, N. D., Pjanovic, R. V., Burazer, L. M., Velickovic, S. J., Jankov, R. M., & Cirkovic Velickovic, T. D. (2009). Acid-formed pectin gel delays major incomplete kiwi fruit allergen Act c 1 proteolysis in in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (1), 8–14.
- Porter, C. J. H., Kaukonen, A. N. N. M., Taillardat-bertschinger, A., Boyd, B. E. N. J., Connor, J. M. O., Edwards, G. A., & Charman, W. N. (2004). Use of In Vitro Lipid Digestion Data to Explain the In Vivo Performance of Triglyceride-Based Oral Lipid Formulations of Poorly Water-Soluble Drugs: Studies with Halofantrine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(5), 1110–1121.
- Qiu, C., Sun, W., Cui, C., & Zhao, M. (2013). Effect of citric acid deamidation on in vitro digestibility and antioxidant properties of wheat gluten. *Food Chemistry*, 141(3), 2772–2778.
- Qiu, C., Zhao, M., Andrew, E., & Julian, D. (2015). Influence of protein type on oxidation and digestibility of fish oil-in-water emulsions: Gliadin , caseinate , and whey protein. *FOOD CHEMISTRY*, 175, 249–257.
- Rahaman, T., Vasiljevic, T., & Ramchandran, L. (2016). Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 24–34.
- Ramsey, W. B., Farrell, M. P., Pencharz, P., & Committee, C. (1992). Nutritional assessment and management in cystic fibrosis: a consensus report. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55(1), 108–116.
- Randhir, R., Lin, Y. T., & Shetty, K. (2004). Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*, 39(5), 637–646.
- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., &

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588–602.
- 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(C), 237–250.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107(2), 656–663.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866–2887.
- Robinson, P. J., Smith, A. L., & Sly, P. D. (1990). Duodenal pH in cystic fibrosis and its relationship to fat malabsorption. *Digestive Diseases and Sciences*, 35(10), 1299–1304.
- Rogalska, E., Ransac, S., & Verger, R. (1990). Stereoselectivity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(33), 20271–20276.
- Rovner, A. 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.
- Rowe, S. M., Heltshe, S. L., Gonska, T., Donaldson, S. H., Borowitz, D., Gelfond, D., ... Joseloff, E. (2014). Clinical Mechanism of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Potentiator Ivacaftor in G551D-mediated Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(2), 175–184.
- Ryan, L., O'Connell, O., O'Sullivan, L., Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2008). Micellarisation of carotenoids from raw and cooked vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(3), 127–133.
- Sabaté, J. (2003). Nut consumption and body weight. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3 Suppl), 647S–650S.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2006). Intake and bioaccessibility of

- total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2073S–2085S.
- Sek, L., Porter, C. J. H., & Charman, W. N. (2001). Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their in vitro digestion products, by HPTLC coupled with in situ densitometric analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 651–661.
- Sek, L., Porter, C. J. H., Kaukonen, A. M., & Charman, W. N. (2002). Evaluation of the in-vitro digestion products of long and medium chain glycerides and the phase behaviour of their lipolytic products. *Pharmacy and Pharmacology*, 54, 29–41.
- Shima, M., Tanaka, M., Kimura, Y., Adachi, S., & Matsuno, R. (2004). Hydrolysis of the oil phase of a W/O/W emulsion by pancreatic lipase. *Journal of Controlled Release*, 94(1), 53–61.
- Shishikura, Y., Khokhar, S., & Murray, B. S. (2006). Effects of tea polyphenols on emulsification of olive oil in a small intestine model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1906–1913.
- Shulman, G. I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 106(2), 171–176.
- 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.
- Silletti, E., Vingerhoeds, M. H., Norde, W., & Aken, G. A. Van. (2007). The role of electrostatics in saliva-induced emulsion flocculation. *Food Hydrocolloids*, 21, 596–606.
- Simopoulos, A. P. (2013). Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, 21, 495–505.
- Sinaasappel, M., Stern, M., Littlewood, J., Wolfe, S., Steinkamp, G., & Heijerman, H. G. M. (2002). Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus. *Journal of Cystic Fibrosis*, 1, 51–75.
- Singh, H., & Ye, A. (2013). Structural and biochemical factors affecting the digestion of protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid &*

## 6. BIBLIOGRAFÍA

*Interface Science*, 18(4), 360–370.

- Singh, J., Dartois, A., & Kaur, L. (2010). Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(4), 168–180.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299(1974), 152–178.
- Smith, M. E., & Morton, D. G. (2001). *The Digestive System, basic science and clinical conditions* (Churchill). London.
- Stauffer, C. E. (2005). Fats and oils in bakery products. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*.
- Stephenson, A. L., Mannik, L. A., Walsh, S., Brotherwood, M., Robert, R., & Darling, P. B. (2013). Longitudinal trends in nutritional status and the relation between lung function and BMI in cystic fibrosis: a population-based cohort study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(4), 872–877.
- Stewart, J. E., Feinle-bisset, C., Golding, M., Delahunty, C., Clifton, P. M., & Keast, R. S. J. (2010). Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 104, 145–152.
- Sugiyama, H., Akazome, Y., Shoji, T., Yamaguchi, A., Yasue, M., Kanda, T., & Ohtake, Y. (2007). Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4604–4609.
- Sullivan, B. P. O., & Freedman, S. D. (2009). Cystic fibrosis. *The Lancet*, 373(9678), 1891–1904.
- Sze-Tao, K. W. C., & Sathe, S. K. (2000). Walnuts (*Juglans regia* L): proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein in vitro digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1393–1401.
- Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599–606.

- Tarko, T., Duda-Chodak, A., & Zajac, N. (2013). Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 64(2), 79–84. Retrieved from
- Temple, N. J. (1994). Diet, blood lipids and coronary heart disease-current controversies. *South African Medical Journal*, (Suppl), 30–31.
- The European Commission. (2013). COMMISSION IMPLEMENTING DECISION of 22 January 2013 authorising an extension of use of Chia (*Salvia hispanica*) seed as a novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, (January), 34–35.
- Thompson, G. N., Robb, T. A., & Davidson, G. P. (1987). Taurine supplementation , fat absorption , and growth in cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics*, 111(4), 501–506.
- Tompkins, T. A., Mainville, I., & Arcand, Y. (2011). The impact of meals on a probiotic during transit through a model of the human upper gastrointestinal tract. *Beneficial Microbes*, 2(4), 295–303.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231–1246.
- Turck, D., Braegger, C. P., Colombo, C., Declercq, D., Morton, A., Pancheva, R., ... Wilschanski, M. (2016). ESPEN-ESPGHAN-ECFS guidelines on nutrition care for infants , children , and adults with cystic fibrosis. *Clinical Nutrition*, 35(3), 557–577.
- Tydemann, E. A., Parker, M. L., Faulks, R. M., Cross, K. L., Fillery-Travis, A., Gidley, M. J., ... Waldron, K. W. (2010). Effect of Carrot ( *Daucus carota* ) Microstructure on Carotene Bioaccessibility in the Upper Gastrointestinal Tract . 2 . In Vivo Digestions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9855–9860.
- Uchiyama, S., Taniguchi, Y., Saka, A., Yoshida, A., & Yajima, H. (2011). Prevention of diet-induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo. *Nutrition*, 27(3), 287–292.
- Vardakou, M., Mercuri, A., Barker, S. A., Craig, D. Q. M., Faulks, R. M., & Wickham, M. S. J. (2011). Achieving Antral Grinding Forces in Biorelevant In Vitro Models : Comparing the USP Dissolution Apparatus II and the Dynamic Gastric Model with Human In Vivo Data. *Aaps Pharmscitech*,

## 6. BIBLIOGRAFÍA

12(2), 620–626.

- Verhoeckx, K., Cotter, P., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., & Requena, T. (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Springer.
- Vingerhoeds, M. H., Blijdenstein, T. B. J., Zoet, F. D., & Aken, G. A. Van. (2005). Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloids*, 19, 915–922.
- Vinson, J. A., & Motisi, M. J. (2015). Polyphenol antioxidants in commercial chocolate bars: Is the label accurate? *Journal of Functional Foods*, 12, 526–529.
- Voituriez, T. (1997). Sustituciones entre aceites vegetales. *Revista Palmas*, 18(2), 45–49.
- Wainwright, P. E. (2002). Dietary essential fatty acids and brain function : a developmental perspective on mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61, 61–69.
- Whitcomb, D. C., Lehman, G. A., Vasileva, G., Malecka-Panas, E., Gubergrits, N., Shen, Y., ... Caras, S. (2010). Pancrelipase delayed-release capsules (CREON) for exocrine pancreatic insufficiency due to chronic pancreatitis or pancreatic surgery: A double-blind randomized trial. *American Journal of Gastroenterology*, 105(10), 2276–2286.
- WHO/FAO, W. H. O. and A. (2003). Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Diet nutrition and the prevention of chronic diseases. *WHO Technical Report Series*, 916.
- WHO, & FAO. (2008). Expert Consultation on Fats and Fatty Acids in Human Nutrition. Interim Summary of Conclusions and Dietary Recommendations on Total Fat & Fatty Acids. *World Health Organization Technical Report Series*, 8–9.
- Woda, A., Nicolas, E., Mishellany-Dutour, A., Hennequin, M., Mazille, M. N., Veyrone, J. L., & Peyron, M. A. (2010). The masticatory normative indicator. *Journal of Dental Research*, 89(3), 281–285.
- Woestenenk, J. W., Ent, C. K. Van Der, & Houwen, R. H. J. (2015). Pancreatic Enzyme Replacement Therapy and Coefficient of fat absorption in children and adolescents with Cystic Fibrosis. *Journal of Pediatric*

- Gastroenterology and Nutrition*, 61(3), 355–360.
- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423–447.
- Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry*, 128(4), 895–901.
- Yeh, C.-C., You, S.-L., Chen, C.-J., & Sung, F.-C. (2006). Peanut consumption and reduced risk of colorectal cancer in women: a prospective study in Taiwan. *World Journal of Gastroenterology*, 12(2), 222–227.
- Yehuda, S., Rabinovitz, S., & Mostofsky, D. I. (1999). Essential Fatty Acids Are Mediators of Brain Biochemistry and Cognitive Functions. *Journal of Neuroscience Research*, 56, 565–570.
- Zentler-Munro, P. L., Fine, D. R., Batten, J. C., & Northfield, T. . (1985). Effect of cimetidine on enzyme inactivation , bile acid precipitation , and lipid solubilisation in pancreatic steatorrhoea due to cystic fibrosis. *Gut*, 26, 892–901.
- Zettel, V., & Hitzmann, B. (2018). Applications of chia ( *Salvia hispanica* L .) in food products. *Trends in Food Science & Technology*, 80(January), 43–50.
- Zieliński, H., Frias, J., Piskula, M. K., Kozłowska, H., & Vidal-Valverde, C. (2006). The effect of germination process on the superoxide dismutase-like activity and thiamine, riboflavin and mineral contents of rapeseeds. *Food Chemistry*, 99(3), 516–520.
- Zolin, A., McKone, E. F., & Van Rens, J. (2014). ECFS Patient Registry Annual Data Report 2010. *Karup: European Cystic Fibrosis Society*.
- Zwarts, L., Savage, G. P., & McNeil, D. L. (1999). Fatty acid content of New Zealand-grown walnuts (*Juglans regia* L.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 189–194.

