

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INFLUENCIA DE LAS ALTERACIONES DIGESTIVAS DE LA POBLACIÓN SÉNIOR SOBRE LA DIGESTIBILIDAD IN-VITRO DE PRODUCTOS LÁCTEOS

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: Janaina Madelein Sánchez García

TUTOR/A ACADEMICO: Ana María Andrés Grau

COTUTOR/A: Ana Belén Heredia Gutiérrez

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Sara Muñoz Pina

Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, 13 DE SEPTIEMBRE DEL 2019

INFLUENCIA DE LAS ALTERACIONES DIGESTIVAS DE LA POBLACIÓN SÉNIOR SOBRE LA DIGESTIBILIDAD *IN-VITRO* DE PRODUCTOS LÁCTEOS

Sánchez, J., Muñoz-Pina, S.¹, Heredia, A.¹ y Andrés, A.¹

RESUMEN

El envejecimiento es un proceso biológico que desencadena en una serie de cambios estructurales y funcionales, provocando alteración y deterioro a nivel del tracto digestivo, lo cual provoca maldigestión y malnutrición del adulto mayor por un déficit en la absorción de macro y micronutrientes. Debido a esto, el objetivo del presente estudio fue analizar, mediante el método de simulación *in-vitro*, la influencia de alteraciones fisiológicas a nivel oral, gástrico e intestinal que intervienen en la digestión de la población sénior (adulto > 65 años) sobre la digestibilidad de nutrientes presentes en productos lácteos. Se utilizaron técnicas de cromatografía de gases -espectrometría de masas (GC-MS), resonancia magnética nuclear (RMN-¹H), colorimetría del Ácido Dinitrosalicílico (DNS) y espectrometría de absorción atómica de llama para determinar la influencia de las alteraciones antes mencionadas sobre la digestibilidad de proteínas, lípidos y glúcidos, así como la bioaccesibilidad de calcio en productos lácteos (leche entera, yogurt, queso curado y queso servilleta).

Los resultados muestran, que las alteraciones de la fase oral, gástrica e intestinal conllevan una reducción de la hidrólisis proteica, dando lugar, por tanto, a un menor contenido de aminoácidos libres post-digestión. Particularmente, la leucina disminuye entre un 15 y 41.5% en los productos lácteos digeridos bajo condiciones gastrointestinales alteradas. La extensión de lipólisis, no se encuentra condicionada en condiciones gastrointestinales (GI) de individuos sénior, e incluso llegó a ser superior que en condiciones GI no alteradas. Este incremento, podría estar relacionado con la simulación de un mayor tiempo de residencia del alimento en la etapa intestinal bajo condiciones sénior (4 h frente a 2h en modelo no alterado). Por otro lado, la alteración intestinal podría ser responsable del descenso de la bioaccesibilidad de calcio registrado en el queso servilleta, aunque no en el resto de matrices. Finalmente, las alteraciones gastrointestinales presentan un efecto estadísticamente significativo sobre la liberación de azúcares en matrices coaguladas como el yogurt, queso curado y queso servilleta.

PALABRAS CLAVE: digestión *in-vitro*, alteraciones gastrointestinales, lácteos, sénior, proteólisis, lipólisis, glúcidos, calcio.

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

ABSTRACT

Aging is a biological process that triggers a series of structural and functional changes, causing alteration and deterioration at the level of the digestive tract, which causes maldigestion and malnutrition of the elderly due to a deficit in the absorption of macro and micronutrients. Due to this, the objective of the present study was to analyze, by means of the *in-vitro* simulation method, the influence of physiological alterations at the oral, gastric and intestinal level that intervene in the digestion of the senior population (adult > 65 years) on digestibility of nutrients present in dairy products. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), nuclear magnetic resonance (NMR-¹H), Dinitrosalicylic Acid (DNS) colorimetry and flame atomic absorption spectrometry were used to determine the influence of the aforementioned alterations on the digestibility of proteins, lipids and carbohydrates, as well as the bioavailability of calcium in dairy products (whole milk, yogurt, cured cheese and napkin fresh cheese).

The results show that alterations of the oral, gastric and intestinal phase lead to a reduction in protein hydrolysis, resulting, therefore, in a lower content of free amino acids post-digestion. Particularly, leucine decreases between 15 and 41.5% in digested dairy products under altered gastrointestinal conditions. The extent of lipolysis, is not conditioned in gastrointestinal (GI) conditions of senior individuals, and even became higher than in unaltered GI conditions. This increase could be related to the simulation of a longer residence time of the food in the intestinal stage under senior conditions (4 hours versus 2 hours in an unaltered model). On the other hand, the intestinal alteration could be responsible for the decrease in the bioaccessibility of calcium registered in the napkin fresh cheese, although not in the rest of the matrices. Finally, gastrointestinal disorders have a statistically significant effect on the release of sugars in coagulated matrices such as yogurt, cured cheese and napkin fresh cheese.

KEY WORDS: *in-vitro* digestion, gastrointestinal disorders, dairy, senior, proteolysis, lipolysis, carbohydrates, calcium.

RESUM

L'envelliment és un procés biològic que desencadena en una sèrie de canvis estructurals i funcionals, provocant alteració i deteriorament a nivell del tracte digestiu, la qual cosa provoca maldigestió i malnutrició de l'adult major per un dèficit en l'absorció de macro i micronutrients. A causa d'això, l'objectiu d'aquest estudi va ser analitzar, mitjançant el mètode de simulació *in-vitro*, la influència d'alteracions fisiològiques a nivell oral, gàstric i intestinal que intervenen en la digestió de la població sènior (adult > 65 anys) sobre la digestibilitat de nutrients presents en productes lactis. Es van utilitzar tècniques de cromatografia de gasos -espectrometria de masses (GC-MS), ressonància magnètica nuclear (RMN-¹H), colorimetria de l'Àcid Dinitrosalicílic (DNS) i espectrometria d'absorció atòmica de flama per

determinar la influència de les alteracions abans esmentades sobre la digestibilitat de proteïnes, lípids i glúcids, així com la bioaccessibilitat de calci en productes lactis (llet sencera, iogurt, formatge curat i formatge tovalló).

Els resultats mostren, que les alteracions de la fase oral, gàstrica i intestinal comporten una reducció de la hidròlisi proteica, donant lloc, per tant, a un menor contingut d'aminoàcids lliures post-digestió. Particularment, la leucina disminueix entre un 15 i 41.5% en els productes lactis digerits sota condicions gastrointestinals alterades. L'extensió de lipòlisi, no es troba condicionada en condicions gastrointestinals (GI) d'individus sènior, i fins i tot va arribar a ser superior que en condicions GI no alterades. Aquest increment, podria estar relacionat amb la simulació d'un major temps de residència de l'aliment en l'etapa intestinal sota condicions sènior (4 h davant de 2h a model no alterat). D'altra banda, l'alteració intestinal podria ser responsable del descens de la bioaccessibilitat de calci registrat en el formatge tovalló, encara que no en la resta de matrius. Finalment, les alteracions gastrointestinals presenten un efecte estadísticament significatiu sobre l'alliberament de sucres en matrius coagulades com el iogurt, formatge curat i formatge tovalló.

PARAULES CLAU: digestió *in-vitro*, alteracions gastrointestinals, lactis, sènior, proteòlisi, lipòlisi, glúcids, calci.

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un “proceso biológico que comporta una serie de cambios estructurales y funcionales que aparecen con el paso del tiempo y no son consecuencia de enfermedades ni accidentes” (Oxford English Dictionary, 2019). Según el Instituto Nacional de Estadística de España (INE, 2014), el porcentaje de población mayor de 65 años que actualmente representa un 18.2% pasará a ser de un 24.9% en el año 2029 y a un 38.7% en 2064. Mientras un individuo envejece, aparecen una serie de alteraciones y deterioro a nivel del tracto digestivo, siendo algunas de éstas, reducción de la secreción de fluidos digestivos y enzimas y/o de las contracciones peristálticas, entre otras (Figura 1) (Shani-Levi et al., 2017). De forma que, muchos adultos sénior, consciente o inconscientemente adaptan sus hábitos alimentarios en función de estas alteraciones. Además, según Rémond et al. (2015) existen otros factores que influyen en la forma de alimentarse e incluso en la disminución del apetito observado en este colectivo. Dichos factores pueden ser fisiológicos (pérdida de dientes, sequedad de la boca, reducción de la percepción olfativa, gustativa y visual de los alimentos, entre otros), psicológicos (depresión, falta de motivación, estado anímico, ansiedad), o incluso sociales (soledad, aislamiento social, viudez, pobreza, cambio de entorno como la vivienda).

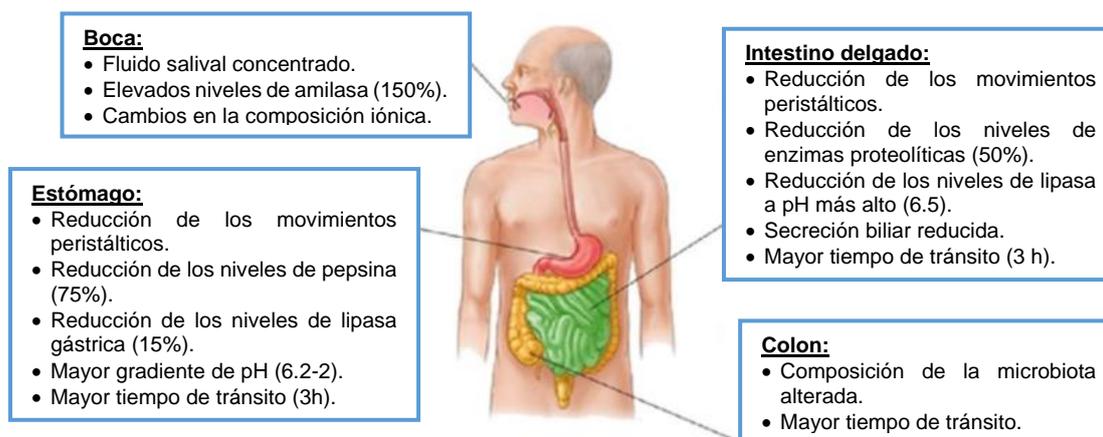


FIGURA 1. Alteraciones gastrointestinales en la población sénior mayor a 65 años (Adaptado de: Shani-Levi et al., 2017).

Estas circunstancias pueden desencadenar un problema de maldigestión y malnutrición del individuo, derivado de un déficit en la absorción de macro y micronutrientes. Así encontramos el caso de las proteínas, donde su importancia radica en que un bajo consumo de estas representa un factor de riesgo en la salud del adulto mayor al disminuir su masa corporal, aumentando, por ejemplo, el riesgo de caídas. Por otro lado, se encuentran las grasas, que generan un gran aporte de energía y tienen un papel fundamental en el suministro de ácidos grasos esenciales cuando éstas proceden de alimentos con grasas mono y poliinsaturadas. Además, la biodisponibilidad de micronutrientes como el calcio, el magnesio, el zinc, y vitaminas como la B12, B9, B6, A, D y E, también puede verse comprometida generando riesgos para la salud (Arbonés et al., 2003). Es por esto, que existe

un interés creciente por una nutrición adecuada para este grupo poblacional, lo cual se ha convertido en uno de los desafíos mundiales (ONU, 2013).

La Sociedad Española de Nutrición (SEN) indica que un incremento en el consumo de alimentos ricos en proteínas y lípidos mono y poliinsaturados en la dieta, además de los que tienen un aporte significativo de vitaminas y minerales esenciales, es fundamental para este grupo poblacional. Entre las categorías alimentarias que cumplen estos requisitos, se encuentran la leche y sus derivados, carnes, pescados, huevos, cereales, verduras y leguminosas, entre otras. Sin embargo, cabe esperar que las características inherentes a la matriz del alimento (estructura, interacciones entre macro y micronutrientes, entre otros), puedan influir en su digestibilidad dando lugar a que la bioaccesibilidad de sus nutrientes sea diferente incluso en condiciones digestivas similares.

Ante este escenario, se consideró de interés realizar un estudio de digestión de alimentos para evaluar cuan afectada se encuentra la digestibilidad de diferentes alimentos cuando se digieren en un sistema digestivo alterado como el que se da en la población sénior. Si bien los modelos de digestión *in-vivo* son considerados como el “estándar de oro”, los sistemas de digestión *in-vitro*, permiten simular los procesos de digestión y el comportamiento gastrointestinal de los alimentos con una serie de ventajas frente a los estudios *in-vivo* como son la rapidez, el menor coste, la reproducibilidad, el fácil muestreo en las diferentes etapas del proceso digestivo y la posible modificación de las condiciones controladas. Este tipo de modelos, incluyen una fase oral, gástrica e intestinal, y ocasionalmente colónica, pretendiendo imitar las condiciones fisiológicas *in-vivo*, donde se considera la concentración de enzimas digestivas y sales biliares, pH o tiempo de digestión, entre otros factores (Minekus et al., 2014).

El presente trabajo, tiene como objetivo analizar mediante un sistema de digestión *in-vitro* estático, la influencia de diferentes alteraciones fisiológicas que intervienen en la digestión de acuerdo al modelo publicado por Shani-Levi et al. (2017) correspondiente a la población de adultos mayores, sobre la hidrólisis de macronutrientes (proteínas, grasas y carbohidratos) y la bioaccesibilidad de micronutrientes (calcio) de diferentes alimentos de origen lácteo recomendados en dietas geriátricas, concretamente: leche entera, yogurt, queso curado y queso servilleta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima y reactivos

Las muestras de los productos lácteos seleccionados para el presente estudio fueron: leche entera, yogurt natural, queso servilleta y queso curado; todos de origen exclusivamente vacuno y adquiridos en los supermercados de la ciudad de Valencia. En el caso de las matrices alimentarias de textura sólida (queso curado y queso servilleta) el tamaño de partícula se redujo mediante corte, mientras que en el caso de las matrices alimentarias líquidas (leche

entera y yogurt) no se aplicó ningún tipo de acondicionamiento previo a la digestión *in-vitro*.

Los reactivos utilizados para llevar a cabo la simulación de la digestión *in-vitro* fueron: pepsina procedente de mucosa gástrica porcina (P6887, Sigma-Aldrich), pancreatina porcina (P7545, Sigma-Aldrich) y bilis bovina (B3883, Sigma-Aldrich). Los reactivos utilizados para la preparación de stocks y fluidos digestivos simulados fueron: CaCl₂, KCl, KH₂PO₄, NaCl, NaHCO₃, (NH₄)₂CO₃ y MgCl₂(H₂O)₆, todos de la marca Sigma-Aldrich.

Los reactivos utilizados para las determinaciones analíticas fueron: éter de petróleo (VWR Chemicals), ácido sulfúrico (Panreac Applichem), alcohol isoamílico (Panreac Applichem), sulfato de cobre (Panreac Applichem), hidróxido de sodio (Sigma Aldrich), ácido bórico (Panreac Applichem), diclorometano (grado HPLC, Honeywell), cloruro de sodio (Sigma Aldrich), sulfato de sodio anhidro (Panreac Applichem), cloroformo deuterado (Acros Organics), ácido nítrico (Honeywell), lantano (Honeywell), etanol absoluto (Panreac Applichem), estándar de glucosa (1 mg/mL de glucosa) (Sigma Aldrich), ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma Aldrich) y kit de aminoácidos EZ-Faast (Phenomenex).

Modelo estático de digestión *in-vitro*

La simulación de la digestión gastrointestinal se llevó a cabo siguiendo el método estandarizado de digestión *in-vitro* estático para un adulto sano, consensuado a nivel internacional y publicado por Minekus et al. (2014), el cual consta de tres etapas: oral, gástrica e intestinal. Además, se consideraron las condiciones gastrointestinales específicas de la población sénior (> 65 años) de acuerdo con Shani-Levi et al. (2017), las cuales se detallan en la Tabla 1.

TABLA 1. Variables alteradas y nivel de alteración de las etapas digestivas para llevar a cabo la simulación de la digestión *in-vitro* de acuerdo a las condiciones gastrointestinales de la población sénior.

Etapa digestiva	Variable alterada	Nivel de alteración
Etapa oral	Desestructuración	50 y 100%
Etapa gástrica	pH	100 y 200%
	Concentración pepsina	75 y 100%
Etapa intestinal	Concentración pancreatina	50 y 100%
	Concentración sales biliares	50 y 100%
	Duración	100 y 200%

El 100% corresponde a las condiciones gastrointestinales de un adulto sano (control) de acuerdo al protocolo publicado por Minekus et al., 2014.

Para llevar a cabo la digestión fue necesario preparar disoluciones que simulan los fluidos de digestión del cuerpo humano. Para los alimentos líquidos (leche entera y yogurt) se obvió la simulación de la etapa oral tal y como recomienda Minekus et al. (2014), mientras que en el caso de los sólidos (quesos) se utilizó fluido salival humano. También, se preparó el Stock Gástrico Simulado (SGS) y el Stock Intestinal Simulado (SIS) de acuerdo con las proporciones presentadas en la Tabla 2. Luego, a partir de estos stocks simulados se preparó el Fluido Gástrico Simulado (FGS) y el Fluido Intestinal

Simulado (FIS) para un adulto sano, y sus respectivos fluidos compensatorios para llevar a cabo las alteraciones de la población sénior (Tabla 3).

TABLA 2. Volumen y concentración (mmol/L) de los reactivos requeridos para la preparación de un litro de las soluciones stock simuladas

Constituyente	SGS		SIS	
	Volumen (mL)	Concentración (mmol/L)	Volumen (mL)	Concentración (mmol/L)
KCl	13.8	6.9	13.6	6.8
KH ₂ PO ₄	1.8	0.9	1.6	0.8
NaHCO ₃	25	25	95	85
NaCl	23.6	47.2	18.3	38.4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.8	0.1	2.2	0.33
(NH ₄) ₂ CO ₃	1	0.5	-	-
Agua destilada	934		869.3	
Volumen total	1000		1000	

SGS: Stock Gástrico Simulado; SIS: Stock Intestinal Simulado.

TABLA 3. Composición de los fluidos digestivos simulados

Fluido simulado	Composición
FGS	Relación 1:1 de bolo oral: SGS + pepsina 2000 U/mL
FIS	Relación 1:1 de quimo gástrico simulado: SIS + pancreatina (basado en actividad de tripsina 100 U/mL) + bilis 10 mM

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

La Tabla 4, describe cada una de las variables consideradas en los modelos de digestión de un adulto sano, y las alteraciones en la población sénior para cada una de las etapas digestivas. Así, se establecieron 3 modelos de digestión para población sénior (> 65 años) y 1 modelo de adulto sano de mediana edad (control). Se trabajó con 3 modelos sénior para llevar a cabo una alteración sucesiva de las etapas oral, gástrica e intestinal, y conocer la contribución de las alteraciones propias de cada etapa a la digestibilidad de los alimentos estudiados. A continuación, se describirá la metodología llevada a cabo para simular el proceso digestivo:

En la **etapa oral**, el alimento previamente pesado (5 g), se masticó *in-vivo* para el caso de los alimentos sólidos, y el bolo alimenticio producido fue introducido en tubos falcon de 50 mL. La masticación es un proceso complejo que consiste en preparar el bolo alimenticio para la deglución, donde se ajustan parámetros como el número de ciclos, frecuencia masticatoria, fuerzas musculares, velocidades, cantidad de saliva, etc., dependiendo de la naturaleza del alimento. Sin embargo, este es un proceso que es controlado por el sistema nervioso central que utiliza retroalimentación sensorial desde la cavidad oral, indicando que el bolo es cohesivo, plástico, resbaladizo y humedecido, y que está listo para ser ingerido (Peyron et al., 2018, Chen y Lolivret, 2011; Le Révérend et al., 2016). Dado esto, resulta complicado establecer un estándar de masticación, por lo cual tomando como referencia las publicaciones de otros autores (Woda et al., 2006; Jalabert-Malbos et al., 2007), se establecieron los ciclos de masticación para un adulto sano hasta que el bolo tuvo una consistencia similar a la de una pasta de tomate o mostaza (Minekus et al., 2014), y luego para simular las condiciones alteradas de masticación de un adulto mayor se redujo el número de ciclos en un 50%.

Para el caso de los alimentos líquidos, esta etapa se suprimió y 10 mL de alimento se mezclaron directamente con el FGS, tal y como se describe a continuación.

En la **etapa gástrica**, se añadieron 10 mL de FGS, considerando el 100% de concentración de enzimas típico de un adulto sano para el modelo de digestión Control, y el 75% de concentración de enzima para el caso de los modelos de digestión alterados Sénior. Seguido a esto, se ajustó el pH con la ayuda de un pHmetro (Mettler Toledo, Seven Compact™ S210) y la adición de HCl 1 N. Luego, se colocaron los tubos en un agitador rotatorio a 55 rpm dentro de una cámara termostataada (Selecta, modelo Rotabit) a 37 °C durante 2 h. Finalizado este periodo de tiempo, se centrifugaron las muestras en una centrífuga (Eppendorf, Centrifuge 5804 R) a 10000 xg durante 5 min a una temperatura de 5 °C y se tomaron alícuotas para la determinación de aminoácidos.

En la **etapa intestinal**, se añadieron 20 mL de FIS, considerando el 100% de concentración de enzimas y bilis típico de un adulto sano para el modelo de digestión Control, y el 50% de concentración de enzima y bilis para el caso de los modelos de digestión alterados Sénior. Seguido a esto, se ajustó el pH con NaOH 1 N y se continuó agitando los tubos a 55 rpm dentro de la cámara termostataada a 37 °C durante 2 y 4 h según el modelo de digestión. Antes de centrifugar, se ajustó el pH a 5 para detener la actividad enzimática, y se centrifugaron las muestras a 10000 xg durante 5 min a una temperatura de 5 °C. Finalmente, se tomaron alícuotas para análisis.

TABLA 4. Modelo de digestión de un adulto sano de mediana edad (control) y alteraciones en la población sénior (> 65 años)

ETAPA DIGESTIVA	CONTROL	SÉNIOR 1	SÉNIOR 2	SÉNIOR 3
	Adulto sano de edad media	Alteración oral	Alteración oral + gástrica	Alteración oral + gástrica + intestinal
Etapa Oral	Masticación humana: 20 - 30 ciclos (sólidos)	Masticación humana: 10 - 15 ciclos (sólidos)	Masticación humana: 10 - 15 ciclos (sólidos)	Masticación humana: 10 - 15 ciclos (sólidos)
Etapa Gástrica	Enzima 100%: Pepsina (2000 U/mL)	Enzima 100%: Pepsina (2000 U/mL)	Enzima 75%: Pepsina (1500 U/mL)	Enzima 75%: Pepsina (1500 U/mL)
	Ajuste pH 3	Ajuste pH 3	Ajuste pH 6	Ajuste pH 6
	Tiempo de digestión: 2 h	Tiempo de digestión: 2 h	Tiempo de digestión: 2 h	Tiempo de digestión: 2 h
Etapa Intestinal	Enzima 100%: Pancreatina (100 U/mL) según actividad tripsina	Enzima 100%: Pancreatina (100 U/mL) según actividad tripsina	Enzima 100%: Pancreatina (100 U/mL) según actividad tripsina	Enzima 50%: Pancreatina (50 U/mL) según actividad tripsina
	Bilis 10 mM (100%)	Bilis 10 mM (100%)	Bilis 10 mM (100%)	Bilis 5 mM (50%)
	Ajuste pH 7	Ajuste pH 7	Ajuste pH 7	Ajuste pH 7
	Tiempo de digestión: 2 h	Tiempo de digestión: 2 h	Tiempo de digestión: 2 h	Tiempo de digestión: 4 h

Determinaciones analíticas

CARACTERIZACIÓN INICIAL DEL ALIMENTO

Para la caracterización inicial de los alimentos sólidos, se llevaron a cabo análisis por triplicado del contenido de humedad, ceniza, grasa y proteína siguiendo los métodos oficiales 934.01, 942.05, 920.39 y 960.52, respectivamente de la *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC, 2002). Para los alimentos líquidos, se llevó a cabo las metodologías antes mencionadas, excepto para el análisis de grasa que se siguió la metodología de la *International Standard ISO 1211|IDF 001:2010*, (ISO, 2010). El contenido de carbohidratos fue calculado por diferencia.

EXTENSIÓN DE LA PROTEÓLISIS

La determinación de aminoácidos libres se realizó utilizando el kit de aminoácidos EZ-Faast (Phenomenex, Reino Unido) como indica el procedimiento propuesto por Peinado (2016). De acuerdo a este, primero se derivatizaron las muestras, y posteriormente, se analizó el perfil de aminoácidos libres mediante cromatografía de gases -espectrometría de masas (GC-MS) (Agilent Technologies, 5975 inert Mass Selective Detector). Para ello, las muestras fueron previamente centrifugadas (Eppendorf, Mini Spin) a 3500 xg durante 10 min. A continuación, se tomó una alícuota de 25 µL del sobrenadante para los digeridos de la fase gástrica y 2.5 µL para los digeridos de la fase intestinal. Luego, se llevó a cabo el procedimiento del kit de aminoácidos EZ-Faast, el cual consiste en una extracción de la fase sólida, seguido de la derivatización y una extracción líquido-líquido, para ser analizadas luego por GC-MS. La extracción de la fase sólida se realizó utilizando una punta con sorbente empacado que liga los aminoácidos, mientras que permite el flujo de compuestos interferentes. Los aminoácidos ligados a la punta fueron derivatizados con reactivos orgánicos en solución acuosa. Al mismo tiempo, los aminoácidos derivatizados migran a la fase orgánica para una adicional separación líquido- líquido de compuestos interferentes. Finalmente, la fase orgánica es extraída, evaporada y resuspendida para realizar el análisis cromatográfico, del cual se obtuvieron los cromatogramas para integrar las áreas bajo la curva utilizando el software MSD ChemStation.

EXTENSIÓN DE LA LIPÓLISIS

Para aquellas muestras que presentaron más de un 5% de grasa en su composición, se realizó una extracción en frío de ésta, con la finalidad de obtener un perfil de composición lipídico, considerando el análisis de triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos por resonancia Magnética Nuclear (RMN-¹H), tanto del alimento inicial como del digerido, siguiendo la metodología propuesta por Nieva-Echevarría et al. (2015). Para la extracción de la grasa en las muestras se empleó diclorometano (CH₂Cl₂, grado HPLC, Honeywell, Francia) como disolvente. La proporción utilizada

para el alimento sin digerir fue de 1:2 (p/v) y en el digerido de 2:3 (v/v). Para mejorar la extractabilidad de la grasa en el alimento sin digerir, se colocó la mezcla en un baño de ultrasonidos (Selecta, Ultrasons-H) durante 1h. Después, se realizaron lavados de las muestras con una solución saturada de cloruro de sodio (NaCl, Sigma Aldrich, USA), y se le añadió sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄, Panreac Applichem, Alemania) con la punta de la espátula para eliminar restos de agua en el extracto orgánico. Luego, se eliminó el solvente en un rotavapor (Heidolph, Laborota 4000 efficient) para evitar la oxidación de los lípidos. Finalmente, se realizó la lectura de los extractos lipídicos en un equipo de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H (Bruker, 400/R), para lo cual se mezclaron 200 µL de los extractos con 400 µL de cloroformo deuterado (CDCl₃, Acros Organics, Suiza). Los parámetros de adquisición utilizados fueron los siguientes: ancho espectral 6410 Hz, retardo de relajación 3 s, número de exploraciones 64, tiempo de adquisición 4.819 s y ancho de pulso 90°.

DIGESTIBILIDAD DE GLÚCIDOS

Los azúcares reductores del alimento inicial fueron determinados mediante el método colorimétrico del Ácido Dinitrosalicílico (DNS) adaptado de Miller (1959). Para la extracción, se pesaron 0.3 g de muestra en un tubo eppendorf de 5 mL, se adicionaron 2 mL de etanol al 80%, la mezcla se agitó en un vortex y se dejó reposar durante 30 min. A continuación, se centrifugó (Eppendorf, Centrifuge 5804 R) a 5000 xg durante 5 min, se separó la fase orgánica del sedimento, y a este último se le volvió a realizar una segunda extracción con etanol al 80%, unificando al final las dos fases orgánicas obtenidas (extracto). Se mezclaron 500 µL del extracto, con 1 mL del reactivo DNS en un tubo de ensayo, el cual se llevó a baño maría a 100 °C durante 5 min. Luego, se realizó un baño de agua con hielo durante 2 min agitando y 10 min más en reposo. Se diluyeron las muestras con 2.5 mL de agua destilada y se leyó en un espectrofotómetro (Beckman Coulter, DU 730) a una longitud de onda de 546 nm.

Para el caso de los azúcares reductores del digerido, también se siguió el método colorimétrico del Ácido Dinitrosalicílico (DNS), realizando una segunda digestión con las enzimas invertasa y amiloglucosidasa, de acuerdo a la metodología propuesta por Mishra et al. (2008). Se mezclaron 0.25 mL de la fase líquida del digerido y 1 mL de etanol absoluto (Panreac Applichem, Alemania), se le aplicó vortex a la muestra, se dejó reposar durante 30 min y se centrifugó (Eppendorf, Mini Spin) a 150 xg durante 10 min. Del extracto etanólico, se tomó una alícuota de 0.05 mL del sobrenadante o del estándar de glucosa (1 mg/mL de glucosa) (Sigma Aldrich, USA) y al que se le añadieron 0.25 de amiloglucosidasa al 1% más concentrado de invertasa al 1%. Se incubó a 37 °C con agitación rotatoria durante 10 min para completar la despolimerización en monosacáridos. Luego, se añadieron 0.75 mL de la mezcla de DNS, que contiene una proporción 1:1:5 de glucosa 0.5 mg/mL: NaOH 4M: Reactivo de DNS, y se calentaron a 100 °C durante 15 min. Se enfriaron los tubos en hielo, se añadieron 4 mL de agua, se agitó y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm.

El reactivo DNS se preparó disolviendo 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$, Sigma Aldrich, China), en 100 mL de una solución acuosa que contenía 30 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidrato ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$, Sigma Aldrich, USA), y 1.6 g de hidróxido de sodio (NaOH, Sigma Aldrich, USA).

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CALCIO

Para determinar el contenido de calcio del alimento inicial y de las muestras digeridas, se prepararon las muestras de acuerdo con el método publicado por Barrera et al. (2009), y determinadas según la metodología propuesta por Noël et al. (2008), utilizando un espectrómetro de absorción atómica de llama (Termo Scientific, iCE 3000 Series). La metodología requiere partir de las muestras incineradas, por lo cual se siguió el procedimiento para la obtención de cenizas que se indica en el apartado de caracterización inicial del alimento, considerando 6 g de muestra para alimento inicial y una alícuota de 4 mL para los alimentos digeridos. Las cenizas obtenidas, se disolvieron con 1.5 mL de ácido nítrico extra puro al 65% (HNO_3 , Honeywell, Alemania) y se le agregaron 4 mL de agua destilada. Luego, a esta disolución, se le adicionó 2.5 mL lantano al 1% (Honeywell, Francia) para evitar interferencias en la lectura del equipo, se consideró un volumen tal que permitió obtener una concentración de Lantano del 0.1 % al enrasar finalmente hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Finalmente, se realizó la medición de la absorbancia a 422.7 nm y se ajustó el cero de absorbancia con el blanco (disolución de La^{3+} al 0.1 %). La bioaccesibilidad de este mineral se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \frac{(\text{mgCa}^{2+} \text{ libre en el digerido} / 100 \text{ g alimento seco})}{(\text{mgCa}^{2+} \text{ en el alimento sin digerir} / 100 \text{ g alimento seco})} \cdot 100$$

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los diferentes análisis se analizaron estadísticamente utilizando el programa Statgraphics Centurion, mediante un análisis de varianza (ANOVA) simple y la prueba de múltiples rangos por LSD con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 5 muestra la composición porcentual de los alimentos objeto de estudio (leche entera, yogurt, queso curado y queso servilleta). Estos valores de composición concuerdan con los publicados en las bases de datos de la USDA - United States Department of Agriculture (2019) como era de esperar.

TABLA 5. Composición del alimento inicial (g/100 g de alimento seco) de leche entera, yogurt, queso curado y queso servilleta.

Constituyente	Leche entera	Yogurt	Queso curado	Queso servilleta
Proteína	24.56 ± 0.12	25.82 ± 0.19	34.9 ± 0.7	42.6 ± 0.8
Grasa	28.3 ± 0.1	23.19 ± 0.12	44.6 ± 1.9	46.77 ± 0.08
Ceniza	5.641 ± 0.006	5.705 ± 0.004	7.7 ± 0.1	7.00 ± 0.04
Carbohidratos	41.5 ± 0.2	45.3 ± 0.3	13 ± 3	3.6 ± 0.9

Los valores presentados corresponden a la media de tres repeticiones con su respectiva desviación estándar. Resultados reportados en base seca.

Extensión de proteólisis y perfil de aminoácidos libres de productos lácteos tras su digestión en condiciones de población sénior

Inicialmente, se estimó la extensión de proteólisis en cada una de las muestras al término de la fase gástrica en el modelo de digestión Control, donde se obtuvieron valores muy bajos correspondientes a menos de 1 g aminoácidos/ 100 g de proteína inicial para la leche entera, yogurt y queso servilleta. Este resultado se explica debido a la especificidad de la pepsina gástrica la cual hidroliza las proteínas, en este caso caseínas fundamentalmente, a cadenas pépticas de diferente número aminoacídico, pero no a aminoácidos libres, lo cual sí sucede en la etapa intestinal (Rinaldi et al., 2014). En el queso curado, sin embargo, se obtuvo un valor de 7.03 g aminoácidos/ 100 g de proteína inicial, que podría resultar de la maduración del queso durante la cual tiene lugar la proteólisis de los péptidos dando lugar a la formación de una fracción de nitrógeno soluble en agua pasando a aminoácidos libres (Fang et al., 2016). Dado que la generación de aminoácidos libres en la etapa gástrica es baja, a excepción del caso del queso curado, se decidió no evaluar la proteólisis en esta etapa dado que el método cromatográfico empleado únicamente detecta aminoácidos libres y no péptidos.

En la Figura 2 se muestra la extensión de proteólisis al final de la digestión bajo condiciones Control, Sénior 1, 2 y 3. En general, es posible concluir que las alteraciones de las condiciones intestinales (modelo Sénior 3) propias de individuos de avanzada edad, son las que más condicionan la hidrólisis proteica en alimentos lácteos.

A fin de analizar los resultados más detalladamente, se discute, sin embargo, el efecto de alteraciones de cada etapa digestiva. Así, la alteración en la fase oral en el modelo Sénior 1 no fue considerada en los alimentos líquidos (leche entera y yogurt), ya que no necesitan desestructuración de la matriz alimentaria. Sin embargo, la alteración de las características de la fase oral (número de ciclos de masticación y por tanto nivel de salivación), sí afectó significativamente la digestibilidad de las proteínas en el caso del queso servilleta, evidenciándose una disminución debido a que, la desintegración del alimento en esta fase es relevante permitiendo dividir el alimento en partículas de menor tamaño, aumentando el área de superficie para la digestión y absorción de los nutrientes atrapados en la matriz del alimento (Kong y Singh, 2008). La masticación influye en las tasas de vaciado gástrico y hacerlo de forma inadecuada puede provocar una mala digestión y, por lo tanto, generar malnutrición (Pera et al., 2002). Una masticación subóptima puede darse en

los adultos mayores cuando la pérdida de dientes es inevitable, resultando de esto, que las personas tiendan a alimentarse bajo una dieta pobre en nutrientes para adaptarse a sus limitaciones, o en su defecto tienden a deglutir partículas grandes provocando problemas digestivos (N’Gom y Woda, 2002).

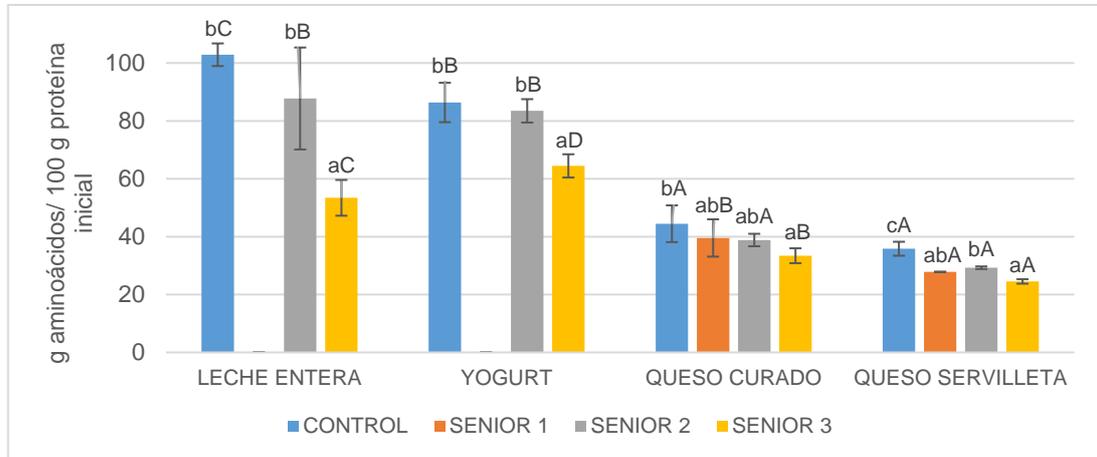


FIGURA 2. Extensión de proteólisis de los diferentes modelos de digestión, correspondientes a un adulto sano (Control) y las alteraciones en un adulto mayor (Sénior 1, Sénior 2 y Sénior 3), después de la digestión *in-vitro* de los productos lácteos objeto de estudio (leche entera, yogurt, queso curado y queso servilleta). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre modelos, con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre alimentos, con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$).

La alteración de la fase gástrica adicionalmente a la oral (modelo Sénior 2) pareció afectar ligeramente a todos los productos, pero sin diferencias estadísticamente significativas. Cabría esperar, el que una menor concentración de pepsina unida al mayor pH gástrico, con respecto al control, interfirieran en la hidrólisis proteica dado que la pepsina se encuentra prácticamente inactivada a pH 6 (Kong y Singh, 2008). Sin embargo, la fácil digestibilidad de las proteínas lácteas y la afinidad de las proteasas intestinales por éstas, dan lugar a que una extensión de la proteólisis muy similar a la obtenida bajo condiciones Control.

En cuanto a la alteración adicional de la etapa intestinal (modelo Sénior 3), ésta afectó a la digestibilidad de cada uno de los alimentos. Este hecho estaría relacionado directamente con la simulación de una menor secreción pancreática, cuyas enzimas son responsables de romper los enlaces peptídicos, dando lugar a una digestión subóptima de las proteínas, lo que puede conducir a una mala absorción de nutrientes, en este caso de aminoácidos esenciales (Rinaldi et al., 2014; Imrie et al., 2010).

Si se evalúa el efecto matriz alimentaria, es posible concluir que existe diferencia significativa en la digestibilidad proteica entre los alimentos, y especialmente entre los de matriz líquida y sólida. La menor proteólisis presentada en las matrices sólidas (quesos) podría ser debido a que la matriz de caseína es más compacta, lo cual obstaculiza el acceso de las proteasas al sustrato. En el caso de los líquidos al no haber esta resistencia, la actividad proteolítica es más eficiente (Fang et al., 2016).

Asimismo, se puede decir que en condiciones de digestión Control existe una diferencia significativa en el nivel de proteólisis entre la leche entera (103 ± 4 g aminoácidos/ 100 g de proteína inicial) y el yogurt (86 ± 7 g aminoácidos/ 100 g de proteína inicial), lo cual también es evidente en el modelo Sénior 3. Esta diferencia puede estar atribuida a que el procesamiento del alimento define su estructura y organización de la matriz alimentaria, actuando como regulador de liberación de nutrientes. Así, al tener el yogurt una consistencia semisólida limita el acceso de las enzimas digestivas, y por lo tanto, una menor proteólisis.

Por otro lado, el queso curado (44 ± 6 g aminoácidos/ 100 g de proteína inicial) y el queso servilleta (36 ± 2 g aminoácidos/ 100 g de proteína inicial) no presentaron diferencias significativas en cuanto a la extensión de la proteólisis en el control. Sin embargo, se puede observar que la proteólisis en el queso curado es ligeramente más alta, debido a que su composición tiene mayor influencia sobre la desintegración del queso que las propiedades estructurales (a mayor desintegración, mayor actividad proteolítica). Como se mencionó anteriormente, durante la maduración del queso curado tienen lugar una serie de cambios bioquímicos consecuencia de cierta actividad proteolítica y lipolítica. Los péptidos y aminoácidos libres generados durante la maduración pueden actuar como catalizadores endógenos de la hidrólisis proteica durante la digestión.

A continuación, se presenta el perfil de aminoácidos en g aminoácido/ g proteína inicial para cada uno de los alimentos evaluados (leche entera, yogurt, queso curado y queso servilleta) y los diferentes modelos de digestión (Control, Sénior 1, Sénior 2 y Sénior 3). Dentro de este perfil, se evaluaron los aminoácidos esenciales (en negrita) y no esenciales: Alanina (ALA), Sarcosina (SAR), Glicina (GLY), Ácido α -Aminobutírico (ABA), **Valina (VAL)**, Ácido β -Aminoisobutírico (β AIB), **Leucina (LEU)**, Allo-Isoleucina (aILE), **Isoleucina (ILE)**, **Treonina (THR)**, Serina (SER), Prolina (PRO), Asparagina (ASN), Ácido Aspártico (ASP), **Metionina (MET)**, Hidroxiprolina (HYP), Ácido Glutámico (GLU), **Fenilalanina (PHE)**, Ácido α - Aminoadípico (AAA), Glutamina (GLN), Ornitina (ORN), **Lisina (LYS)**, **Histidina (HIS)**, Tirosina (TYR), **Triptófano (TRP)** y Cistina (C-C).

En las Figuras 3, 4, 5 y 6 se puede observar la cantidad de aminoácidos libres en la leche entera, yogurt, queso curado y queso servilleta respectivamente, donde se puede observar que hay una tendencia a la disminución en el contenido de aminoácidos esenciales entre los diferentes modelos de digestión, para el caso de la leche entera y el queso servilleta. En el caso del yogurt, no hay una tendencia clara sobre el contenido de aminoácidos esenciales entre los diferentes modelos de digestión, y en el queso curado, inclusive los valores no difieren en gran medida. De acuerdo con los perfiles de aminoácidos determinados en los digeridos, se evidencia una relación con el contenido de aminoácidos del alimento inicial reportado por BEDCA - Base de datos española de composición de alimentos (2019), siendo la valina, leucina, fenilalanina y lisina los aminoácidos esenciales más abundantes.

Considerando a la leucina como uno de los aminoácidos más relevante, ya que interviene en la estimulación de la síntesis proteica y la generación del

músculo (Arroyo y Gutiérrez, 2016), es posible observar que las alteraciones influyen en el contenido de este aminoácido, siendo las alteraciones intestinales (Sénior 3) las más influyentes con una reducción porcentual del 41.5% para la leche, 15% para el yogurt, 16.1% para el queso curado y 22.2% para el queso servilleta, con respecto al modelo control.

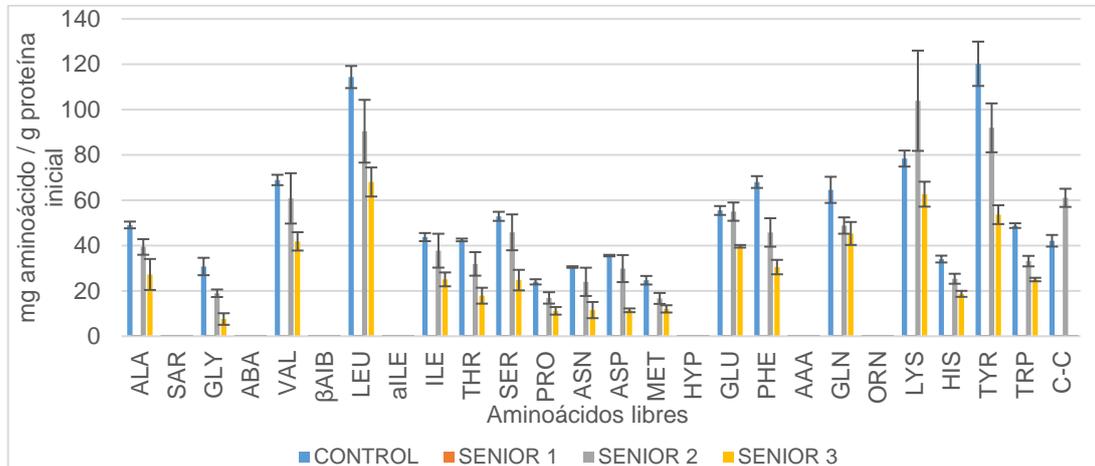


FIGURA 3. Cantidad de aminoácidos libres en g aminoácidos/ g proteína inicial presentes en muestras digeridas de leche entera, de acuerdo a los modelos de digestión *in-vitro* (Control, Sénior 1, Sénior 2 y Sénior 3).

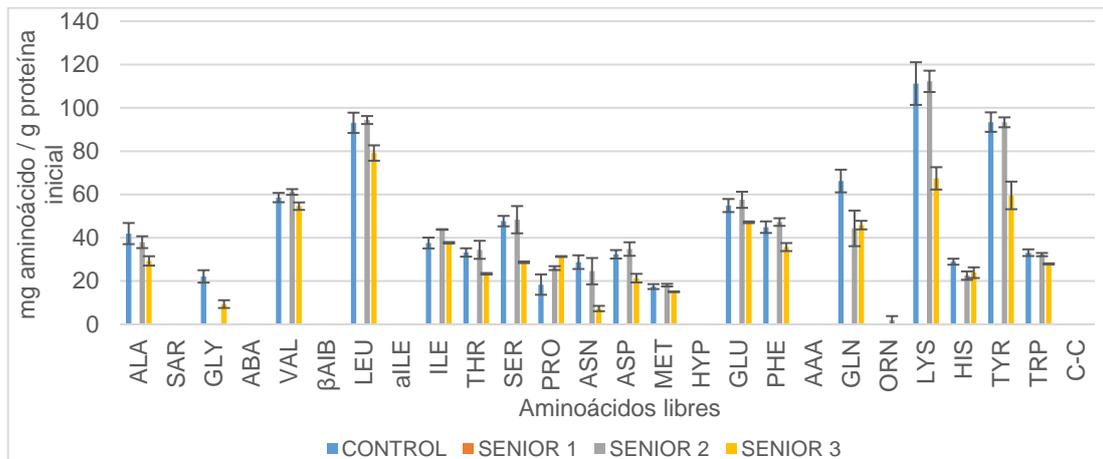


FIGURA 4. Cantidad de aminoácidos libres en g aminoácidos/ g proteína inicial presentes en muestras digeridas de yogurt, de acuerdo a los modelos de digestión *in-vitro* (Control, Sénior 1, Sénior 2 y Sénior 3).

La secreción de pepsina y enzimas pancreáticas de este grupo poblacional disminuye con la edad, por lo cual la actividad proteolítica en el intestino delgado se ve afectada, y con ello la disponibilidad de aminoácidos. Un problema evidente en los adultos mayores es que la masa muscular disminuye con la edad, debido a que no existe una adecuada síntesis de proteínas, lo que puede producir sarcopenia, que es la pérdida de masa muscular en combinación con una pérdida de fuerza muscular o rendimiento físico, que conlleva dificultades como la capacidad reducida para realizar tareas cotidianas y mayores riesgos de caídas (Rémond et al., 2015).

Dado que los productos lácteos tienen en su composición una cantidad importante de aminoácidos esenciales, ya que contienen proteínas de alto valor biológico, es de vital importancia que el adulto mayor ingiera productos de este grupo alimenticio, siendo la recomendación de consumo de proteínas de 0.8 g/kg peso, y de 1 a 1.2 g/kg peso cuando el envejecimiento del individuo progresa (Arroyo y Gutiérrez, 2016; Rémond et al., 2015).

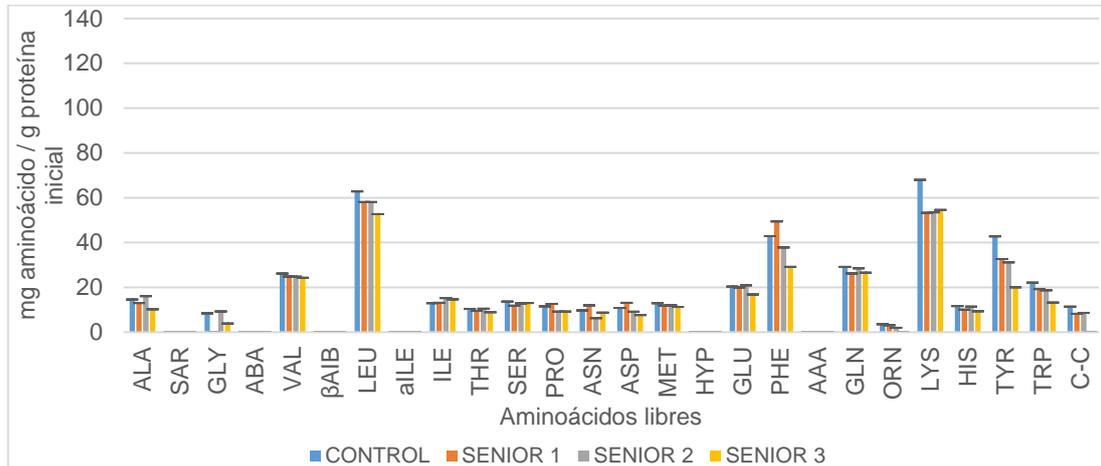


FIGURA 5. Cantidad de aminoácidos libres en g aminoácidos/ g proteína inicial presentes en muestras digeridas de queso curado, de acuerdo a los modelos de digestión *in-vitro* (Control, Sénior 1, Sénior 2 y Sénior 3).

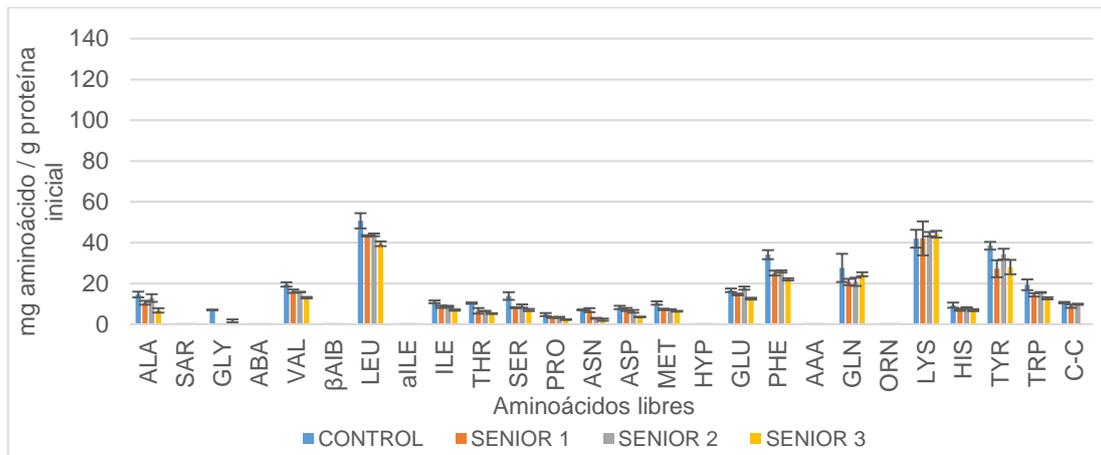


FIGURA 6. Cantidad de aminoácidos libres en g aminoácidos/ g proteína inicial presentes en muestras digeridas de queso servilleta, de acuerdo a los modelos de digestión *in-vitro* (Control, Sénior 1, Sénior 2 y Sénior 3).

Influencia de las condiciones gastrointestinales en la extensión de la lipólisis de productos lácteos

Como se indicó en el apartado de materiales y métodos, se evaluó la extensión de lipólisis a las muestras que presentaron más de un 5% de grasa en su composición, en este caso, el queso curado y el queso servilleta. Partiendo de las extracciones de grasa del alimento inicial y de las muestras digeridas se obtuvieron espectros de RMN-¹H, los cuales fueron analizados de acuerdo a la publicación de Nieva-Echevarría et al. (2015), donde se

proponen ecuaciones derivadas de los datos espectrales de ¹H NMR usadas para cuantificar los productos lipolíticos obtenidos de la hidrólisis de triglicéridos (TG). Es así, que durante esta digestión los lípidos se hidrolizan a 1,2-diglicéridos (1,2-DG), 1,3-diglicéridos (1,3-DG), 2-monoglicéridos (2-MG), 1-monoglicéridos (1-MG), ácidos grasos (FA) y glicerol.

En base a los resultados del perfil lipídico tanto en el queso curado como en el queso servilleta (Tabla 6 y 7), se puede observar que el alimento inicial (sin digerir) está compuesto mayormente por TG con un 98.1% y 97.84% respectivamente. Al digerir los alimentos según los modelos de digestión Control, Sénior 1, Sénior 2 y Sénior 3, se produce un incremento en FA, consecuencia de la actividad lipolítica de la pancreatina. Asimismo, también se generan glicéridos potencialmente absorbibles como el 2-MG y el 1-MG, los cuales se encuentran en similar proporción con el 1,2-DG que también fue uno de los productos de hidrólisis, mientras que el 1,3-DG fue casi nulo.

TABLA 6. Extensión de lipólisis en muestras de queso curado como alimento inicial y del alimento digerido, de acuerdo a los modelos de digestión *in-vitro* (Control, Sénior 1, Sénior 2 y Sénior 3).

Cantidad en función de AG y FA (%)	Alimento inicial	Control	Sénior 1	Sénior 2	Sénior 3
AG TG%	98.1 ± 0.7 ^c	18 ± 4 ^b	10 ± 2 ^a	6.7 ± 1.4 ^a	7.06 ± 0.19 ^a
AG 1,2-DG%	1.3 ± 0.4 ^a	8 ± 2 ^b	8 ± 3 ^b	6.9 ± 0.9 ^b	5.3 ± 0.2 ^b
AG 1,3-DG%	1.15 ± 0.12 ^b	0.3 ± 0.3 ^a	0.4 ± 0.7 ^{ab}	1.1 ± 0.5 ^{ab}	1.14 ± 0.04 ^{ab}
AG 2-MG%	0.0 ± 0.0 ^a	7.8 ± 0.9 ^d	9.8 ± 0.4 ^e	6.2 ± 0.3 ^c	3.35 ± 0.13 ^b
AG 1-MG%	0.0 ± 0.0 ^a	3.1 ± 0.3 ^b	3.5 ± 0.8 ^b	2.8 ± 0.7 ^b	2.43 ± 0.16 ^b
FA%	-0.5 ± 0.2 ^a	62.8 ± 0.5 ^b	67.99 ± 0.19 ^c	76 ± 4 ^d	80.7 ± 0.8 ^e

AG: Grupos acilos, FA: Ácidos grasos.

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre modelos, con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$).

TABLA 7. Extensión de lipólisis en muestras de queso servilleta como alimento inicial y del alimento digerido, de acuerdo a los modelos de digestión *in-vitro* (Control, Sénior 1, Sénior 2 y Sénior 3).

Cantidad en función de AG y FA (%)	Alimento inicial	Control	Sénior 1	Sénior 2	Sénior 3
AG TG%	97.84 ± 0.12 ^c	11.09 ± 1.14 ^{ab}	12 ± 3 ^{ab}	13.3 ± 0.9 ^b	8.4 ± 0.1 ^a
AG 1,2-DG%	1.3 ± 0.3 ^a	10.0 ± 0.8 ^b	8.2 ± 0.7 ^b	8.3 ± 1.5 ^b	8.65 ± 0.16 ^b
AG 1,3-DG%	1.16 ± 0.14 ^c	0.96 ± 0.02 ^d	0.3 ± 0.1 ^b	-0.10 ± 0.19 ^a	0.62 ± 0.04 ^b
AG 2-MG%	0.0 ± 0.0 ^a	6.36 ± 0.15 ^d	6.9 ± 0.6 ^c	6.7 ± 0.2 ^c	4.29 ± 0.05 ^b
AG 1-MG%	0.0 ± 0.0 ^a	1.85 ± 0.06 ^b	2.1 ± 0.3 ^b	2.1 ± 0.4 ^b	1.84 ± 0.01 ^b
FA%	-0.3 ± 0.3 ^a	69.8 ± 0.6 ^b	71 ± 3 ^b	69.7 ± 0.7 ^b	76.2 ± 0.3 ^c

AG: Grupos acilos, FA: Ácidos grasos.

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre modelos, con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$).

Analizando los datos estadísticamente mediante la prueba de múltiples rangos con un 95% de confianza, y centrándose en el porcentaje de FA obtenidos en el queso curado, se puede observar que existen diferencias significativas entre todos los modelos, presentándose una tendencia de incremento. Lo anterior pudiera responder a que las características propias del alimento, como la composición, influyen sobre la hidrólisis de los

triglicéridos, ya que al ser un alimento con un alto contenido graso reduce la actividad de la lipasa. McClements et al. (2010) explica, que, si durante la digestión de los lípidos, los productos de hidrólisis no son eliminados del sitio de actividad enzimática, la conversión de TG en MG y FA no se llevaría a cabo por la alta concentración de productos de reacción.

Por otro lado, en el queso servilleta se puede observar una diferencia significativa solamente en el modelo Sénior 3 con respecto al control evidenciando que la fase oral y gástrica no influyen mayormente sobre la digestibilidad de las grasas. Harper (1998) menciona que disminuciones de la producción de lipasa pancreática, propias de población sénior, no afecta a la digestibilidad de las grasas, dado que la lipasa es secretada por encima de lo requerido. Así, el incremento en la digestibilidad de las grasas pudiera estar relacionado con un mayor tiempo de digestión (4 h). Lamothe et al. (2012) no hace referencia expresamente a este hecho, ya que no es el objetivo de su estudio. Sin embargo, revela que, a mayor tiempo de digestión, el porcentaje de FA tiende a incrementar.

Influencia de las condiciones gastrointestinales propias de población sénior en la digestión de los glúcidos en alimentos lácteos

El único azúcar presente en productos lácteos es la lactosa. Durante el proceso de digestión *in-vitro* no hay presencia de la enzima lactasa que catalice la hidrólisis de la lactosa, liberando los monosacáridos constituyentes, glucosa y galactosa (Walsh, 2013, Nollet y Toldrá, 2009). Sin embargo, la lactosa como tal es un azúcar reductor, el cual fue cuantificado mediante el método colorimétrico del Ácido Dinitrosalicílico (DNS).

En la Figura 7 se presentan los resultados de liberación de azúcares en matrices de productos lácteos (leche entera, yogurt, queso curado y queso servilleta). Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de múltiples rangos con un 95% de confianza, se puede observar que no existen diferencias significativas entre los modelos de digestión Control y las alteraciones Sénior 1, 2 y 3 en yogurt, queso curado y queso servilleta. No obstante, en la leche se observan diferencias significativas en todos los modelos de digestión. No se han encontrado estudios publicados en los que se determine lactosa en digeridos de productos lácteos que puedan respaldar los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, se podría encontrar relación entre el efecto de la degradación de la matriz alimentaria y la coagulación de la misma con la liberación de nutrientes, entre ellos los azúcares. Wang et al. (2018) reporta coagulación de proteínas en varias matrices lácteas, entre ellas leche, lo cual genera una matriz de difícil acceso de las enzimas y liberación de nutrientes. En el caso del yogurt, queso curado y queso servilleta se parte de matrices ya coaguladas.

La cuantificación de lactosa liberada durante la digestión gastro-intestinal es importante, ya que los problemas de intolerancia a la lactosa son bastante frecuentes en la población sénior (Di Stefano et al., 2001; Rémond et al., 2015).

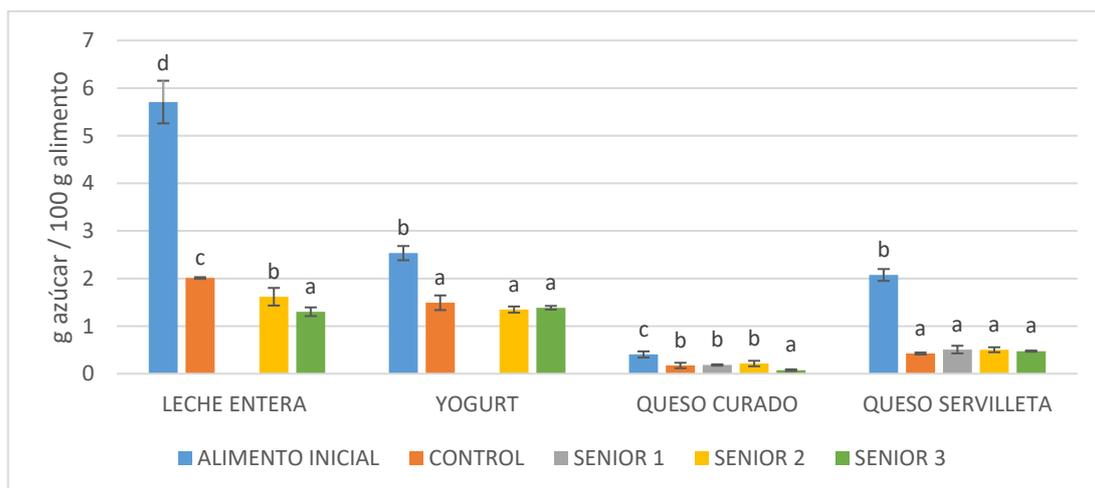


FIGURA 7. Concentración de azúcares reductores en muestras de leche entera, yogurt, queso curado y queso servilleta como alimento inicial y del alimento digerido, de acuerdo a los modelos de digestión *in-vitro* (Control, Sénior 1, Sénior 2 y Sénior 3). Letras minúsculas indican diferencias significativas entre modelos, con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$).

Bioaccesibilidad del calcio en condiciones alteradas propias de población sénior

El contenido de calcio se determinó en el alimento sin digerir, y se determinó también la bioaccesibilidad de calcio en el alimento digerido, los cuales se encuentran en la Tabla 8. Los datos obtenidos, fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de múltiples rangos con un 95% de confianza, la cual reveló que, para leche entera y yogurt no existen diferencias significativas en la bioaccesibilidad del calcio entre el modelo control y los modelos alterados Sénior 2 y 3.

TABLA 8. Contenido de calcio ($\text{mg Ca}^{2+}/\text{g}$ alimento (base seca)) en el alimento inicial sin digerir y bioaccesibilidad de calcio post-digestión *in-vitro* de productos lácteos (leche entera, yogurt, queso curado y queso servilleta), de acuerdo con los diferentes modelos de digestión.

MODELO	LECHE ENTERA	YOGURT	QUESO CURADO	QUESO SERVILLETA
CALCIO ALIMENTO INICIAL ($\text{mg Ca}^{2+}/100\text{ g}$ alimento (base seca))				
SIN DIGERIR	554 ± 14	585 ± 6	522 ± 11	655 ± 31
BIOACCESIBILIDAD DE CALCIO (%)				
Control	93 ± 3 ^{aC}	111 ± 2 ^{aD}	39.0 ± 1.8 ^{aA}	51.3 ± 0.3 ^{cB}
Sénior 1	-	-	61 ± 7 ^{bA}	43.8 ± 0.4 ^{abA}
Sénior 2	97 ± 2 ^{aC}	114 ± 8 ^{aC}	19 ± 12 ^{aA}	48 ± 4 ^{bcB}
Sénior 3	96.4 ± 0.9 ^{aC}	105 ± 1 ^{aD}	29 ± 1 ^{aA}	42.0 ± 0.9 ^{aB}

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre modelos, con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre alimentos, con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$). Resultados reportados en base seca.

Para el caso del queso curado, se puede observar que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la bioaccesibilidad del

calcio entre el modelo de digestión Sénior 1 y el resto de modelos (incluido el Control). De estos resultados, no es posible concluir que la alteración de la fase oral del modelo Sénior 1, dada por una reducción de los ciclos de masticación, ejerce un efecto positivo, puesto que en los modelos Sénior 2 y 3, donde se alteran las etapas gástrica e intestinal, además de la oral, no se observa este incremento con respecto al control.

Por otro lado, en el queso servilleta, se puede observar que existe diferencia significativa entre los modelos de digestión Sénior 1 y Sénior 3 con respecto al modelo Control. De ello, se puede deducir que las alteraciones en las etapas oral e intestinal podrían influir, aunque no de forma acusada, sobre la bioaccesibilidad, dado que se produce un ligero descenso. Se ha dicho anteriormente, que la matriz del alimento influye sobre la digestión en el tracto gastrointestinal, ya que una matriz más compacta y firme, como la del queso curado y servilleta, resiste a la descomposición, y sumado a esto la alteración de la fase oral, retrasa la liberación de nutrientes (Ayala et al., 2016). De esto y dado que, el análisis arrojó que en el modelo Sénior 1 para el queso curado se presenta un incremento en la bioaccesibilidad del calcio, mientras que en el queso servilleta hay una disminución, se sugiere realizar un estudio a nivel de microestructura en el alimento y el digerido, y determinar así, como influye la matriz del alimento.

Por otro lado, los resultados obtenidos del modelo Sénior 2 no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al modelo Control, lo cual no apoya a lo obtenido por Lorieau et al. (2018), quién indicó que el pH gástrico en adultos mayores está menos controlado que el de un adulto sano, siendo menos ácido, y, por tanto, dando lugar a que el calcio iónico no pueda ser liberado y absorbido en el intestino delgado.

Por último y como es bien conocido, cabe destacar que la bioaccesibilidad del calcio en leche y yogurt fue muy superior a la de los quesos; en los quesos fue menor debido a que el calcio se encuentra alojado en las micelas de caseínas a través de los puentes de fosfato cálcico. Entre los alimentos líquidos, la leche entera presenta menor bioaccesibilidad que el yogurt, debido a que el tratamiento térmico de la ultrapasteurización en la leche reduce la solubilidad del calcio al formarse productos de reacción de Maillard (PRM) por su contenido de proteínas y azúcar, formando complejos de calcio-PRM durante el proceso de digestión (Seiquer et al., 2010).

Entre los alimentos sólidos, el queso curado y servilleta también presentan diferencias en términos de bioaccesibilidad. Se observa que es menor en el queso curado, lo cual puede estar relacionado con el contenido lipídico de este producto, interaccionando los productos de digestión lipídica con el calcio, dando lugar a jabón de calcio insoluble (Preedy, 2015; Minekus et al., 2014), lo que reduciría su bioaccesibilidad.

El calcio es uno de los nutrientes esenciales para una buena salud ósea, ya que existe una relación positiva entre el consumo de calcio y la disminución de la tasa de pérdida ósea y el riesgo de fracturas. En los adultos mayores tiende a presentarse una disminución de la densidad mineral ósea, la cual puede conducir a enfermedades como la osteopenia e incluso la osteoporosis (Rémond et al., 2015; Siddique et al., 2017). En ese sentido, es importante

que este grupo poblacional incluya dentro de su dieta alimentos ricos en calcio, siendo los productos lácteos una fuente representativa de este mineral.

CONCLUSIONES

Las alteraciones de las condiciones intestinales del modelo Sénior 3 (oral + gástrica + intestinal), que pueden aparecer en ciertos adultos al alcanzar una edad avanzada, influyen sobre la digestión de las proteínas de los productos lácteos evaluados en este estudio. Una deficiente masticación en la fase oral, una menor concentración de pepsina sumado al incremento del pH a 6 en el estómago, y una menor concentración de pancreatina en la fase intestinal, producen una digestión subóptima de proteínas, dando como resultado un menor contenido de aminoácidos libres al final de la digestión. Por otro lado, las propiedades inherentes al alimento influyen sobre la proteólisis, puesto que, en los quesos de matriz de caseína más compacta que leche y yogurt, se produce una obstaculización del acceso de las enzimas digestivas al sustrato, provocando una menor digestibilidad proteica, que en leche y el yogurt.

En la lipólisis, el contenido de ácidos grasos incrementa conforme se suman las alteraciones de los modelos de digestión. Así, el modelo de digestión Sénior 3 contempla una mayor liberación de ácidos grasos debido a un mayor tiempo de digestión en la fase intestinal alterada (4 h). Este hecho podría indicar un efecto positivo de un mayor tiempo de residencia intestinal del quimo alimenticio sobre la digestibilidad de las grasas. Asimismo, los resultados también ponen de manifiesto un efecto significativo de la matriz alimentaria, sobre la lipólisis. Así, la liberación de ácidos grasos en la digestión del queso curado, que presenta el mayor contenido graso de entre los productos lácteos evaluados, es ligeramente superior que en queso servilleta bajo condiciones alteradas.

En cuanto a la liberación de azúcares en la digestión, ésta se ve reducida de forma drástica bajo condiciones alteradas, si bien no existen diferencias en función de la alteración simulada salvo en leche.

Por último, la bioaccesibilidad del mineral calcio en leche entera y yogurt es superior a la de los quesos, debido a que la matriz de los últimos es más compacta y el calcio se encuentra alojado en las micelas de caseínas como fosfato cálcico. Complementariamente, el tratamiento térmico de ultrapasteurización aplicado a la leche en los procesos de producción de productos lácteos, y que da lugar a la generación de productos de reacciones de Maillard, podría contribuir a la formación posterior de complejos entre el calcio y estos productos, reduciendo la solubilidad de este mineral.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados presentados forman parte del proyecto “Alteraciones digestivas en población sénior y su influencia en la digestibilidad de nutrientes” (AICO/2018/289) financiado por la Conselleria d’Educació, Cultura y Esport.

Los autores agradecen a la Generalitat Valenciana la financiación concedida para la ejecución del mismo.

Se agradece a la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) en Ecuador, por el financiamiento de los estudios de maestría.

REFERENCIAS

- AOAC International: "Official Methods of Analysis", [CD ROOM], 17 th Edition, 2002.
- Arbonés, G., Carbajal, A., Gonzalvo, B., González-Gross, M., Joyanes, M., Marques-Lopes, I., ... & Puigdueta, I. (2003). Nutrición y recomendaciones dietéticas para personas mayores: Grupo de trabajo "Salud pública" de la Sociedad Española de Nutrición (SEN). *Nutrición hospitalaria*, 18(3), 109-137.
- Arroyo, P., & Gutiérrez-Robledo, L. M. (2016). Adulto mayor. *Gaceta Médica de México*, 152(Suppl 1), 40-44.
- Ayala-Bribiesca, E., Lussier, M., Chabot, D., Turgeon, S. L., & Britten, M. (2016). Effect of calcium enrichment of Cheddar cheese on its structure, in vitro digestion and lipid bioaccessibility. *International dairy journal*, 53, 1-9.
- Barrera, C., Betoret, N., Corell, P., Fito, P. (2009). Effect of osmotic dehydration on the stabilization of calcium-fortified apple slices (var. Granny Smith): Influence of operating variables on process kinetics and compositional changes. *Journal of Food Engineering*, 92 (4), 416-424.
- BEDCA. Base de datos española de composición de alimentos. (2019). Recuperado de <http://bedca.net/bdpub/>. [Consulta: 26/08/2019].
- Chen, J., & Lollivret, L. (2011). The determining role of bolus rheology in triggering a swallowing. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 325-332.
- Di Stefano, G. Veneto, S. Malservisi, A. Strocchi, GR Corazza, M. (2001). Lactose malabsorption and intolerance in the elderly. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 36(12), 1274-1278.
- Envejecimiento. (2019). En: Oxford English Dictionary (2ª ed.). Recuperado de <https://www.lexico.com/es/definicion/envejecimiento>. [Consulta: 15/08/2019].
- Fang, X., Rioux, L. E., Labrie, S., & Turgeon, S. L. (2016). Disintegration and nutrients release from cheese with different textural properties during in vitro digestion. *Food Research International*, 88, 276-283.
- Harper, EJ (1998). Perspectivas cambiantes sobre el envejecimiento y las necesidades energéticas: envejecimiento y función digestiva en humanos, perros y gatos. *The Journal of Nutrition*, 128 (12), 2632S-2635S.
- Imrie, C. W., Connett, G., Hall, R. I., & Charnley, R. M. (2010). Enzyme supplementation in cystic fibrosis, chronic pancreatitis, pancreatic and periampullary cancer. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 32, 1-25.
- INE. Instituto Nacional de Estadística de España. (2014). Proyección de la Población de España 2014–2064. Nota de prensa: <http://www.ine.es/prensa/np870.pdf> . [Consulta: 22/08/2019].
- ISO1211, B. S. E. N. (2001). Milk: Determination of fat content. Gravimetric method (Reference method). British, European and International Standard. *International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland*.
- Jalabert-Malbos, M. L., Mishellany-Dutour, A., Woda, A., & Peyron, M. A. (2007). Particle size distribution in the food bolus after mastication of natural foods. *Food Quality and Preference*, 18(5), 803-812.
- Kong, F., & Singh, R. P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of food science*, 73(5), R67-R80.
- 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), 724-731.
- Le Révérend, B., Saucy, F., Moser, M., & Loret, C. (2016). Adaptation of mastication mechanics and eating behaviour to small differences in food texture. *Physiology & behavior*, 165, 136-145.
- Lorieau, L., Le Roux, L., Gaucheron, F., Ligneul, A., Hazart, E., Dupont, D., & Floury, J. (2018). Bioaccessibility of four calcium sources in different whey-based dairy matrices assessed by in vitro digestion. *Food chemistry*, 245, 454-462.

- Martínez Augustin, O., & Martínez de Victoria, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 01-14.
- McClements, D. J., & Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & function*, 1(1), 32-59.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... & Dufour, C. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124.
- Mishra, S., Monro, J., & Hedderley, D. (2008). Effect of processing on slowly digestible starch and resistant starch in potato. *Starch-Stärke*, 60(9), 500-507.
- N'Gom, P. I., & Woda, A. (2002). Influence of impaired mastication on nutrition. *The Journal of prosthetic dentistry*, 87(6), 667-673.
- Nieva-Echevarría, B., Goicoechea, E., Manzanos, M., Guillén, M. (2015). Usefulness of ¹H NMR in assessing the extent of lipid digestion. *Food Chemistry*, 179, 182-190.
- Noël, L., Carl, M., Vastel, C., & Guérin, T. (2008). Determination of sodium, potassium, calcium and magnesium content in milk products by flame atomic absorption spectrometry (FAAS): A joint ISO/IDF collaborative study. *International dairy journal*, 18(9), 899-904.
- Nollet, L. M., & Toldrá, F. (Eds.). (2009). *Handbook of dairy foods analysis*. CRC Press.
- ONU (2013). World population ageing 2013. En: Naciones Unidas.
- Payne-Botha, S., & Bigwood, E. J. (1959). Amino-acid content of raw and heat-sterilized cow's milk. *British Journal of Nutrition*, 13(4), 385-389.
- Peinado, I., Koutsidis, G., & Ames, J. (2016). Production of seafood flavour formulations from enzymatic hydrolysates of fish by-products. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 444-452.
- Pera, P., Bucca, C., Borro, P., Bernocco, C., De Lillo, A., & Carossa, S. (2002). Influence of mastication on gastric emptying. *Journal of dental research*, 81(3), 179-181.
- Peyron, M. A., Santé-Lhoutellier, V., François, O., & Hennequin, M. (2018). Oral declines and mastication deficiencies cause alteration of food bolus properties. *Food & function*, 9(2), 1112-1122.
- Preedy, V. R. (Ed.). (2015). *Calcium: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. Royal Society of Chemistry.
- Rémond, D., Shahar, D. R., Gille, D., Pinto, P., Kachal, J., Peyron, M. A., ... & Tomas-Cobos, L. (2015). Understanding the gastrointestinal tract of the elderly to develop dietary solutions that prevent malnutrition. *Oncotarget*, 6(16), 13858.
- Rinaldi, L., Gauthier, S. F., Britten, M., & Turgeon, S. L. (2014). In vitro gastrointestinal digestion of liquid and semi-liquid dairy matrixes. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 99-105.
- Seiquer, I., Delgado-Andrade, C., Haro, A. y Navarro, MP (2010). Evaluación de los efectos del tratamiento térmico severo de la leche sobre la biodisponibilidad de calcio: estudios in vitro e in vivo. *Revista de ciencias lácteas*, 93(12), 5635-5643.
- Shani-Levi, C., Alvito, P., Andrés, A., Assunção, R., Barberá, R., Blanquet-Diot, S., Bourlieu, C., Brodkorb, A., Cilla, A., Deglaire, A., Denis, S., Dupont, D., Heredia, A., Karakaya, S., Giosafatto, C.V.L., Mariniello, L., Martins, C., Ménard, O., Nehir El, S., Vegarud, G. E., Ulleberg, E. (2017). Extending in vitro digestion models to specific human populations: Perspectives, practical tools and bio-relevant information. *Trends in Food Science & Technology*, 60, 52-63.
- Siddique, N., O'Donoghue, M., Casey, M. C., & Walsh, J. B. (2017). Malnutrition in the elderly and its effects on bone health—A review. *Clinical nutrition ESPEN*, 21, 31-39.
- USDA. United States Department of Agriculture. USDA Food Composition Databases. (2019). Recuperado de <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>. [Consulta: 22/08/2019].
- Walsh, G. (2013). *Pharmaceutical biotechnology: concepts and applications*. John Wiley & Sons.
- Wang, X., Ye, A., Lin, Q., Han, J., & Singh, H. (2018). Gastric digestion of milk protein ingredients: Study using an in vitro dynamic model. *Journal of dairy science*, 101(8), 6842-6852.
- Woda, A., Foster, K., Mishellany, A., & Peyron, M. A. (2006). Adaptation of healthy mastication to factors pertaining to the individual or to the food. *Physiology & Behavior*, 89(1), 28-35.