



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## ***SIMULACIÓN IN VITRO DE ALTERACIONES DIGESTIVAS EN POBLACIÓN SÉNIOR Y SU INFLUENCIA EN LA DIGESTIBILIDAD DE PESCADOS***

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

ALUMNO/A: Ximena Paz Carrasco Loza

TUTOR/A ACADEMICO: Ana Belén Heredia Gutiérrez

COTUTOR/A: Ana María Andrés Grau

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Ever Hernández Olivas

*Curso Académico: 2018-2019*

VALENCIA, 13 de SEPTIEMBRE del 2019

# **SIMULACIÓN *IN VITRO* DE ALTERACIONES DIGESTIVAS EN POBLACIÓN SÉNIOR Y SU INFLUENCIA EN LA DIGESTIBILIDAD DE PESCADOS**

Carrasco, X., Hernández-Olivas, E.<sup>1</sup>, Andrés, A.<sup>1</sup> y Heredia, A.<sup>1</sup>

## **RESUMEN**

La población mundial está envejeciendo, lo cual viene acompañado de alteraciones digestivas que conllevan a una maldigestión y malabsorción de macronutrientes, además de afectar a la bioaccesibilidad de ciertos micronutrientes. En este contexto, el objetivo del presente estudio ha sido evaluar la influencia de las alteraciones digestivas en población sénior, así como las características inherentes al alimento, sobre la digestibilidad luminal de proteínas y grasas, y la bioaccesibilidad de calcio en cuatro tipos de pescados (salmón, sardina, lubina y merluza) utilizando un sistema estático de digestión *in vitro*.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el efecto de las alteraciones gastrointestinales (GI) dadas en población sénior sobre la extensión de la proteólisis es dependiente del tipo de pescado. Como en el caso de la lubina, salmón y sardina en que existe un efecto negativo sobre la digestibilidad de proteínas cuando se altera solo la fase oral y la acumulación de oral, gástrico e intestinal, a diferencia de la merluza, en que las alteraciones no provocan diferencias en los resultados de digestibilidad respecto al modelo simulado de un adulto sano (Control). Respecto al perfil de aminoácidos libres en los digeridos, la leucina es el que se encuentra en mayor cantidad. Sin embargo, éste disminuye drásticamente en condiciones alteradas en todos los pescados. Con referencia a la extensión de la lipólisis, la liberación de ácidos grasos libres fue de entre un 50 y 70% del total de grasas presentes en el alimento inicial. Respecto al efecto de las alteraciones sobre la digestión de grasas de Lubina, en la alteración completa GI, ocurre una menor liberación de ácidos grasos (68%) respecto al modelo control (71%). Por el contrario, en el salmón, el mayor tiempo de digestión intestinal del modelo en la alteración completa GI podría ser un factor favorable para la digestión de las grasas (70%), respecto al digerido control (55%).

Por último, la bioaccesibilidad del mineral calcio en salmón y sardina se vio significativamente afectada por las alteraciones digestivas propias de población de edad avanzada. De forma que, si bien la sardina presentó el mayor contenido en calcio, la alteración de las condiciones de la etapa gástrica resultó en una disminución drástica del contenido de calcio libre, y por tanto, de su bioaccesibilidad.

**PALABRAS-CLAVE:** digestión *in vitro*, sénior, lipólisis, proteólisis, pescados.

---

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

## ABSTRACT

World's population is aging, which is accompanied by digestive disorders that lead to macronutrient maldigestion and malabsorption, as well as affecting the bioaccessibility of certain micronutrients. In this context, the objective of the present study was to evaluate the influence of digestive disorders in senior population, as well as the inherent characteristics of food, on the luminal digestibility of proteins and fats, and the bioaccessibility of calcium in four types of fish (salmon, sardine, sea bass and hake) using a static *in vitro* digestion system.

The results obtained show that the effect of gastrointestinal (GI) disorders given in senior population on the extent of proteolysis is dependent on the type of fish. In the case of sea bass, salmon and sardine in which there are a negative effect on protein digestibility when only the oral phase and the accumulation of oral, gastric and intestinal are altered, unlike hake, in which the alterations do not cause differences in digestibility results compared to the simulated model of a healthy adult (Control). Regarding the profile of free amino acids in the digested, leucine is in the highest amount. However, this decreases drastically in altered conditions in all fish. With reference to the extent of lipolysis, the release of free fatty acids was between 50 and 70% of the total fat present in the initial food. Regarding the effect of alterations on the digestion of seabass fats, in the complete GI alteration, a lower release of fatty acids (68%) occurs compared to the control model (71%). On the contrary, in salmon, the longer intestinal digestion time of the model in the complete GI alteration could be a favorable factor for fat digestion (70%), compared to the digested control (55%).

Finally, the bioaccessibility of the calcium mineral in salmon and sardines was significantly affected by the digestive alterations of the elderly population. So, although sardine had the highest calcium content, the alteration of gastric stage conditions resulted in a drastic decrease in the content of free calcium, and therefore, its bioaccessibility.

**KEY-WORDS:** *In vitro* digestion, senior, lipolysis, proteolysis, fish.

## RESUM

La població mundial està envellint, la qual cosa ve acompanyat d'alteracions digestives que comporten a una maldigestió i malabsorció de macronutrients, a més d'afectar la bioaccessibilitat de certs micronutrients. En aquest context, l'objectiu d'aquest estudi ha sigut avaluar la influència de les alteracions digestives en població sènior, així com les característiques inherents a l'aliment, sobre la digestibilitat luminal de proteïnes i greixos, i la bioaccessibilitat de calci en quatre tipus de peixos (salmó, sardina, llobarro i lluç) utilitzant un sistema estàtic de digestió *in vitro*.

Els resultats obtinguts posen de manifest que l'efecte de les alteracions gastrointestinals (GI) donades en la població sènior sobre l'extensió de la proteòlisi és dependent del tipus de peix. Com en el cas del llobarro, salmó i

sardina en els que hi ha un efecte negatiu sobre la digestibilitat de proteïnes quan s'altera només la fase oral i l'acumulació de oral, gàstric i intestinal, a diferència del lluç, en el que les alteracions no provoquen diferències en els resultats de digestibilitat respecte al model simulat d'un adult sa (Control). Respecte al perfil d'aminoàcids lliures en els digerits, la leucina és el que es troba en major quantitat. No obstant això, aquest disminueix dràsticament en condicions alterades en tots els peixos. Pel que fa a l'extensió de la lipòlisi, l'alliberament d'àcids grassos lliures va ser d'entre un 50 i 70% del total de greixos presents en l'aliment inicial. Respecte a l'efecte de les alteracions sobre la digestió de greixos de llobarro, en l'alteració completa GI, ocorre una menor alliberament d'àcids grassos (68%) comparat amb el model control (71%). Per contra, en el salmó, el major temps de digestió intestinal del model en l'alteració completa GI podria ser un factor favorable per a la digestió dels greixos (70%), respecte al digerit control (55%).

Finalment, la bioaccessibilitat del mineral calci en salmó i sardina es va veure significativament afectat per les alteracions digestives pròpies de la població d'edat avançada. De manera que, malgrat la sardina va presentar el major contingut en calci, l'alteració de les condicions de l'etapa gàstrica va resultar en una disminució dràstica del contingut de calci lliure, i per tant, del seua bioaccessibilitat.

**PARAULES-CLAU:** digestió *in vitro*, sènior, lipòlisi, proteólisis, peixos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La población mundial está envejeciendo rápidamente, considerándose como población de “edad avanzada” aquella que supera los 65 años de edad en países desarrollados (OMS, 2002). Se estima que en las primeras cinco décadas del siglo XXI la proporción de la población mundial de más de 60 años se duplicará del 11% al 22%, además el segmento de personas de 80 años o más, será el de mayor crecimiento y se prevé que se triplique para 2060 (Agarwal et al., 2013). Es por esto, que el envejecimiento es una creciente preocupación mundial, identificada como uno de los próximos desafíos de la humanidad (ONU, 2015). De este modo, los profesionales de la alimentación, nutrición y salud deberán abordar el deterioro de la calidad de vida de personas sénior, el aumento de la prevalencia de enfermedades crónicas y junto con los diversos cambios fisiológicos que ocurren en esta población con el fin de mejorar su calidad de vida.

Con respecto al comportamiento de este grupo poblacional frente a los alimentos y su respectiva digestión, estudios indican que personas sénior experimentan los alimentos de una manera diferente, debido a la reducción de las percepciones sensoriales, cambios en la salivación y una deficiente salud oral (Gariballa y Sinclair, 1998; Shani- Levi et al., 2017). Asimismo, presentan un deterioro de ciertas funciones gastrointestinales (GI), que incluye la reducción o alteración de: secreciones de enzimas GI, composición de electrolitos lumenales, motilidad GI y secreción biliar, entre otros. Estas alteraciones conllevan una maldigestión y malabsorción de macronutrientes, de entre los que destaca la sarcopenia, o déficit proteico (Shani Levi et al., 2017). De igual forma, la bioaccesibilidad de ciertos micronutrientes, tales como vitaminas B12, D, E y A, y / o minerales, como el calcio y zinc, también suele verse comprometida (Lindenbaum et al., 1994; Rahme et al., 2017; Sales et al., 2018; Sun et al., 2012). Así, un estado de desnutrición puede desencadenar en un empeoramiento progresivo del estado de salud, aumentando el riesgo de caídas, anemia, desregulación inmunológica, deterioro del estado cognitivo o reducción de la función muscular, entre otros (Rashid et al., 2019).

Con el fin de minimizar las deficiencias nutricionales en población sénior, la Sociedad Española de Geriátrica y Gerontología (SEGG, 2019) recomienda el consumo de alimentos con un alto contenido en proteínas, y lípidos saludables. Entre los alimentos recomendados, encontramos carnes y pescados por el alto valor biológico de sus proteínas, pero también legumbres, lácteos o huevos. Sin embargo, estas recomendaciones no tienen en cuenta que las proteínas de la dieta pueden ser digeribles diferentemente en función de su origen y propiedades químicas o sus interacciones con otros macronutrientes en la matriz alimentaria, entre otros factores inherentes al alimento, ni cómo pueden influir las diferentes alteraciones GI propias de estos individuos a la digestibilidad proteica de cada matriz alimento. En este sentido, el estudio de la influencia de estos factores sobre la digestibilidad proteica de diferentes alimentos para conocer qué alimentos resultan de más fácil digestión para estos individuos.

Para ello, el uso de modelos de digestión *in vitro*, son una herramienta muy útil, ya que tienen la ventaja de ser más rápidos, menos costosos, menos laboriosos y tienen restricciones bioéticas significativamente menores, además por su fácil reproducibilidad, la posibilidad de poder seleccionar condiciones controladas y por el fácil muestreo, hacen que los modelos *in vitro* sean muy adecuados para los estudios de digestibilidad. Estos modelos, suelen incluir fase oral, gástrica e intestinal y en ocasiones fermentación intestinal, ya que intentan imitar las condiciones digestivas, tales como: concentraciones de pH, tiempo de digestión y concentraciones salinas, entre otros factores. Debido a las numerosas ventajas de este método, científicos del COST Infogest, establecieron un protocolo estándar y consensuado de simulación *in vitro* (en estático) del proceso digestivo en condiciones fisiológicamente normales (Minekus et al., 2014). En el caso de estudios de digestión *in vitro* en poblaciones específicas, como el caso de personas de edad avanzada, Shani-Levi et al. (2017) describen las condiciones y parámetros que se deben considerar al realizar estudios de digestibilidad *in vitro* orientados a este grupo poblacional.

Es por esto, que el objetivo del presente estudio ha sido evaluar mediante un sistema estático de digestión *in vitro* basado en Shani-Levi et al. (2017) la influencia de las alteraciones GI en población sénior, así como las características inherentes al alimento, sobre la digestión luminal de macronutrientes (proteínas y grasa) y la bioaccesibilidad de micronutrientes (calcio) presentes en cuatro tipos de pescado.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Materiales**

Para llevar a cabo la simulación *in vitro* gastrointestinal, se empleó pepsina procedente de la mucosa gástrica porcina suministrada por Sigma-Aldrich (P6887), pancreatina porcina de Sigma (P7545-100G) y bilis de origen bovino (10 mM) de Sigma-Aldrich (B3883).

Para la preparación de los stocks y fluidos digestivos simulados se emplearon los siguientes reactivos: KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y CaCl (0,3 M). Todos ellos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Para las determinaciones analíticas, se utilizó éter de petróleo (marca VWR CHEMICALS), ácido bórico (Sigma-Aldrich), ácido clorhídrico (Sigma-Aldrich), ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich), hidróxido sódico (Sigma-Aldrich), sulfato de potasio (Sigma-Aldrich), ácido nítrico (70%, marca Honeywell Fluka), lantano (0,1%, marca Honeywell Fluka), diclorometano (grado HPLC, ≥99,8%, marca HONEYWELL-FLUKA), cloruro de sodio (marca PanReac AppliChem), sulfato de sodio anhidro (marca PanReac AppliChem) y kit de aminoácidos EZ-Faast (marca PHENOMENEX).

## 2.2. Preparación de la muestra

Las matrices utilizadas en este estudio corresponden a cuatro tipos de pescado. Se seleccionaron especies de gran consumo en España (MERCASA, 2017), y dentro de éstas se seleccionaron dos pescados azules (altos en grasas): salmón y sardina; y dos pescados blancos (bajos en grasas): lubina y merluza, todos ellos adquiridos en comercios locales de Valencia, España. Los pescados se compraron frescos y fueron limpiados y eviscerados previamente a su congelación hasta el momento del ensayo. Los pescados se descongelaron a temperatura de refrigeración (5°C) durante 8 horas. Posteriormente se utilizaron 400 g de cada tipo de pescado, los cuales fueron cocinados por lotes de 200 g en microondas (marca SAMSUNG, modelo GW72N) a una potencia de 600 W durante 4 minutos en un plato extendido sin tapa, ya que este medio de cocción no requiere el uso de grasas adicionales y la fuente de calor es estandarizada (Hearn et al., 1987). Tras ser cocinados, se dejaron enfriar para retirar la piel y espinas, a excepción de la sardina la cual puede ser consumida con espinas.

## 2.3. Caracterización inicial de los alimentos

Después de la cocción, se procedió a caracterizar las muestras en términos de contenido en humedad, grasa, proteínas y cenizas por triplicado, de acuerdo con los métodos oficiales de la *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC, 2000).

El contenido en humedad se determinó gravimétricamente por desecación en estufa (60 °C) (JP-Selecta, modelo 2000201), hasta llegar a su peso constante. El porcentaje de proteínas totales se determinó a partir del contenido total de nitrógeno de las muestras de alimentos mediante el método Kjeldahl, utilizando el factor de conversión de 6,25. Para la determinación del contenido en grasa, se sometió inicialmente a las muestras a una extracción con éter de petróleo (60:40) mediante un equipo Soxhlet (FOSS, modelo Soxtec 2055). Adicionalmente, en el caso específico del salmón y la lubina, al ser las variedades de pescados que presentaron la mayor concentración de lípidos, se realizó una extracción lipídica en frío con objeto de estudiar perfil lipídico por Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H de acuerdo al protocolo publicado por Nieva-Echevarría et al. (2015). Para ello, 6 g de muestras troceadas y homogenizadas se mezclaron con diclorometano, en una proporción de 1:2 (w/v) para la extracción sólido-líquido de los lípidos, y se dejaron en un baño de ultrasonidos (P-SELECTA, modelo Ultrasons-H,) durante 1 h. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas (EPPENDORF, modelo 5804R) y la fase orgánica se separó con la ayuda de una solución saturada de cloruro de sodio. Además, se añadió sulfato de sodio anhidro con la punta de una espátula, para eliminar el agua residual y posteriormente se eliminó el disolvente de la fase orgánica utilizando un evaporador rotatorio (HEIDOLPH, modelo Laborota 4000 Efficient), a presión reducida y a temperatura ambiente, al objeto de evitar la oxidación de lípidos. A continuación, las muestras lipídicas fueron analizadas mediante un equipo de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H (BRUKER, modelo 400/R).

Adicionalmente, se determinó el contenido en calcio en muestras cocidas de los cuatro tipos de pescado; las muestras se acondicionaron previamente a su análisis con una adaptación de la metodología empleada por Barrera et al. (2009). Para este análisis, se pesaron 3 g de muestras previamente homogeneizada en crisoles de porcelana y se carbonizaron en una placa calefactora (modelo RH basic, marca IKA LABORTECHNIK) a 450°C. A continuación, los crisoles con las muestras carbonizadas se introdujeron en horno mufla eléctrico (modelo Select-Horn, marca JP-SELECTA) donde permanecieron 9 h a 550 °C, hasta obtener cenizas blancas que posteriormente se disolvieron en 1,5 mL de ácido nítrico y 4 mL de agua Milli-Q, para luego llevarlas a una disolución acuosa de 25 mL asegurando también una concentración de lantano de 0,1%. Finalmente, se procedió al análisis por espectroscopía de absorción atómica con llama (Thermo Scientific, modelo Ice 3000 series), utilizando una longitud de onda de 422,7 nm para la detección de calcio. Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **2.4. Simulación *in vitro* del proceso digestivo**

##### **MODELO ESTÁTICO DE DIGESTIÓN *IN VITRO*: ALTERACIONES PARA SIMULAR LA DIGESTIÓN EN PERSONAS SÉNIOR**

El método *in vitro* utilizado para estudiar la digestibilidad y bioaccesibilidad de nutrientes presentes en la carne de pescado, está basado en un protocolo consensuado internacionalmente de simulación del proceso gastrointestinal, en el cual se consideran las tres etapas de la digestión: oral, gástrica e intestinal (Minekus et al., 2014). Sobre este protocolo y de acuerdo a lo señalado por Shani-Levi et al. (2017), realizaron las modificaciones necesarias para simular las diferentes alteraciones en la fase gástrica e intestinal del sistema digestivo de personas sénior. En relación a la etapa oral, y de acuerdo a lo señalado por Peyron et al. (2018), las deficiencias masticatorias se pueden presentar en un amplio rango de intensidad, con variabilidad en el número de masticaciones, entre muchas otras variantes. Es por esto, que basado en diferentes publicaciones (Jalabert-Malbos et al., 2007; Woda et al., 2006), se decidió estandarizar la masticación para un adulto sano hasta lograr una consistencia similar a una pasta de tomate o mostaza (Minekus et al., 2014) y reducir ésta al 50% en ciclos de masticación para simular las condiciones alteradas en sénior, las cuales se realizaron con un sujeto *in vivo*.

Se utilizaron 5 tubos falcón para simular la digestión de los modelos Control, Sénior 1, Sénior 2 y Sénior 3.

##### **FASE ORAL**

Para la simulación de la fase oral, se utilizaron 5 g de pescado cocido para cada tubo, las cuales fueron masticadas *in vivo* (sujeto joven con dentición normal que varió los ciclos de masticación como aproximación a la simulación de la masticación sénior); posteriormente a la masticación, los bolos



alimenticios se traspasaron a los tubos falcón para proseguir con la digestión gastrointestinal.

## FASE GÁSTRICA

Para iniciar la etapa gástrica, a cada uno de los tubos se adicionó su correspondiente fluido gástrico simulado (FGS). Posteriormente las muestras se introdujeron en una cámara termostatada a 37°C (SELECTA-P, modelo Boxcult 3000957). Al concluir la primera hora se corroboraron los pH y se ajustaron aquellos que presentaron alguna modificación. Luego se introdujeron nuevamente las muestras a la cámara y se mantuvieron por dos horas en total. Al término de la etapa gástrica, tomaron alícuotas de 500 uL para el análisis de proteólisis.

## FASE INTESTINAL

Se incorporó al tubo falcón el FIS según corresponda cada modelo, además de ajustar el pH a 7. Nuevamente se introducen a la cámara, donde transcurrida la primera hora se hace un control de pH, para que prosigan durante 1 hora más. Terminadas estas 4 horas de fase intestinal, los tubos fueron centrifugados, lo cual permitió la toma de alícuotas de 500 µL de fase líquida (sobrenadante) para el análisis de proteólisis de y 4mL para la determinación de calcio de los otros dos tubos. Estos últimos tubos se congelaron para posterior extracción de grasa para el análisis de extensión de lipólisis.

En la tabla 1, se señalan las variables alteradas así como su grado de alteración.

**TABLA 1.** Variables alteradas y nivel de alteración por etapa digestiva para llevar a cabo la simulación *in vitro* en condiciones de población sénior.

<b>Etapas digestiva</b>	<b>Variable alterada</b>	<b>Nivel de alteración</b>
<b>Etapas oral</b>	Desestructuración	Disminución en un 50%
<b>Etapas gástrica</b>	pH	Aumento en un 50%
<b>Etapas Intestinal</b>	Concentración Pepsina	Disminución en un 25%
	Concentración pancreatina	Disminución en un 50%
	Concentración sales biliares	Disminución en un 50%
	Duración	Aumento en un 50 %

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

## FORMULACIÓN DE FLUIDOS

Para llevar a cabo la simulación fue necesaria la preparación de las disoluciones stocks simuladas, tanto en etapa gástrica (SGS) como intestinal (SIS) (tabla 2) y a partir de éstas se prepararon los fluidos simulados gástricos (FGS) e intestinales (FIS) adicionando los componentes fisiológicos propios de cada etapa (enzimas y sales biliares) (tabla 3), en ambos casos utilizando las indicaciones de Minekus et al. (2014). Las disoluciones stock se prepararon semanalmente mientras que los fluidos requirieron de preparado diario para cada digestión.

**TABLA 2.** Composición de disoluciones para Stock Gástrico Simulado (SGS) y Stock Intestinal Simulado (SIS).

Constituyente	Stock conc. M (mmol L-1)	SGS M (mmol L-1)	SIS M (mmol L-1)
KCl	0.5	6.9	6.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	0.9	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	1	25	85
NaCl	2	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>	0.5	0.15	-
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> *	0.3	0.075	0.3

\*Concentraciones de Ca<sup>+2</sup> que se deben mantener al término de la digestión.

**TABLA 3.** Composición de Fluidos Gástrico e Intestinal Simulados (FGS y FIS, respectivamente).

Fluido simulado	Composición
FGS	Relación 1:1 (SGS: pepsina 2000 U/mL (normal) o 1500 U/mL (alterado))
FIS	Relación 1:1 (SIS: pancreatina, basado en actividad de tripsina 100U/MI, con bilis 10Mm (normal) o 5 mM (alterado))

\*El pH de ambos fluidos se ajustó a 3, 6 ó 7 dependiendo de la etapa (gástrica o intestinal) y del modelo en estudio con HCl (1 N) o NaOH (1 N).

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar la influencia de las distintas alteraciones que habitualmente ocurren en la población sénior, se planteó un diseño experimental en el que cada una de las especies de pescado se sometió a 3 modelos de digestión sénior (Tabla 4) y se utilizó como control el modelo de adulto sano publicado por Minekus et al. (2014). El modelo de digestión Sénior 1 simula únicamente la alteración en fase oral, el modelo sénior 2 simula la alteración oral y gástrica y el modelo Sénior 3 simula la situación más desfavorable en la que se presentan todas las alteraciones descritas en la tabla 1, es decir, alteraciones en fase oral, gástrica e intestinal.

**TABLA 4.** Modelos utilizados en el ensayo, con sus respectivas condiciones.

<b>Modelo</b>	<b>Control</b>	<b>Sénior 1 (S1)</b>	<b>Sénior 2 (S2)</b>	<b>Sénior 3 (S3)</b>
<b>Etapa oral*</b>	20 ciclos de masticación	10 ciclos de masticación	10 ciclos de masticación	10 ciclos de masticación
<b>Etapa gástrica</b>	pH 3 pepsina 2000 U/mL 2 h	pH 3 pepsina 2000 U/mL 2 h	pH 6 pepsina 1500 U/mL 2 h	pH 6 pepsina 1500 U/mL 2 h
	pH 7	pH 7	pH 7	pH 7
<b>Etapa Intestinal</b>	Bilis(10mM) + Pancreatina (100 U/mL de trisina) 2 h	Bilis (10mM) + Pancreatina (100 U/ MI de tripsina) 2 h	Bilis (10 mM) + Pancreatina: (100 U/ MI de tripsina) 2 h	Bilis (5 mM) + Pancreatina: (50 U/ MI de tripsina) 4 h

## 2.5. Determinaciones analíticas

### DERIVATIZACIÓN Y ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES/MASAS (GC-MS)

Para la determinación de aminoácidos libres resultantes de la hidrólisis de las proteínas durante la digestión, se utilizó como referencia una adaptación del protocolo publicado por Peinado et al. (2016). Alícuotas de 500  $\mu$ L de digerido, fueron centrifugadas a 6000 rpm durante 10 minutos para separar el sobrenadante (50 a 100  $\mu$ L) el cuál se derivatizó utilizando el kit de aminoácidos EZ-Faast y se analizó mediante un GC-MS marca AGILENT TECHNOLOGIES (Inyector serie 7683B, Network GC System serie 6890N, Inert Mass Selective Detector serie 5975). Los cromatogramas obtenidos se analizaron integrando las áreas bajo la curva (software MSD ChemStation), de acuerdo a los tiempos de retención dado por los estándares del kit. Este análisis se realizó por triplicado.

Los aminoácidos analizados fueron los siguientes: Alanina (ALA), Sarcosina (SAR), Glicina (GLY), ácido  $\alpha$ -Aminobutírico (ABA), Valina (VAL), ácido  $\beta$ -Aminoisobutírico ( $\beta$ AIB), Leucina (LEU), Allo-Isoleucina (aILE), Isoleucina (ILE), Treonina (THR), Serina (SER), Prolina (PRO), Asparagina (ASN), ácido Aspartico (ASP), Metionina (MET), Hidroxiprolina (HYP), ácido Glutámico (GLU), Fenilalanina (PHE), ácido  $\alpha$ - Aminoadípico (AAA), Glutamina (GLN), Ornitina (ORN), Lisina (LYS), Histidina (HIS), Tirosina (TYR), Triptófano (TRP) y Cistina (C-C).

### EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS Y ANÁLISIS RMN

Las muestras digeridas fueron sometidas a una extracción líquido-líquido, utilizando diclorometano en una proporción de 2:3 (v/v); posteriormente, para la separación de la fase orgánica y recuperación de la grasa del digerido, se

siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para la determinación de contenido en grasas de las muestras sin digerir.

Posteriormente, el perfil lipídico de la grasa extraída de los digeridos se analizó mediante un equipo de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN  $^1\text{H}$ ). Los espectros de resonancia magnética obtenidos de las muestras representan los momentos magnéticos que presentan los núcleos atómicos (protones) luego de ser irradiados, los cuales se analizan a partir de fórmulas moleculares obteniendo las concentraciones de 1-monoglicéridos (1-MG), 1,2-diglicéridos (1,2-DG), 1,3-diglicéridos (1,3-DG), 2-monoglicéridos (2-MG), glicerol y ácidos grasos (FA). Este análisis se realizó por duplicado.

## ESTIMACIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD DEL CALCIO

Alícuotas de 4 ml de fase líquida del digerido fueron acondicionadas para la determinación de calcio por espectroscopía de absorción atómica con llama de la misma forma como se describió en la caracterización inicial del pescado cocinado. Este análisis se realizó por duplicado. La bioaccesibilidad del calcio se estimó en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \frac{(\text{mg Ca}^{2+} \text{ libre en el digerido} / 100 \text{ g alimento})}{(\text{mg Ca}^{2+} \text{ total alimento sin digerir} / 100 \text{ g alimento})} \times 100$$

Siendo el calcio libre el calcio estimado en la fase micelar del digerido y el calcio total el estimado en las muestras cocidas antes de la digestión.

### 2.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos, se evaluaron mediante un análisis de Varianza (ANOVA simple) con el programa Statgraphics Centurion con un nivel de confianza del 95% ( $p\text{-valor} \leq 0.05$ ).

## 3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Composición nutricional de las distintas especies de pescado

La Tabla 5 muestra los valores de composición obtenidos de la caracterización inicial de las cuatro especies de pescado estudiadas. En términos generales, estos alimentos superaron el 20% de proteína en su composición, e incluso el salmón se encuentran a valores cercanos al 30%. Además, los valores correspondientes a los análisis de humedad, proteína, grasa total y cenizas coinciden con los reportados en bibliografía (UDSA, 2019). No obstante, el contenido de grasa total de la sardina ( $3.6 \pm 0.2\%$ ), fue menor de lo esperado a pesar de considerarse un pescado azul. Este menor contenido lípidos se explicaría porque fueron pescados en época de invierno, ya que la compra se realizó en el mes de enero, además por ser un pescado

de vida silvestre, presenta un menor contenido grasas que aquellos que son criados en cautiverio (Kuwae et al. 2017; FEN, 2019).

**TABLA 5.** Contenidos totales (%) de humedad, proteína, grasa total y cenizas en las cuatro variedades de pescados cocinados (salmón, lubina, sardina y merluza).

Pescados	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa total (%)	Cenizas (%)
Salmón	58.15 ± 0.10	27.1 ± 0.3	14.0 ± 0.6	1.33 ± 0.07
Lubina	67.57 ± 0.06	23.8 ± 0.9	6.7 ± 0.3	1.252 ± 0.017
Sardina	69.20 ± 0.15	24.1 ± 0.4	3.6 ± 0.2	2.22 ± 0.04
Merluza	76.059 ± 0.119	22.74 ± 0.09	0.34 ± 0.05	1.70 ± 0.12

### 3.2. Influencia de las condiciones GI de población sénior y de la especie de pescado en la extensión de la proteólisis

Después de realizar las digestiones de las cuatro especies de pescado, y de acuerdo a los diferentes modelos de estudio, se obtuvieron las muestras de digeridos, sobre las cuales se realizó la derivatización de aminoácidos para su posterior análisis en el CG-MS y de esta forma fue posible determinar la extensión de la proteólisis.

Las determinaciones de aminoácidos durante la digestión permiten estimar la extensión de la proteólisis por lo que, en primer lugar, para evaluar la digestión de las proteínas en el estómago se tomaron muestras al final de la fase gástrica de las experiencias control. Los resultados obtenidos fueron: 2.7, 3, 1.75 y 1.5 g de aminoácidos/ 100 gramos de proteína en sardina, lubina, salmón y merluza, respectivamente. Estos bajos valores obtenidos en la cantidad de aminoácidos libres, se debe a que la pepsina corresponde a una endopeptidasa, la cual hidroliza enlaces peptídicos internos de las proteína y en consecuencia, libera en mayor proporción péptidos de bajo peso molecular y en menor medida aminoácidos (Sandoval et al., 2008). El método utilizado cuantifica exclusivamente aminoácidos libres, por lo que no es posible determinar la extensión proteolítica producida durante la etapa gástrica de la digestión, a diferencia de la etapa intestinal en la que la hidrolisis genera aminoácidos como productos finales.

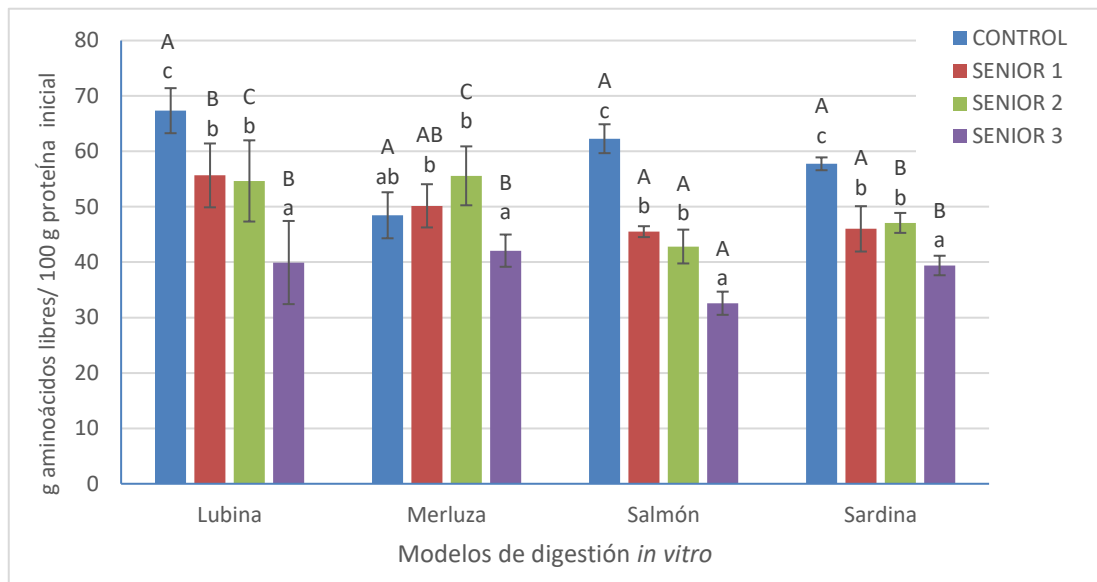
La figura 1 muestra la extensión de la proteólisis al final de la fase intestinal en las distintas especies de pescado (lubina, merluza, salmón y sardina), y para cada una de las condiciones gastrointestinales. Tal y como se puede

observar, las alteraciones gastrointestinales que pueden aparecer como consecuencia de la edad no ejercen el mismo efecto sobre las cuatro especies de pescado. Así, la prueba de múltiples rangos de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, revela que, en la lubina, salmón y sardina, la alteración de la fase oral (número de ciclos de masticación-modelo Sénior 1) así como de la fase intestinal (modelo Sénior 3) conllevó una disminución significativa de la proteólisis, con respecto a los resultados obtenidos en el modelo control. Asimismo, evidencian, a su vez, que una alteración adicional de la fase gástrica en términos de alteración del pH gástrico y disminución de la concentración de pepsina no implica una disminución adicional (comparando valores obtenidos en modelos Sénior 1 y 2).

El efecto negativo sobre la digestibilidad de proteínas en lubina, salmón y sardina ocasionada por la alteración de la fase oral se debe a la importancia de esta fase dentro de la digestión de los alimentos, ya que el objetivo principal de la masticación es reducir el tamaño de partícula del alimento ingerido y mezclar estas partículas con saliva para formar un bolo que sea seguro para tragar. De esta forma, las partículas más pequeñas maximizan la exposición de la superficie de la proteína, facilitando una mayor bioaccesibilidad de las enzimas a los sitios de escisión (Paz-Yepez et al., 2019). Por lo tanto, la alteración realizada en la fase oral simula aquellos problemas de masticación que pueden presentar individuos de edad avanzada, los cuales adaptan su alimentación o finalmente terminan tragando partículas gruesas, lo cual induce un desequilibrio en la ingesta dietética, y puede provocar una disminución de la biodisponibilidad de nutrientes y trastornos gastrointestinales. En ambas situaciones, la ingesta dietética o de nutrientes deteriorada, podría aumentar los riesgos de enfermedades consecuencia de una malnutrición y maldigestión de nutrientes (N`Gom et al., 2002). Como se ha comentado anteriormente, el déficit de masticación simulado en la fase oral no tuvo efectos significativos sobre la digestibilidad de proteínas de merluza, ya que la masticación es un proceso fisiológico que depende tanto de las características del sujeto como las características de los alimentos masticados, los cuales en su conjunto son responsables de las variaciones de la función masticatoria. En el caso de los alimentos, influye sobre esta fase digestiva la dureza, las características reológicas como la plasticidad o la elasticidad y el tamaño de éstos, por lo tanto, todos estos factores causan adaptaciones durante ciclos individuales o toda la secuencia de masticación (Woda et al., 2010).

Por otro lado, en todos los pescados, a excepción de la merluza, sí se evidenció una menor digestibilidad de proteínas cuando se alteró la fase intestinal, ya que tras la acción enzimática de la pepsina presente en la fase gástrica, el quimo pasa al intestino delgado, donde las enzimas pancreáticas encargadas de la proteólisis (tripsina, quimiotripsina y carbopeptidasa) continúan el proceso de hidrólisis proteica hacia los productos finales de la digestión, es decir de los péptidos generados en la etapa gástrica a aminoácidos libres. Es por esto, que la fase intestinal cumple un rol fundamental en la absorción de aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos, que no fueron hidrolizados en fase gástrica (Griffiths, 2014). Por lo tanto, una disminución en la concentración de pancreatina puede conducir a una mala

digestión y por lo tanto, a una malabsorción de proteínas causando deficiencias nutricionales (Sikkens et al., 2010). En lo que respecta las diferencias entre alimentos, se observa que la merluza es la especie cuya proteólisis está menos afectada por cualquiera de las alteraciones GI de población sénior al comparar los datos obtenidos bajo estas condiciones y su control. Mientras que la proteólisis de salmón y lubina se encontraría muy afectada por las alteraciones intestinales. Llama la atención que ambas especies presentan la mayor digestibilidad proteica en condiciones control y la menor en condiciones Sénior 3. Esto podría deberse a posibles interacciones entre proteínas y lípidos o interacciones entre proteínas con derivados de la oxidación de lípidos, limitando u obstaculizando la acción hidrolítica de las proteasas (Barberá, 2016; Desai et al., 2019), ya que el salmón y la lubina son las especies con mayor relación lípidos:proteína de entre los pescados analizados en este trabajo.



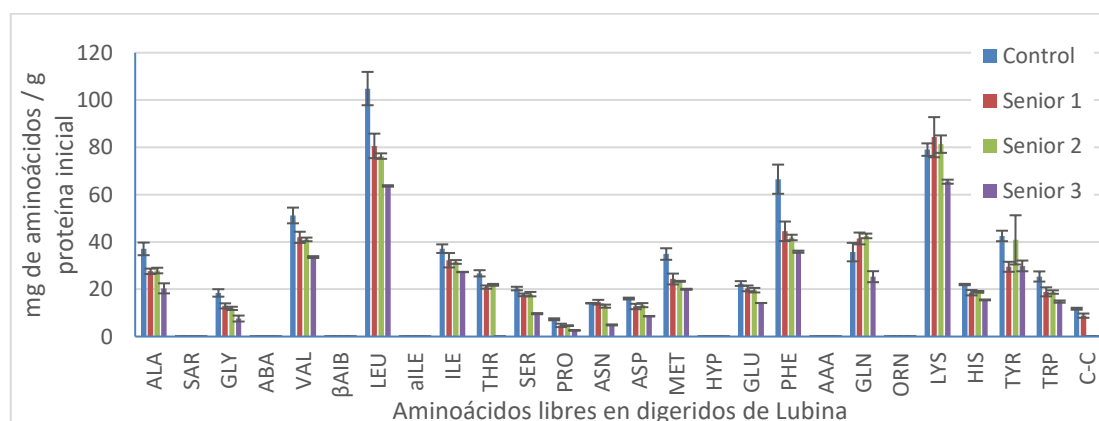
**FIGURA 1.** Extensión de la proteólisis post-digestión *in vitro* en los digeridos de pescados (lubina, merluza, salmón y sardina), de acuerdo a cada modelo aplicado (Control, Sénior 1, Sénior 2, Sénior 3).

a-c: letras diferentes indican diferencias significativas entre modelos, con un nivel de significación del 95% ( $p < 0.05$ ). A-C: letras diferentes indican diferencias significativas entre alimentos, con un nivel de significación del 95% ( $p < 0.05$ ).

Con el fin de profundizar en el estudio de la digestión de las proteínas de las distintas especies de pescado, se llevó a cabo el análisis del perfil de aminoácidos en los digeridos. Conocer la cantidad aminoácidos esenciales, es de gran importancia cuando se analiza el potencial nutricional de los alimentos, ya que son nutrientes clave para la estimulación de la síntesis de proteínas musculares. Dentro de estos aminoácidos esenciales, el que presenta un papel más relevante en la estimulación anabólica, es la leucina, ya que este aminoácido tiene la capacidad de estimular vías intracelulares específicas, asociadas con la síntesis de proteínas musculares (Katsanos et al., 2006). Por lo tanto, la importancia de una ingesta de proteínas y su

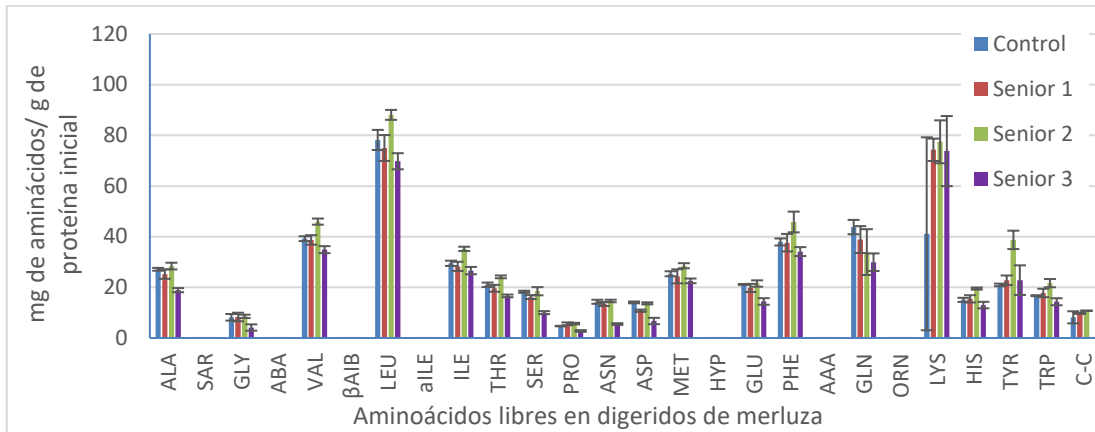
adecuada digestión y liberación de aminoácidos es obvia para las personas de todas las edades, y en particular para la población sénior, ya que la masa muscular disminuye con la edad, debido a mayores tasas de descomposición de proteínas en comparación con la síntesis, además existe una reducción en el número, tamaño y contractilidad de las fibras musculares, así como también una mayor infiltración de grasa muscular. Todo esto contribuye a un mayor deterioro del sistema musculoesquelético que eventualmente conduce a una sarcopenia, la cual corresponde a una pérdida de masa muscular en combinación con una pérdida de fuerza muscular o rendimiento físico. Esta patología, afecta hasta a una cuarta parte de los adultos mayores y se asocia directamente con menor capacidad de movilidad y a un mayor riesgo de caídas (Rémond et al., 2015). Además, se debe considerar, que las personas de edad avanzada presentan una menor repuesta que los jóvenes frente a la ingestión de aminoácidos, por lo tanto, el consumo adicional de leucina en la dieta podría ser importante para la estimulación de la síntesis de proteínas del músculo esquelético en este grupo poblacional (Katsanos et al., 2006). Por lo anterior, se resalta la importancia de que personas de edad avanzada consuman pescados con regularidad, ya que este grupo de alimentos son una fuente importante de aminoácidos esenciales, y en particular contienen niveles elevados de leucina.

En las figuras 2, 3, 4 y 5, se muestra el perfil de aminoácidos libres en cada uno de los pescados digeridos en las diferentes condiciones. Es posible afirmar que la mayor cantidad de aminoácidos libres presentes en las cuatro especies de pescado, corresponden a leucina, lisina, fenilalanina y valina, siendo todos estos aminoácidos esenciales. Este perfil de aminoácidos es coherente con lo reportado en bibliografía (FAO, 1999). En el caso de la leucina, este aminoácido disminuye en condiciones de digestión alterada, principalmente al alterar la fase intestinal (modelo Sénior 3). En el caso específico del salmón y la lubina, la reducción es de aproximadamente un 40%.

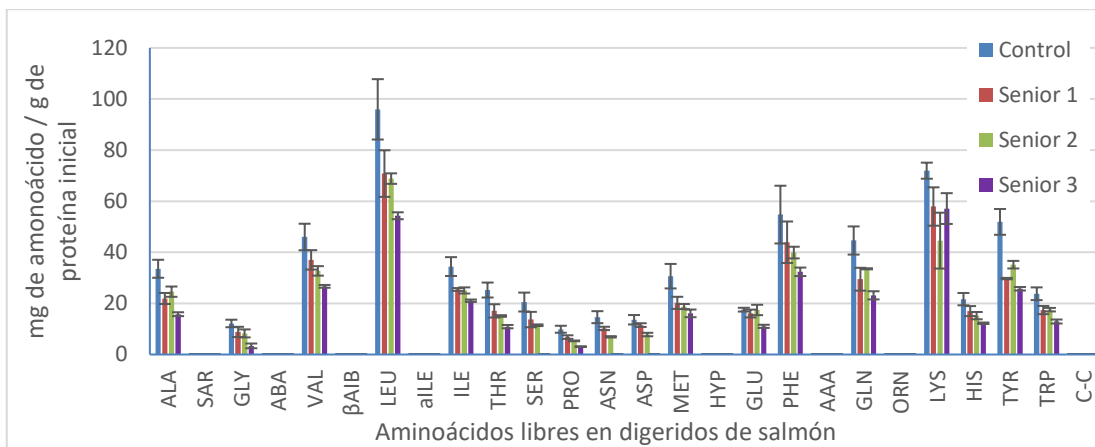


**FIGURA 2.** Media y desviación típica de la cantidad de aminoácidos libres (g de aminoácidos/g de proteína inicial) en cada uno de los modelos de digestión *in vitro* aplicados en lubina.

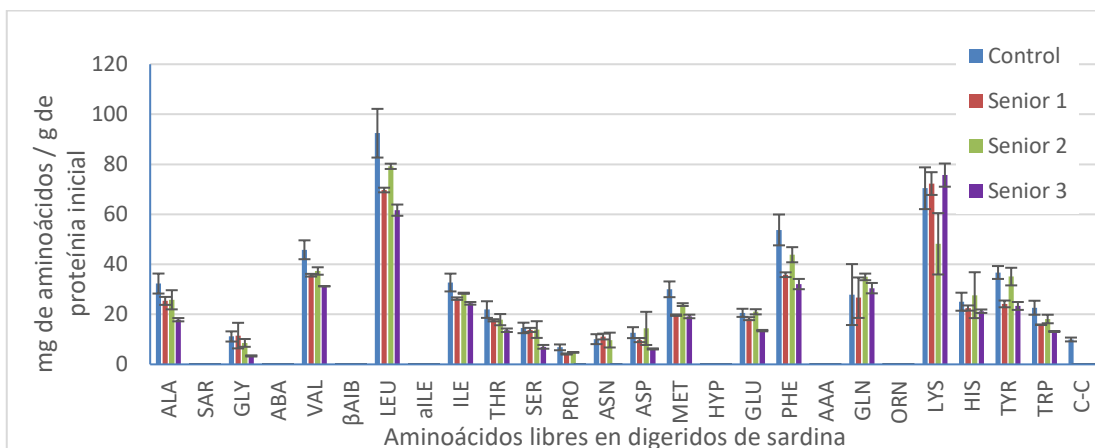




**FIGURA 3.** Media y desviación típica de la cantidad de aminoácidos libres (g de aminoácidos/ g de proteína inicial) en cada uno de los modelos de digestión *in vitro* aplicados en merluza.



**FIGURA 4.** Media y desviación típica de la cantidad de aminoácidos libres (g de aminoácidos/ g de proteína inicial) en cada uno de los modelos de digestión *in vitro* aplicados en salmón.



**FIGURA 5.** Media y desviación típica de la cantidad de aminoácidos libres (g de aminoácidos/ g de proteína inicial) en cada uno de los modelos de digestión *in vitro* aplicados en sardina.

### 3.4. Influencia de las condiciones GI en población sénior sobre la digestibilidad lipídica de salmón y lubina

El análisis de la extensión de la lipólisis después de la digestión *in vitro* simulando las distintas alteraciones GI se llevó a cabo únicamente en el salmón y la lubina, por ser las dos especies con mayor contenido en grasa. Este análisis se realizó a través de la evaluación de los datos espectrales obtenidos del equipo  $^1\text{H}$  RMN; los espectros obtenidos fueron analizados de acuerdo a Nieva-Echevarría et al. (2015) para la cuantificación de los principales productos derivados de la hidrólisis de triglicéridos (TG) durante la digestión.

Las tablas 6 y 7, ponen de manifiesto que, en el alimento inicial, prácticamente la totalidad de las grasas se presentan como TG, con un 99,3 % en el salmón y un 98,6% en la lubina. Después de la digestión, se observa que, en ambos pescados, ocurre una drástica disminución de los TG como consecuencia de la acción hidrolítica de las lipasas, con la consiguiente liberación de FA, aproximadamente un 50% a 70% del total de grasas presentes, seguido por 1,2-DG, 2-MG 1,3-DG y 1-MG, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Nieva-Echevarría et al. (2015).

Estos productos obtenidos como resultado de la lipólisis son de suma importancia desde la perspectiva de la absorción de las grasas, ya que la mayor parte de éstas, se consumen en forma de triglicéridos cuando se encuentran en los alimentos, pero finalmente son los FA y los MG las estructuras que son realmente absorbidas el epitelio intestinal, después de sufrir un proceso de micelarización gracias a la presencia de sales biliares (FAO, 1997).

En el salmón, se observa que la mayor cantidad de FA se presentan en el modelo Sénior 3 (69,8%), a pesar de ser este modelo donde se disminuyó el 50% de la pancreatina y bilis al momento de preparar el Fluido Intestinal Simulado. Esto se podría deber, a que el mayor tiempo de digestión intestinal en este modelo (4 horas), resulta ser un factor favorable para la digestión de las grasas. En cambio, en la lubina, la mayor cantidad de ácidos grasos se observan en el modelo Control (70,5%) y Sénior 1 (69,7%). Estas diferencias entre ambos pescados, en los resultados obtenidos dentro de los mismos modelos aplicados, se deberían a que la digestibilidad de los nutrientes depende, tanto de los factores intrínsecos del individuo, en este caso de las alteraciones GI, como de las características inherentes a los alimentos (la matriz alimentaria, el tipo de grasa, nutrientes, entre otros), los cuales en su conjunto condicionan la digestibilidad de las grasas (Asensio-Grau et al., 2018).

En cuanto a las alteraciones GI, tanto en el tratamiento Control como en los modelos Sénior aplicados, en ambos pescados, existió una degradación de los TG en un orden del 80%, por lo tanto, no existiría una tendencia porcentual marcada, que refleje un efecto negativo de los modelos Sénior sobre la digestión de las grasas de estos pescados. Esto concuerda con lo publicado en bibliografía, ya que estudios señalan que no existe una asociación directa de la edad con la menor degradación de las grasas en personas sénior (Vellas et al., 1988; Rémond, 2015), por lo tanto, esta menor

concentración de pancreatina y bilis, y las alteraciones en la fase oral y gástrica, pueden no ser suficientes como para causar una alteración sobre la extensión de la lipólisis.

**TABLA 6.** Extensión de la lipólisis en salmón, de acuerdo con el alimento inicial y digeridos obtenido post digestión *in vitro* en cada uno de los modelos (Control, Sénior 1, Sénior 2, Sénior 3).

Cantidad AG y FA (%)	Salmón sin digerir	Control	Sénior 1	Sénior 2	Sénior 3
AG <sub>TG</sub>	99.3 ± 0.7 d	23.9 ± 0.5 b	28.1 ± 0.8 c	23.08 ± 0.02 b	17.1 ± 0.4 a
AG <sub>1,2-DG</sub>	-	14.91 ± 0.18 b	14 ± 9 c	12.66 ± 9.02 b	9.3 ± 0.6 a
AG <sub>1,3-DG</sub>	0.43 ± 0.19 a	1.5 ± 0.2 b	1.1 ± 0.7 b	1.4 ± 0.5 b	1.2 ± 0.1 b
AG <sub>2-MG</sub>	-	3.495 ± 0.004 b	3.7 ± 2.6 c	3.7 ± 2.6 c	1.8 ± 0.1 a
AG <sub>1-MG</sub>	-	1.12 ± 0.14 b	1.3 ± 0.9 c	1.60 ± 1.13 d	0.73 ± 0.02 a
FA	0.2 ± 0.9 a	55.1 ± 0.4 c	51.09 ± 0.12 b	57.5 ± 40.8 d	69.79 ± 1.16 e

\*AG: grupos acilos. a-d: letras diferentes indican diferencias significativas entre modelos, con un nivel de significación del 95% ( $p < 0.05$ ).

**TABLA 7.** Extensión de la lipólisis en lubina, de acuerdo con el alimento inicial y digeridos obtenido post digestión *in vitro* de cada uno de los modelos (Control, Sénior 1, Sénior 2, Sénior 3)

Cantidad AG y FA (%)	Lubina sin digerir	Control	Sénior 1	Sénior 2	Sénior 3
AG <sub>TG</sub>	98.7 ± 0.9 d	15.4 ± 0.9 a	14.8 ± 0.2 a	24.18 ± 1.18 c	18.3 ± 0.6 b
AG <sub>1,2-DG</sub>	-	9.3 ± 1.3 a	10.6 ± 0.2 ab	11.8 ± 0.3 b	9.6 ± 0.2 a
AG <sub>1,3-DG</sub>	0.08 ± 0.40 a	0.95 ± 0.09 b	1.02 ± 0.05 b	1.1 ± 0.3 bc	1.61 ± 0.06 c
AG <sub>2-MG</sub>	-	3.2 ± 0.4 b	3.24 ± 0.14 b	3.6 ± 0.2 b	2.1 ± 0.2 a
AG <sub>1-MG</sub>	-	0.5 ± 0.3 a	8 ± 10 a	0.55 ± 0.03 a	0.8 ± 0.6 a
FA	1.24 ± 0.5 a	70.6 ± 0.5 d	69.7 ± 0.3 cd	59 ± 2 b	67.6 ± 0.4 c

AG: grupos acilos. FA: ácidos grasos a-e: letras diferentes indican diferencias significativas entre modelos, con un nivel de significación del 95% ( $p < 0.05$ ).

### 3.4. Influencia de las condiciones GI en población sénior y de la especie en la bioaccesibilidad del mineral calcio

Para realizar este análisis, en primer lugar, se determinó el contenido de calcio inicial para los cuatro tipos pescados, cuyos resultados concuerdan con los reportados en bibliografía (Izquierdo et al., 2001; López, 2008; UDSA, 2019). Luego se determinó el contenido de calcio en los digeridos de los diferentes modelos, para finalmente calcular el valor de bioaccesibilidad (Tabla 8).

**TABLA 8.** Contenido de calcio en el alimento inicial y bioaccesibilidad de calcio post-digestión *in vitro* en pescados (lubina, merluza, salmón y sardina), de acuerdo a los diferentes modelos digestivos.

	BIOACCESIBILIDAD DE CALCIO (%)			
	Lubina	Merluza	Salmón	Sardina
Control	94.27 ± 13.19 aB	39.9 ± 3.6 aA	85.5 ± 7.9 bB	20.3 ± 0.8 bA
Sénior 1	80.8 ± 2.9 aC	42.5 ± 9.3 aB	73.4 ± 6.9 abC	20.05 ± 1.12 bA
Sénior 2	99.4 ± 3.7 aD	33.71 ± 0.11 aB	68.3 ± 6.9 aC	8.2 ± 1.2 aA
Sénior 3	66.0 ± 2.8 aC	29.8 ± 1.6 aA	60.4 ± 3.6 aB	8.2 ± 1.3 aA
Alimento inicial mg Ca <sup>2+</sup> total / 100 g alimento	20.7 ± 0.8	50 ± 11	25 ± 4	315 ± 36

a-c: letras diferentes indican diferencias significativas entre modelos, con un nivel de significación del 95% ( $p < 0.05$ ).

A-C: letras diferentes indican diferencias significativas entre alimentos, con un nivel de significación del 95% ( $p < 0.05$ ). \* Bioaccesibilidad= (mg calcio liberado durante la digestión /mg de calcio en alimento inicial) \*100.

En relación con las variedades de pescados, se observa que la sardina es el que presenta el mayor contenido calcio inicial ( $315 \pm 36$  mg Ca<sup>2+</sup> total / 100 g alimento) a pesar de presentar la menor bioaccesibilidad (Control: 20%; Sénior 1: 20%; Sénior 2; 8%: Sénior 3: 8%). De forma inversa, la lubina presenta el menor contenido de este mineral, pero la máxima bioaccesibilidad del mismo. Los resultados obtenidos en el alimento inicial y bioaccesibilidad, concuerdan con lo publicado por Titchenal y Dobbs (2007), los cuales analizaron estos parámetros en sardina enlatada en aceite. Esta baja bioaccesibilidad se debería, a que gran parte de este mineral se encuentra en las espinas del pescado, las cuales son ingeridas al momento de consumir este tipo de alimento, pero no logran ser digeridas en su totalidad. Los resultados obtenidos muestran, asimismo, que el calcio del salmón es menos bioaccesible (60%) cuando se alteran todas las condiciones GI (Sénior 3). En el caso del calcio de la sardina, su bioaccesibilidad es menor cuando se alteran las fases oral y gástrica en el modelo Sénior 2 (8%); sin embargo, en los otros alimentos no se evidenciaron diferencias significativas en la bioaccesibilidad del calcio ( $p < 0.05$ ), lo cual se atribuye a las diferencias existentes entre las distintas matrices alimentarias.

Conocer los valores de bioaccesibilidad de este mineral en diferentes matrices alimentarias, tiene gran relevancia al momento de estudiar alimentos que serán dirigidos a este grupo poblacional sénior, ya que se debe considerar que la densidad ósea disminuye con la edad, lo cual puede conducir a la osteopenia y, en casos extremos, a la osteoporosis, lo cual se relaciona en parte con el consumo de calcio en la dieta. Esto último es un problema de

salud significativo que contribuye a la discapacidad y la mortalidad prematura entre mujeres y hombres mayores. Aunque los factores genéticos influyen en la masa ósea máxima, la dieta es claramente uno de los factores de riesgo modificables para la osteoporosis (Rémond et al., 2015).

Por lo tanto, se aconseja a los ancianos que fortalezcan su salud esquelética siguiendo una dieta rica en nutrientes con cantidades adecuadas de proteínas, vitaminas y minerales. Es por esto, que se podría recomendar a este grupo poblacional el consumo de sardinas, ya que este pescado se caracteriza por su alto contenido en calcio de fácil asimilación, debido al aporte en paralelo de vitamina D que ofrece este alimento, lo cual favorecería la absorción intestinal de este mineral (FEN, 2019).

## **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en la digestión de proteínas, se observa que el efecto de las alteraciones de la fase oral y GI difieren según el alimento digerido, quedando en evidencia la importancia del tipo de matriz alimentaria. Además, se observa una disminución de la cantidad de leucina libre en todos los tipos de pescados, cuando se presenta una alteración digestiva total (Sénior 3), lo cual impide que la totalidad de este aminoácido presente en estos tipos de pescados quede disponible para este grupo poblacional sénior.

Respecto a la digestibilidad de las grasas se observa cómo para todos los modelos estudiados la liberación de FA es entre 50 y 70% del total de grasas presentes. Viéndose como en el caso de la lubina la alteración gastrointestinal refleja un efecto negativo en la extensión de lipólisis. Por el contrario, en el salmón, se observa que, a pesar de tener menor concentración de enzimas y bilis, el mayor tiempo de digestión intestinal sería un factor favorable para la digestión de las grasas.

Por el contrario, analizando la bioaccesibilidad del calcio se observa una tendencia a su disminución conforme se van alterando las condiciones de la digestión para todos los pescados, viéndose una menor bioaccesibilidad en el salmón y la sardina. En este último, cuando se alteran las condiciones de pH y enzimas en la fase gástrica, disminuye significativamente la bioaccesibilidad calcio.

Por todo lo anterior es importante resaltar que la digestibilidad de macro y micronutrientes son dependientes de los factores intrínsecos del individuo y de las características inherentes a los alimentos. Sin embargo, este estudio proporciona información para seleccionar entre algunos tipos de pescados según el interés nutricional.

## 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.

## REFERENCIAS

- Agarwal, E.; Miller, M.; Yaxley, A.; Isenring, E. 2013. Malnutrition in the elderly: A narrative review. *The European Menopause Journal*, 76(2013) 296–302.
- AOAC, 2000. Official Methods of Análisis. Association of Official Analytical Chemists. 15th edition.
- 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, 579-586.
- Barberá, A. 2016. Influencia de la matriz y tipo de grasa en la digestibilidad de lípidos y proteínas de algunos productos de la pesca. Tesis de Grado. Universidad Politécnica de Valencia.
- 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 v B; Network GC System seria ariables on process kinetics and compositional changes. *Journal of food engineering*, 92(4), 416-424.
- Desai, A.; Brennan, M.; Guo, X.; Zeng, X.; Brennan, C. (2019). Fish protein and lipid interactions on the digestibility and bioavailability of starch and protein from durum wheat pasta. *Molecules*, 24(5), 839.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Grasas y aceites en la nutrición humana. Consulta FAO/OMS de expertos, [en línea]. 1997. Dirección URL: < <http://www.fao.org/3/v4700s/v4700s07.htm>>. [Consulta: 30 de jul. 2019]
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad, [en línea]. 1999. Dirección URL: < <http://www.fao.org/3/V7180S/v7180s05.htm#4.3> proteínas>. [Consulta: 29 de jul. 2019]
- FEN. Fundación Española de la Nutrición. Sardina, [en línea]. 2019. Dirección URL: < <http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/sardina.pdf/>>. [Consulta: 26 de jul. 2019]
- Gariballa, S.; Sinclair, A. 1998. Nutrition, ageing and ill health. *British Journal of Nutrition*, 80(1998) 7–2.
- Griffiths, M. 2014. Lo esencial en aparato digestivo. Elsevier. 4ª edición.
- Hearn, L.; Sgoutas, S.; Sgoutas, D.; Hearn, J. 1987. Stability of polyunsaturated fatty acids after microwave cooking of fish. *Journal of food science*, 52(5), 1430-1431.
- Izquierdo, P.; Torres, G.; Aliara, M.; Márquez, E.; Barboza, Y.; Sánchez, E. 2001. Análisis proximal, contenido de aminoácidos esenciales y relación calcio/fosforo en algunas especies de pescado. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 11(2), 95-101.
- Jalabert-Malbos, 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.
- Katsanos, C.; Kobayashi, H.; Sheffield-Moore, M.; Aarsland, A.; Wolfe, R. 2006. A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 291(2), E381-E387.
- Kuwae, M.; Yamamoto, M.; Sagawa, T.; Ikehara, K.; Irino, T.; Takemura.; Takeoka H.; Sugimoto, T. 2017. Multidecadal, centennial, and millennial variability in sardine and anchovy abundances in the western North Pacific and climate–fish linkages during the late Holocene. *Progress in oceanography*, 159, 86-98.

- Lindenbaum, J.; Rosenberg, I.; Wilson, P.; Stabler, S.; Allen, R. 1994. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *The American journal of clinical nutrition*, 60(2–11).
- López, A. 2008. Desarrollo de productos ahumados a partir de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- MERCASA. Consumo de pescados y mariscos en España, [en línea]. 2017. Dirección URL: <[https://www.mercasa.es/media/publicaciones/236/1509981781\\_Consumo\\_de\\_pescados\\_y\\_mariscos.pdf](https://www.mercasa.es/media/publicaciones/236/1509981781_Consumo_de_pescados_y_mariscos.pdf)>. [Consulta: 29 de jul. 2019].
- Minekus, M.; Alminger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou R.; Corredig, M.; Dupont, D.; Dufour, C.; Egger, L.; Golding, M.; Karakaya, S.; Kirkhus, B.; Le Feunteun, S.; Lesmes, U.; Macierzanka, A.; Mackie, A.; Marze, S.; McClements, D.; Ménard, O.; Recio, I.; Santos, C.; Singh, R.; Vegarud, G.; Wickham, M.; Weitschies, W.; Brodkorb, A. 2014. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food an international consensus. *Food & function*, 5(6):1113-1124.
- N'Gom, P.; 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 <sup>1</sup>H NMR in assessing the extent of lipid digestion. *Food chemistry*, 179, 182-190. OMS. Organización Mundial de la Salud. Health statistics and information systems: Proposed working definition of an older person in Africa for the MDS Project, [en línea]. 2002. Dirección URL: <<https://www.who.int/healthinfo/survey/ageingdefnolder/en/>>. [Consulta: 09 de jul. 2019].
- OMS. Organización Mundial de la Salud. Health statistics and information systems: Proposed working definition of an older person in Africa for the MDS Project, [en línea]. 2002. Dirección URL: <<https://www.who.int/healthinfo/survey/ageingdefnolder/en/>>. [Consulta: 09 de jul. 2019].
- ONU. Organización de las Naciones Unidas. World Population Ageins, [en línea]. 2015. <[https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015\\_Report.pdf](https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015_Report.pdf)>. [Consulta: 09 de jul. 2019].
- 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.
- 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.
- Peyron, M.; 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.
- Rahme M.; Sharara, S.; Baddoura, R.; Habib, R.; Halaby, G.; Arabi, A.; Singh, R.; Kassem, M.; Mahfoud, Z.; Hoteit, M.; Daher, R.; Darina B.; El Ferkh, K.; El-Hajj Fuleihan, G. 2017. Impact of Calcium and Two Doses of Vitamin D on Bone Metabolism in the Elderly: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Bone Mineral Research*, 32(7):1486–149.
- Rashid, I.; Tiwari, P.; Singh Lehl, S. Malnutrition among elderly a multifactorial condition to flourish: Evidence from a cross-sectional study [en línea]. *Clinical Epidemiology and Global Health*. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213398419301423>>. [Consulta: 15 de jul. 2019].
- Rémond, D.; Shahr, D.; Gille, D.; Pinto, P.; Kachal, J.; Peyron, M.; Tomas-Cobos, L. 2015. Understanding the gastrointestinal tract of the elderly to develop dietary solutions that prevent malnutrition. *Oncotarget*, 6(16), 13858.
- Sales, M.; Praça de Oliveira, L.; Louise de Araújo, N; Soares de Sousa, S; Almeida, M.; Moura, T.; de Oliveira, C.; Costa, K.; Mauricio K.; Campos, L. 2018. Plasma zinc in institutionalized elderly individuals: Relation with immune and cardiometabolic biomarkers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50(615-621).
- Sanvodal, M.; Ayala, S.; Oré, R.; Loli, R.; Huamán, O. 2008. Estimulación de la actividad péptica del jugo gástrico, inducida por látex de *Croton palanostigma* (sangre de grado). In *Anales de la Facultad de Medicina*. Vol. 69(3): 163-166.
- 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.; Mariniello, L.; Martins, C.; Ménard, O.; Lesmes, U. 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).
- Shani Levi, C.; Goldsteina N.; Portmannb, R., Lesmesa, U. 2017. Emulsion and protein degradation in the elderly: Qualitative insights from a study coupling a dynamic *in vitro* digestion model with proteomic analyses. *Food Hydrocolloids*, 69(393-401).
- Sikkens, E.; Cahen, D.; Kuipers, E.; Bruno, M. 2010. Pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 24(3), 337-347.
- Sociedad Española de Geriátría y Gerontología (SEGG). Alimentación y nutrición saludable en los mayores: Mitos y realidades, [en línea]. < file:///C:/Users/XICAR/Downloads/GU%C3%8DA%20ALIMENTACI%C3%93N%20Y%20NUTRICI%C3%93N%20SALUDABLE.PDF >. [Consulta: 09 de jul. 2019].
- Sun, Y.; Ma, A.; Li, Y.; Han, X.; Wang, Q.; Liang, H. 2012. Vitamin E supplementation protects erythrocyte membranes from oxidative stress in healthy Chinese middle-aged and elderly people. *Nutrition Research*, 32: 5(328-334).
- Titchenal, C.; Dobbs, J. 2007. A system to assess the quality of food sources of calcium. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(8), 717-724.
- USDA. U.S. Department of Agriculture. USDA Food Composition Databases, [en línea]. 2019. < <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list> >. [Consulta: 29 de jul. 2019].
- Valenzuela, A.; Sanhueza, J.; Nieto, S. 2002. El uso de lípidos estructurados en la nutrición: una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de productos innovadores. *Revista chilena de nutrición*, 29(2), 106-115.
- Vellas, B.; Balas, D.; Moreau, J.; Bouisson, M.; Senegas-Balas, F.; Guidet, M.; Ribet, A. 1988. Exocrine pancreatic secretion in the elderly. *International journal of pancreatology*, 3(6), 497-502.
- Woda, A.; Foster, K.; Mishellany, A.; Peyron, M. 2006. Adaptation of healthy mastication to factors pertaining to the individual or to the food. *Physiology & Behavior*, 89(1), 28-35.
- Woda, A.; Nicolas, E.; Mishellany-Dutour, A.; Hennequin, M.; Mazille, M.; Veyrone, J.; Peyron, M. 2010. The masticatory normative indicator. *Journal of dental research*, 89(3), 281-285.