



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

IMPACTO DEL PROCESADO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE SEMILLAS DE CHÍA (*Salvia hispanica*) Y SUS DERIVADOS

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

ALUMNO/A: Karla Katherine Villalobos Pineda

TUTOR/A ACADÉMICO: Ana María Andrés Grau

COTUTOR/A: Ana Belén Heredia Gutiérrez

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Carolina Paz Yépez

Curso Académico: 2019/2020

VALENCIA, Febrero 2020

Impacto del procesado sobre la digestibilidad de semillas de chía (*Salvia hispanica*) y sus derivados

Villalobos, K.¹, Paz-Yépez, C.¹, Andrés, A.¹ y Heredia, A.¹

RESUMEN

Las semillas de chía se presentan como potencial ingrediente novedoso y funcional debido a sus excelentes propiedades nutricionales y bioactivas, incluyendo grasas poliinsaturadas, proteínas, fibra, calcio y compuestos bioactivos como los polifenoles y su capacidad antioxidante. Sin embargo, su estructura matricial puede limitar la digestibilidad de los nutrientes, y por tanto los beneficios derivados de su ingesta. Por ello, en el presente estudio se analizó la digestibilidad de diferentes productos de chía (semillas, harina de semilla entera, harina parcialmente desgrasada (comercial) y germinados) en términos de proteólisis, lipólisis, liberación de calcio, polifenoles y actividad antioxidante de la fracción bioaccesible. Los estudios de digestión *in vitro* se realizaron en condiciones intestinales de adulto sano estándar (pH duodenal 7, concentración biliar 10 mM) y subóptimas (pH duodenal 6, concentración biliar 1 mM) para analizar también el impacto de estas sobre los mismos parámetros. Los resultados evidencian que condiciones intestinales alteradas redujeron significativamente la lipólisis, pero no la proteólisis. Con respecto a la matriz alimentaria, en comparación con las semillas de chía, la molienda en harina de grano entero y parcialmente desgrasada aumentó la hidrólisis tanto de lípidos como de proteínas, lo que se asocia con el tamaño reducido de las partículas. La germinación de las semillas favoreció la degradación proteolítica gástrica pero no así la lipolítica. La bioaccesibilidad de calcio se vio afectada negativamente tras la digestión intestinal en todas las muestras, especialmente en semillas germinadas. El proceso de digestión condujo a una mayor bioaccesibilidad de los polifenoles en todas las estructuras estudiadas, pero redujo la actividad antioxidante, en condiciones alteradas. En conclusión, el proceso de molienda de las semillas de chía mejora la absorción potencial de macro y micronutrientes, mientras que el consumo de germinados sería aconsejable para mejorar la digestibilidad de las proteínas junto con una disminución de la lipólisis.

Palabras clave: semillas de chía, germinación, molienda, lipólisis, proteólisis, actividad antioxidante, harina de chía.

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

RESUM

Les llavors de xia es presenten com un potencial ingredient funcional per les seues propietats nutricionals, com ara greixos poliinsaturats, proteïnes, fibra, calci i compostos bioactius com polifenols i la seua capacitat antioxidant. Malgrat tot això, la estructura matricial que presenten pot limitar la digestibilitat dels seus nutrients i per tant reduir els beneficis derivats de la seua ingesta. Per això, en el present estudi es va analitzar la digestibilitat de diferents productes de xia (llavors, farina sencera de llavors de xia, farina parcialment desengreixada i germinats) en termes de lipòlisi, proteòlisi, alliberament de calci i polifenols i activitat antioxidant de la fracció bioaccessible. Els estudis de digestió *in vitro* es van portar a terme en condicions intestinals de l'adult estàndard (pH duodenal 7, concentració biliar 10 mM) i subòptimes (pH duodenal 6, concentració biliar 1 mM) per analitzar també l'impacte d'aquestes sobre els paràmetres citats. Els resultats van evidenciar que les condicions intestinals alterades van reduir significativament la lipòlisi, però no la proteòlisi. Pel que fa a la matriu alimentària, en comparació amb les llavors, moldre-les com a farina sencera o parcialment desengreixada va fer augmentar la hidròlisi, tant de lípids com de proteïnes, associat al tamany de partícula reduït de les mostres. La germinació va afavorir la degradació proteolítica gástrica però no pas la lipolítica. La bioaccessibilitat del calci es va veure afectada negativament en totes les mostres després de la digestió intestinal, especialment en els germinats. El procés de digestió va afavorir la bioaccessibilitat dels polifenols, però va reduir l'activitat antioxidant en condicions alterades. En conclusió, el procés de mòlta de les llavors de xia milloren l'absorció de macro i micronutrients, mentre que el consum de germinats seria aconsellable per millorar la digestibilitat de les proteïnes, junt a una disminució de la lipòlisi.

Paraules clau: llavors de chia, germinació, molenda, lipòlisi, proteòlisi, activitat antioxidant, farina de chia

ABSTRACT

Chia seeds are presented as a potential novel and functional ingredient due to their excellent nutritional and bioactive properties, including polyunsaturated fats, proteins, fiber, calcium and bioactive compounds such as, polyphenols and their antioxidant capacity. However, its matrix structure can limit the digestibility of nutrients, and therefore the benefits derived from its intake. Therefore, in the present study the digestibility of different chia products (seeds, whole seed flour, partially defatted flour (commercial) and sprouts) was analyzed in terms of proteolysis, lipolysis, calcium release, polyphenols and antioxidant activity of bioaccessible fraction. *In vitro* digestion studies were performed in standard healthy adult intestinal conditions (duodenal pH 7, 10 mM bile concentration) and suboptimal (6 duodenal pH, 1 mM bile concentration) to also analyze the impact of these on the same parameters. The results showed that altered intestinal conditions significantly reduced lipolysis, but not proteolysis. With respect to the

food matrix, compared to chia seeds, milling in whole grain and partially defatted flour increased the hydrolysis of both lipids and proteins, which is associated with the reduced particle size. Seed germination favored gastric proteolytic degradation but not lipolytic degradation. The bioaccessibility of calcium was negatively affected after intestinal digestion in all samples, especially in germinated seeds. The digestion process led to greater bioaccessibility of polyphenols in all the structures studied, but reduced antioxidant activity, under altered conditions. In conclusion, chia seeds milling process improves the potential absorption of macro and micronutrients, while the consumption of sprouts would be advisable to improve the digestibility of proteins along with a decrease in lipolysis.

Key words: chia seeds, sprouting, milling, lipolysis, proteolysis, antioxidant activity, chia flour

1. INTRODUCCIÓN

La semilla de chía (*Salvia hispanica* L.) posee una cantidad significativa de lípidos (alrededor del 40% de peso total de la semilla), casi 60% como ácido linolénico (omega 3), por lo que se considera un ingrediente novedoso y funcional (Zettel et al., 2018). Además, también contiene fibra dietética (más del 30% del peso total), proteínas de alto valor biológico (alrededor del 19% del peso total), antioxidantes naturales como el glucósido fenólico-Q y K, ácido clorogénico, ácido caféico, quercetina y kaempferol, calcio y vitaminas B. Por lo tanto, la chía ha ganado un interés creciente entre los ingredientes alimentarios funcionales "novedosos" y "saludables" debido a sus propiedades nutricionales únicas (Ullah et al., 2016). En este sentido, la Decisión de la Comisión Europea de enero de 2013 (CE, 2013) amplió el uso de la chía como ingrediente alimentario novedoso en productos horneados, cereales para el desayuno y mezclas de frutas, frutos secos y semillas. Es importante señalar, sin embargo, que las semillas de chía se han utilizado tradicionalmente en América del Sur como semillas enteras, harina de semillas, mucílago de semillas y aceite de semilla. Como resultado de esta decisión de la CE, publicaciones más recientes investigan la incorporación de chía en diferentes productos alimenticios como panes, pasta o reestructuradas similares a jamones (Hall et al., 2006) para mejorar sus propiedades saludables. Sin embargo, la investigación de procesamiento ha hecho hincapié en que el procesamiento de alimentos, antes del consumo, puede tener un efecto notable en la biodisponibilidad de nutrientes. Estos tratamientos pueden implicar el procesamiento térmico (incluyendo tostado, secado, fritura, horneado o ebullición), molienda o golpes caseros, remojo, malteado y fermentación microbiana. Del mismo modo, las semillas de chía pueden ser sometidas a diferentes procesamientos antes del consumo directo o para ser incorporadas en formulaciones de alimentos. La molienda resulta en una disminución del tamaño de partícula de las estructuras nativas de alimentos sólidos y promueve una mejor

digestión, ya que facilita la permeabilidad de los alimentos por fluidos de digestión, y por lo tanto la difusión de enzimas digestivas. En cuanto al remojo o germinación, reducen la cantidad de antinutrientes tales como el fitato, aumentando así la biodisponibilidad de zinc, hierro y calcio, la solubilidad de polifenoles y la digestión de carbohidratos (Martínez-Villaluenga et al., 2010; Muñoz et al., 2012; Pajak et al., 2019).

La insuficiencia pancreática exocrina (IPE) se define como una destrucción del parénquima pancreático, con pérdida de células acinares y/u obstrucción de los conductos pancreáticos tan importantes, que la producción de enzimas digestivas y secreción ductal de bicarbonato no puede mantener unos niveles óptimos para digerir adecuadamente los alimentos de la dieta (Afghani et al., 2014; Lindkvist, 2012). Dentro de las causas de IPE, la pancreatitis crónica es la principal causa seguida en frecuencia por la fibrosis quística y la cirugía pancreática (Domínguez-Muñoz et al., 2007). La importancia de la IPE radica en las consecuencias del retraso en el diagnóstico y la no instauración de tratamiento enzimático sustitutivo en caso de confirmación de la enfermedad. De esta manera, la maldigestión conlleva un estado de malnutrición que empeora el estado de salud y calidad de vida de los pacientes con IPE (De la Iglesia-García, 2017). Sus principales síntomas se manifiestan con dolor abdominal, la esteatorrea, la desnutrición y la pérdida de peso. La deficiencia de micronutrientes y de vitaminas liposolubles se asocia con morbilidad grave. Se estima que los índices de mortalidad en los enfermos con IPE son 4 a 5 veces más altos, respecto de la población general, similar en edad y sexo. La principal consecuencia de la IPE es la maldigestión de los lípidos por ser mayoritariamente digeridos en esta sección del intestino (duodeno), debido a la acción de las lipasas. Los pacientes suelen presentar además un déficit de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y ácidos grasos esenciales (Sikkens et al., 2010; Turcket et al., 2016). De ahí que las recomendaciones dietéticas dirigidas a estos pacientes, incluyan una ingesta superior en grasas, y principalmente mono y polinsaturadas, que las dietas estándares para individuos sanos. En este sentido, el consumo de semillas de chía y sus derivados permitirían aumentar la ingesta de grasa por parte de estos pacientes.

Para evidenciar, el impacto de las propiedades inherentes al alimento (estructural matricial, interacciones entre ingredientes,..) y/o propias al individuos (condiciones intestinales alteradas, por ejemplo), los modelos de digestión *in vitro* se presentan como una metodología validada y aceptada por la comunidad científica del área de la ciencia y tecnología de alimentos. Así, los modelos de digestión *in vitro* presentan una buena reproducibilidad intra e interlaboratorio, robustez, simplicidad, fácil muestreo, coste relativamente bajo y exención de restricciones éticas. Este último aspecto los hace bastante adecuados, en comparación con los modelos *in vivo*, para estudios mecanicistas, construcción de hipótesis y cribado. La definición clara de condiciones y procedimientos

experimentales estandarizados es una de las principales ventajas del método INFOGEST (Brodkorb et al., 2019).

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue la caracterización de la digestibilidad de lípidos y proteínas, junto con la evaluación de compuestos fenólicos y bioaccesibilidad de calcio en diferentes productos de semillas de chía mediante una metodología de digestión *in vitro*. En segundo lugar, también se evaluó la evaluación del efecto de las condiciones intestinales alteradas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

Para la preparación de los stocks y fluidos digestivos simulados se utilizaron los siguientes reactivos: CaCl_2 , KCl , KH_2PO_4 , NaCl , NaHCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ y $\text{MgCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_6$, obtenidos de Sigma-Aldrich. Para llevar a cabo la digestión gastrointestinal *in vitro* requirieron de pepsina porcina (P6887, Sigma-Aldrich), bilis bovina (B3883, Sigma-Aldrich) y pancreatina porcina comercial (Kreon® Abbott) disponible en cápsulas. Cada cápsula contiene 150 mg de pancreatina porcina en forma de microesferas gastrorresistentes equivalentes a: 10000 unidades lipasa (UL), 8000 unidades amilasa (UA) y 600 unidades proteasa (UP). Además se usaron NaOH y HCl 1 N para los ajustes de pH.

En cuanto a las determinaciones analíticas se emplearon los siguientes reactivos: Triton X-100, éter de petróleo, ácido tricloroacético (TCA), ácido palmítico, kits enzimáticos para el análisis de AG libres (*Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA*), albúmina sérica bovina (BSA) adquiridos de Sigma-Aldrich, urea cristalina para análisis (AppliChem Panreac), etanol al 96 % (Labkem), metanol (*Sigma-Aldrich*), reactivo Folin Ciocalteu (*Sigma-Aldrich*), Na_2CO_3 (*Sigma-Aldrich*), ácido gálico (*Sigma-Aldrich*), reactivo DPPH (*Sigma-Aldrich*), Trolox equivalente (*Sigma-Aldrich*), ácido nítrico (*Sigma-Aldrich*) y agua MiliQ.

2.2. Productos de chía

Se utilizaron 4 matrices de semilla de chía: semilla de chía, germinados de chía, harina de semillas enteras y harina de semilla de chía parcialmente desgrasada (comercial). Las semillas de chía y harina de chía desgrasada se adquirieron en comercios locales de Valencia, España.

La justificación de esta selección es la siguiente: a) el interés de evaluar el efecto de germinación en la composición y digestibilidad de nutrientes; b) analizar la influencia del tamaño de partícula comparando el comportamiento frente a la digestión *in vitro* entre semillas enteras y harina y c) evaluar el impacto de la

harina de chía parcialmente desgrasada en la digestibilidad y bioaccesibilidad de los nutrientes.

2.2.1 PROCESO DE MOLIENDA PARA HARINA DE CHÍA

Para la preparación de harina de chía, se trituraron 20 g de semilla en un molinillo eléctrico (Taurus Aromatic SP-7407 50Hz, disco de molienda de Ø 80 mm, a 1480 rpm) aplicando 200 pulsaciones, hasta que el tamaño de partícula osciló entre 125 y 500 µm. Posteriormente, se pasaron por varios tamices metálicos para determinar los diferentes tamaños obtenidos según masticación previamente simulada.

La harina de chía parcialmente desgrasada se compró como tal; es conocido el que este producto se obtiene como un subproducto en la producción industrial de aceite de chía. Después del prensado mecánico de las semillas de chía y la extracción del aceite extraído, las partes restantes se enjuagan con agua y se secan, este producto resultante conforma la harina comercial de chía parcialmente desgrasada (Ixtaina et al., 2011).

2.2.2. GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE CHÍA

Para la obtención de germinados de chía se empleó el germinador eléctrico Easygreen EGL55, el cual incluye un nebulizador temporizado (generador de niebla) que permite rociar y oxigenar en períodos de tiempos ajustable a las condiciones deseadas para la germinación de las semillas. El proceso de germinación se llevó a cabo de acuerdo con el método publicado por Pająk et al. (2019) con algunas modificaciones. Las semillas de chía se extendieron en bandejas estériles y se rociaron con agua desionizada a través del sistema de niebla del equipo germinador únicamente dos veces al día.

El proceso de germinación de las semillas se llevó a cabo a una temperatura de 22 ± 2 °C 12/12 h día / noche. Las semillas germinadas se cosecharon después de 10 días de crecimiento y se sometieron al proceso de digestión *in vitro* previamente desestructurando los germinados simulando una masticación con la ayuda de un picador (con cuchillas) realizando 3 pulsaciones cada una de un 1 segundo.

2.3. Modelo estático de Digestión *in vitro*

Se procedió a la digestión *in vitro* de las diferentes matrices siguiendo el protocolo consensuado a nivel europeo por la ACTIONCOST INFOGEST, aceptado internacionalmente, de simulación del proceso gastrointestinal, en tres etapas: oral, gástrica e intestinal (Minekus et al., 2014).

La composición y concentración de los fluidos preparados para la simulación de cada una de las etapas del proceso de digestión se indican en las **TABLAS 1 y 2**.

TABLA 1. Composición de los fluidos simulados de digestión. El volumen está calculado para un 1L de cada stock

Constituyente (mL)	SSS	SGS	SIS
KCL	30.2	13.8	13.6
KH₂PO₄	7.4	1.8	1.6
NaCl	6.8	23.6	18.3
MgCl₂(H₂O)₆	1	0.8	2.2
(NH₄)₂CO₃	0.12	1	-
NaHCO₃	-	25	95
H₂O	954.48	934	869.3

SSS: Stock Salivar Simulado, SGS: Stock Gástrico Simulado, SIS: Stock Intestinal Simulado

TABLA 2. Composición de los fluidos simulados

Constituyente	FGS	FIS
SGS (mL)	375	-
SIS (mL)	-	452.08
CaCl₂ (mL)	0.25	0.83
Pepsina (mg)	41.86	-
Bilis (mg)	-	439.83
Volumen final (mL)	500	500

FGS: Fluido Gástrico Simulado, FIS: Fluido Intestinal Simulado;
Concentración biliar: 1 ó 10 mM

Además, se varió el pH (6 ó 7) y la concentración biliar (1 ó 10 mM) y la concentración de pancreatina (Kreon®) según la cantidad de grasa de cada matriz para mantener una relación fija enzima:sustrato de 2000 UL/g grasa. Así, las condiciones de pH intestinal de 7 y concentración biliar de 10 mM, correspondieron a las condiciones fisiológicas de un adulto sano (Minekus et al., 2014); mientras que la combinación de pH intestinal 6 y concentración biliar 1 mM, se consideran las más desfavorables en individuos con IPE. A continuación, se detallan los pasos a seguir para llevar a cabo la simulación gastrointestinal:

En la **etapa oral**, el alimento (5g) se homogeneizó con 5 mL de la disolución stock simulado (SSS) y con α -amilasa de saliva humana (75 U/ mL) (pH 7) en tubos falcon de 50 mL. Se mezcló y se incubó durante 2 minutos a 37 °C sin

agitación en una cámara incubadora termostata Selecta (JP Selecta SA, Barcelona).

En la **etapa gástrica**, se añadieron 10 mL del fluido gástrico simulado (FGS) y la cantidad de Kreon® correspondiente según el ensayo. Al FGS se le añadió pepsina para alcanzar una concentración en la mezcla gástrica de 2000 U / mL. Seguidamente, se ajustó el pH a 3 con la ayuda de un pH-metro (Seven Compact™ S210, Mettler Toledo) mediante la adición de HCL (1 N). A continuación, se introdujeron los tubos en una cámara termostata (SELECTA modelo Boxcult 3000957) a 37 °C en agitación circular (arriba-abajo) constante a 55 rpm durante 120 minutos.

En la **etapa intestinal**, se añadieron 20 mL de fluido intestinal simulado (FIS) de pancreatina Kreón de 2000 UL/ g grasa, concentración biliar de 1 ó 10 mM según el diseño experimental; en base al cual también se ajustó el pH a 6 ó 7 con NaOH (1 N) y la ayuda del pH-metro. Posteriormente, se volvieron a introducir los tubos en la cámara termostata a 37 °C en agitación circular constante a 55 rpm durante 120 minutos, controlando el pH cada 30 minutos y reajustándolo en caso de que fuese necesario con la finalidad de mantenerla constante.

Una vez finalizado el tiempo de digestión, las muestras se incubaron en agua con hielo durante 10 minutos y, a continuación, se ajustó el pH a 9 con NaOH (1N) para la inactivación enzimática. Al final de la etapa intestinal, se separaron las fracciones digeridas (fracción bioaccesible) y no digeridas por centrifugación (4000 g-fuerza durante 15 min) y las alícuotas del sobrenadante (fracción bioaccesible) se reservó para las determinaciones analíticas. Todas ellas se realizaron por triplicado.

2.4. Determinaciones analíticas

2.4.1. CARACTERIZACIÓN COMPOSICIONAL DE LAS MATRICES DE CHÍA: HUMEDAD, LÍPIDOS, PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS

Se determinó el contenido en humedad, grasa, proteína y carbohidratos de las diferentes matrices de chía previamente a la digestión de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC (2000). El contenido en humedad se determinó teniendo en cuenta la variación de masa experimentada por la muestra antes y después del proceso de secado en estufa. Para llevarlo a cabo, se depositó aproximadamente 1 g de muestra en un recipiente adecuado, se disgregó con ayuda de una varilla de vidrio y arena de mar, y se introdujo en estufa de vacío a 60 °C hasta alcanzar peso constante AOAC (2000). Para la determinación del contenido en grasa se sometió a las muestras previamente liofilizadas (2 g, -45 °C, 1·10⁻² bar, modelo Telstar Lyoalfa-6 a una extracción con éter de petróleo mediante un equipo Soxhlet AOAC (2000). La cantidad de proteína total se determinó a partir del contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl (Lamothe et al., 2012) aprobado

por la AOAC (2000). Finalmente, los carbohidratos se calcularon considerando los sólidos totales y restando los contenidos de lípidos y proteínas. Asimismo, las matrices se caracterizaron en cuanto al contenido en calcio, polifenoles totales y se determinó su capacidad antioxidante de acuerdo a los métodos analíticos abajo indicados.

2.4.2. ANÁLISIS DE LA SOLUBILIDAD PROTEICA: EXTENSIÓN DE LA PROTEÓLISIS

La determinación de la solubilidad proteica se llevó a cabo midiendo la fracción proteica soluble en ácido tricloroacético (TCA), compuesta por péptidos pequeños y residuos de aminoácidos, siguiendo el método establecido por *Lamothe et al.* (2014). Para ello, se añadió 0,3 mL de TCA a las muestras digeridas (fracción líquida: 1,2 mL). Se agitó la mezcla en el vortex y se dejó 10 min en reposo. A continuación, se centrifugó a 8000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se diluyó mediante un tampón (50 mM EDTA, 8 M urea, pH 10). La proteína soluble se determinó mediante espectrofotometría, midiéndose la absorbancia a 280 nm frente a un blanco preparado con tampón y los fluidos digestivos apropiados. Para realizar los cálculos se empleó una curva de calibrado elaborada a partir de una disolución patrón de albúmina sérica bovina (BSA). La extensión de la proteólisis (%) se expresó como g eq. de BSA solubles en TCA/ 100 g de proteína inicial en la muestra no digerida.

2.4.3. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES (AGL): EXTENSIÓN DE LA LIPÓLISIS

Para la determinación de los AGL se diluyeron 100 μ L de fase micelar de las muestras digeridas en una disolución acuosa (5.72 % Triton X-100 y 4.8 % etanol), necesaria para solubilizar los AGL y asegurar la inhibición de la actividad lipasa (*Lamothe et al.*, 2012). Posteriormente, se empleó un kit enzimático (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EE.UU.) y se midieron los AGL midiendo la absorbancia de las diluciones a 546 nm mediante espectrofotometría. Los valores de absorbancia obtenidos se compararon con los valores obtenidos en una curva de calibrado realizada con un patrón de ácido palmítico. Los resultados se expresaron como extensión de la lipólisis (%) (g AGL/100 g grasa), considerando el peso molecular del ácido graso mayoritario en chía y que por cada molécula de triglicéridos se liberan dos moles de ácidos grasos.

2.4.4. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN CALCIO

Se usaron las cuatro matrices de chía (semilla de chía, harinas de semilla entera, harina parcialmente desgrasada y germinados) y sus respectivos digeridos. El mineral calcio se determinó mediante espectrometría de absorción atómica de llama (Thermo Scientific, serie iCE 3000), previa calcinación de la muestra. Para ello, se pesaron 3 g en crisoles de porcelana y se llevaron a mufla

a 450 °C durante 4 horas. En el caso de los digeridos, se dispusieron 4 mL en cada crisol y seguidamente también fueron llevadas a mufla. Posteriormente, en ambos casos, son llevadas a la estufa por 12 horas a 60 °C. Finalmente, se adicionaron 1.5 mL ácido nítrico puro (65%) y 4 mL de agua mliliQ a cada muestra y la disolución resultante se almacenó en botellitas de vidrio a 4° C hasta su análisis. Luego se incorporaron 2.5 mL de lantano (1%) para evitar interferencias de lectura en el equipo. Finalmente, se añadió agua destilada para alcanzar un volumen de solución total de 25 mL. La absorbancia se midió a 422.7 nm ajustando a cero con una muestra en blanco (disolución La3 + 0.1%).

2.4.5. ANÁLISIS DEL CONTENIDO TOTAL DE POLIFENOLES

Los polifenoles totales fueron determinados empleando la modificación del protocolo de ensayo de Folin–Ciocalteu (Paz-Yépez et al., 2019b; Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1998). La extracción de polifenoles se llevó a cabo en los liofilizados de las muestras digeridas (50 mg) usando metanol (70:30 metanol-agua (v:v) para el caso de chía) por agitación a 55 rpm, durante 120 minutos a 25 °C utilizando un Intell-Mixer RM-2 (Elmi Ltd, Riga, LV-1006, Letonia). La mezcla fue posteriormente centrifugada a 14.1 x g-fuerza por 20 minutos (Eppendorf® Minispin®). Tras la centrifugación, el extracto metanólico (125 µL) se añadió a una cubeta plástica de 4mL, con aguamiliQ (0.5 mL) y el reactivo de Folin-Ciocalteu (125 µL). Después de 5 minutos, se añadió 1.25 mL de una disolución de Na₂CO₃ (7% (p/v)) y agua miliQ (1 mL), y se midió su absorbancia a 760 nm. La curva patrón se realizó utilizando ácido Gálico (0-700 µmol de ácido gálico/ L) como estándar. Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico (AG) equivalentes por gramos de materia seca.

2.4.6. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para la determinación de la capacidad antioxidante se utilizó el método de DPPH por espectrofotometría, basado en la capacidad de los antioxidantes presentes en la chía y sus derivados para bloquear el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil generado (DPPH) (Antolovich et al., 2001). Se utilizó los liofilizados de las muestras digeridas (50mg) usando metanol (1mL, 70:30 metanol-agua (v: v)) por agitación a 55 rpm, durante 120 minutos a 25 °C utilizando un Intell-Mixer RM-2 (Elmi Ltd, Riga, LV-1006, Letonia). La mezcla fue posteriormente centrifugada a 8000 rpm por 20 minutos. Se midió la absorbancia a 515 nm de 3 mL del reactivo DPPH (absorbancia a tiempo cero, A₀). A continuación, se añadieron 30 µl del extracto y se midió la absorbancia nuevamente a los 60 minutos, cuando la reacción se había estabilizado (A₆₀). Se calculó el porcentaje de DPPH en función de la ecuación 1:

$$DPPH (\%) = \frac{A_0 - A_{60}}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

Los resultados se expresaron como mg de Trolox equivalente /g de en base seca.

2.4.7. MEDIDA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

Después de la interrupción mecánica en la etapa oral, las muestras se midieron para la distribución del tamaño de partícula usando un instrumento de dispersión de luz láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). El instrumento mide la dependencia angular de la intensidad de la difracción de luz láser y asigna la distribución del tamaño de partícula que mejor se ajusta a las mediciones y predicciones experimentales, según la teoría de dispersión de luz. El tamaño medio de partícula se informó como el diámetro medio ponderado de la superficie, $d_{3,2}$ (Hur, Decker y McClements, 2009).

2.4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las digestiones *in vitro* se realizaron por triplicado para cada tipo de matriz y cada combinación de pH y [bilis] y por tanto también, las determinaciones analíticas. Los resultados se expresaron como la media y la desviación estándar. El análisis de varianza (ANOVA) se llevó a cabo empleando el software Statgraphics Centurion XVI con un nivel de confianza del 95 %, considerando las diferencias estadísticamente significativas cuando $p\text{-valor} \leq 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Perfil nutricional de semillas y derivados de chía

Antes de la digestión *in vitro*, los cuatro productos de chía fueron caracterizados por la composición de nutrientes en términos de humedad, lípidos, proteínas y calcio. Además, se determinaron los compuestos de polifenoles y la actividad antioxidante total. En la **TABLA 3**, los resultados se expresan en base seca, para evidenciar el impacto de los procesos aplicados a las semillas de chía (molienda, desgrasado y germinación) en su composición.

TABLA 3. Caracterización de composición nutricional de semillas de chía, germinados de chía, harina de chía entera y harina parcialmente desgrasada (comercial).

	Semillas y harina de semilla entera	Harina parcialmente desgrasada	Germinados
Humedad (g/g materia seca)	0.065 (0.008) ^a	0.068 (0.009) ^a	9.87 (0.010) ^b
Lípidos (g/ g materia seca)	0.325 (0.011) ^c	0.197 (0.007) ^b	0.097 (0.003) ^a
Proteínas (g/g materia seca)	0.201 (0.007) ^a	0.291 (0.011) ^c	0.229 (0.009) ^b
Carbohidratos (g/g materia seca)	0.472 (0.016) ^a	0.501 (0.017) ^b	0.644 (0.022) ^c
Calcio (mg/ g materia seca)	6.46 (0.046) ^b	3.45 (0.032) ^a	7.26 (0.18) ^c
Polifenoles (mg eq. AG./g materia seca)	1.78 (0.03) ^b	1.24 (0.02) ^a	2.87 (0.06) ^c
Actividad Antioxidante (mg TX eq./g materia seca)	3.49 (0.11) ^b	2.58 (0.09) ^a	5.69 (1.6) ^c

Los valores que comparten una misma letra en la misma fila no son significativamente diferentes (p <0.05). GA eq., Equivalente de ácido gálico; TX, equivalente de trolox.

Las diferencias se encontraron principalmente en relación a la humedad, que pasó de valores alrededor de 0.065 en semillas a 9.87 g/g de materia seca en los germinados. También se produjo una reducción en el contenido de lípidos en los brotes de chía, junto con un aumento en el contenido de proteínas. Una disminución gradual en el contenido de lípidos es un fenómeno bien definido que ocurre en la germinación de semillas, promovido por la acción de las lipasas endógenas (Kyllen y McCready, 1975; Mostafa, Rahma y Rady, 1987). Además, el aumento de proteínas después de la germinación (en comparación con las semillas y la harina de grano entero) resulta de un equilibrio positivo entre la degradación de proteínas y la biosíntesis de proteínas durante la germinación (Benincasa et al., 2019; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1982). Respecto a los carbohidratos, el ligero aumento del valor de la harina de chía parcialmente desgrasada está relacionado con la disminución de la materia seca como consecuencia de la extracción de aceite, mientras que el aumento de los brotes podría explicarse con la formación de nuevas paredes celulares primarias (Benincasa et al., 2019).

Los cambios en cuanto a contenido en fenoles se sustentan en numerosos estudios que han mostrado como la germinación produce una acumulación gradual de fenoles solubles en los germinados en comparación con las semillas.

Este fenómeno se puede atribuir a la síntesis de novo de estos compuestos. Cabe destacar que se produjo un incremento de casi el doble en la capacidad antioxidante, lo que sugiere que la germinación genera además otros nuevos compuestos antioxidantes a parte de los fenoles, como por ejemplo un incremento del contenido en vitaminas y la activación de la clorofila, la cual tiene elevada capacidad antioxidante (Guzmán-Ortiz et al., 2017). Finalmente, la germinación también induce cambios en la concentración de minerales, como se observa en la concentración de calcio en los germinados, probablemente como consecuencia de un incremento de su extractabilidad (Benincasa et al., 2019).

Además, se determinó el tamaño de partícula de las semillas y las harinas de chía para definir las muestras en términos de características estructurales. Como se muestra en la **FIGURA 1**, las semillas de chía después de la etapa oral dieron como resultado un diámetro medio de partícula de 811.6 μm , que, como se esperaba, fue superior al de las harinas, ambas con tamaños de partículas similares ($d_{3,2}$ siendo 338 y 266 μm en la harina integral y en la harina parcialmente desgrasada, respectivamente). Estos resultados pueden ser útiles para comprender los resultados de digestibilidad y bioaccesibilidad de nutrientes presentados en las siguientes secciones, ya que la liberación de nutrientes de la matriz depende en gran medida del grado de desestructuración de la matriz (Grundy, Lapsley & Ellis, 2016; Guo et al., 2015; Paz-Yepez et al., 2019 b).

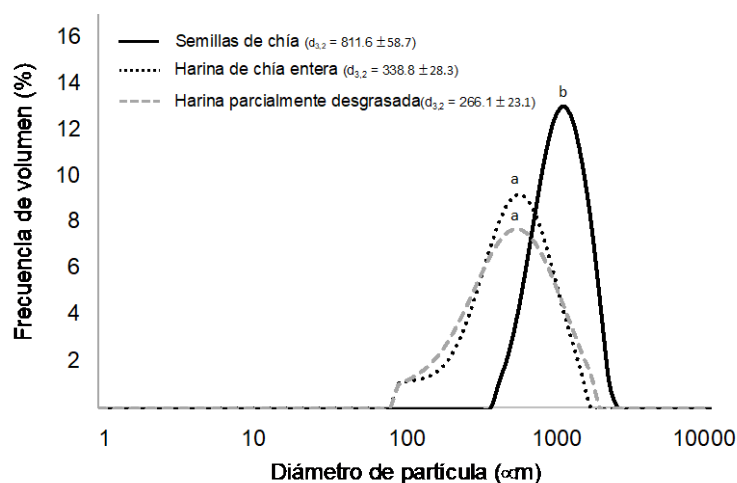


FIGURA 1. Distribuciones de tamaño de partícula de las semillas y harinas de chía luego del proceso mecánico y la masticación simulada. Los valores $d_{3,2}$ que comparten una misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

3.2. Digestibilidad de macronutrientes de productos de chía: proteólisis y lipólisis

A parte de estudiar la digestibilidad de nutrientes en las cuatro matrices definidas en este trabajo, se evaluaron las semillas de chía intactas (omitiendo la simulación de masticación). Como se esperaba, tanto la digestibilidad de lípidos como de proteínas en semillas de chía intactas fue nula. Este resultado sostiene la inalterabilidad y la rigidez del pericarpio durante la digestión gástrica e intestinal de las semillas (Inglett et al., 2014). Por lo tanto, se puede afirmar que la ingesta de semillas enteras solo proporciona beneficios en términos de propiedades de mucílago, que pueden hidratarse y gelificarse. Este fenómeno provoca un aumento del volumen de las semillas, que eventualmente conduce a una mayor viscosidad del contenido gástrico y de la saciedad, relacionada con la distensión de las paredes gástricas (Zhu, Hsu & Hollis, 2013; Guo et al., 2015; Logan, Wright & Goff, 2015). Así pues, este resultado apoya que la digestibilidad de lípidos y proteínas en las semillas de chía requiere de procesamiento antes de su consumo o incorporación como ingrediente a otros alimentos.

Al evaluar la digestibilidad de proteínas y lípidos, el tamaño de partícula de las diferentes estructuras resultó tener un efecto significativo, de modo que los tamaños de partícula más pequeños se asociaron con una mayor proteólisis y lipólisis (**FIGURA 2**). En consecuencia, tanto las harinas enteras como las parcialmente desgrasadas lograron extensiones de lipólisis significativamente más altas que las semillas de chía. Estas matrices estaban altamente desestructuradas, por lo que se puede asumir que los componentes de las semillas estaban disponibles como sustratos enzimáticos. Sin embargo, la harina parcialmente desgrasada, a pesar de tener un tamaño de partícula ligeramente más pequeño, obtuvo extensiones de digestibilidad más bajas. Las posibles razones de este hallazgo se relacionan con diferentes operaciones involucradas en el proceso de desgrasado, que podrían haber afectado la estructura de la proteína (Ju, Hettiarachchy & Rath, 2001), y en general, con la menor proporción de lípidos / proteínas.

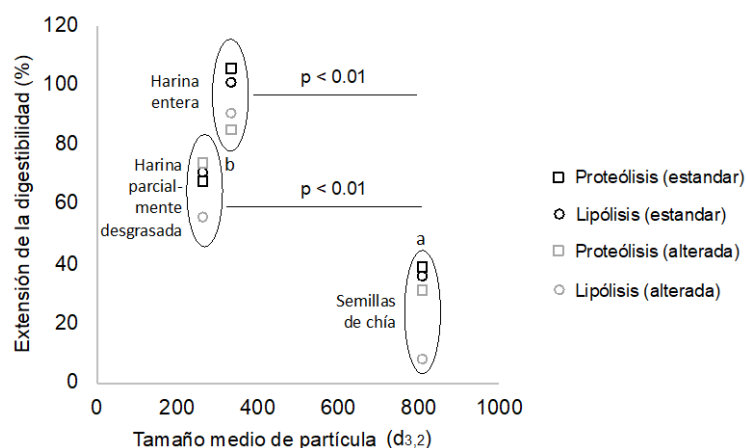


FIGURA 2. Relación entre el tamaño de partícula de chía y sus derivadas (tras la simulación de la masticación) y la extensión de la digestibilidad de lípidos y proteínas.

Atendiendo a las distintas estructuras, en los germinados de chía no se registró lipólisis (0%) para ninguna de las condiciones (**FIGURA 3A**), como resultado de un bajo contenido en grasa (0.97%) derivado del alto contenido en agua que presenta. En estudios anteriores se constató que los alimentos con un bajo contenido de grasa tienden a presentar resistencia a la lipólisis. Calvo-Lerma et. (2018), en un estudio realizado sobre lipólisis en múltiples alimentos, se observó que el pan, por ejemplo, que tenía <5% de grasa, solo mostró extensiones residuales de lipólisis, mientras que otros productos de panadería con una composición similar pero con un mayor contenido de grasa podrían alcanzar resultados satisfactorios de digestión lipídica. Otra explicación de la lipólisis nula registrada en los brotes de chía se relaciona con la posible presencia de agentes supresores de la actividad lipasa, como los compuestos fenólicos que demostraron tener este efecto inhibitorio (Benarous et al., 2013), los cuales podrían haberse desarrollado en el proceso de germinación.

La harina de las semillas alcanzó las extensiones máximas de lipólisis de todas las matrices de estudio, concretamente el 100% en condiciones normales y el 90% en las alteradas. Una posible explicación para este hallazgo se relaciona tanto con que la harina está completamente desestructurada, favoreciendo así la accesibilidad de la grasa a las lipasas, como por el contenido relativamente alto de grasa (0.325 vs. 0.197 g / g de materia seca en harina parcialmente desgrasada). Estudios previos sugirieron que la alta concentración de lípidos en el medio de digestión es un factor potenciador de la lipólisis (Desnuelle y Savary, 1963). Por otro lado, a pesar de que la harina parcialmente desgrasada presentó un menor tamaño de partícula, lo cual podría haber favorecido la lipólisis, al parecer a partir de este resultado, la menor concentración de lípidos en el medio de digestión tuvo un efecto mayor sobre la digestibilidad lipídica (70% y 58% en

las condiciones normales y alteradas, respectivamente) Esta interpretación se respalda con el estudio de Cui et al. (2019) en el que se evidenció una relación directa entre contenido de lípidos y extensión de la lipólisis. Finalmente, las semillas de chía mostraron las extensiones de lipólisis más bajas (35% en condiciones estándar y 7% en condiciones alteradas) probablemente debido a que a diferencia de las harinas, algunas fracciones del producto mantuvieron la estructura original del grano inalterada, impidiendo así la liberación de grasa al medio digestivo.

Con respecto a la proteólisis, las condiciones intestinales alteradas se relacionaron con menor extensión de proteólisis, siendo significativamente más bajas que en las condiciones normales. Al igual que en la lipólisis, el grado de desestructuración afectó significativamente la extensión de la proteólisis. Los mecanismos de desestructuración, como la masticación o la molienda en las harinas de chía dieron como resultado mayores extensiones que la germinación, tanto en la etapa gástrica como en la intestinal (**FIGURA 3B**).

Considerando la proteólisis total, la etapa gástrica representó 10-35%. La proteólisis a lo largo del tracto digestivo es un proceso bien definido. Se caracteriza por ser el principal fenómeno enzimático que ocurre en el estómago, donde la pepsina puede hidrolizar hasta el 30-40% de las proteínas de la dieta. Posteriormente, en el intestino delgado, las proteasas pancreáticas pueden continuar con el proceso, siendo específicas para moléculas proteicas completas o productos de hidrólisis parcial, tales como péptidos (Alpers, 1994). En los brotes de chía se alcanzó una proteólisis completa al final de la etapa gástrica (100%). Este resultado es coherente teniendo en cuenta que durante la germinación del grano, las proteínas de almacenamiento se hidrolizan en péptidos y aminoácidos por la acción de enzimas proteolíticas, lo que conduce a altos niveles de bioaccesibilidad de este compuesto (Taylor, Novellie y Liebenberg, 1985; Benincasa et al., 2019). Por otro lado, se registró un menor grado de proteólisis gástrica en la harina de chía parcialmente desgrasada, probablemente debido a una cierta desnaturalización de las proteínas durante el proceso de secado (>70 °C) que acontece como etapa en el desgrasado.

Considerando la proteólisis en total, las harinas de chía entera y parcialmente desgrasada alcanzaron los mayores valores (alrededor de 70% y 100%) en condiciones intestinales normales (pH 7 y concentración de bilis 10 mM). Estas condiciones permitieron una mayor disgregación de la matriz y, en consecuencia, incrementaron la accesibilidad de las proteínas a las proteasas intestinales. Así, se volvió a evidenciar que a mayor desestructuración de la matriz, mayor grado de digestibilidad.

Tanto la lipólisis como la proteólisis, se vieron significativamente afectados por las condiciones intestinales simuladas: las alteradas condujeron a una extensión significativamente menor que las condiciones estándar, excepto para los germinados, donde éstas no tuvieron ningún efecto. Es sabido que la lipasa

pancreática produce más del 80% de la lipólisis a lo largo del tracto gastrointestinal (Winkle, d'Arcy & Hunziker, 1990; Robinson et al., 1990). Sin embargo, para que esto sea posible, la lipasa requiere un pH óptimo en el medio de reacción alrededor de 7 (Desnuelle y Savary, 1963). Además, se requiere la presencia de sales biliares en una concentración suficiente para eliminar los productos de la lipólisis de la superficie de las partículas de grasa, permitiendo que continúe la reacción hidrolítica y para emulsionar las gotas de grasa y aumentar así la superficie de contacto con las enzimas (Verger y de Haas, 1976; Sarkar, Horne & Singh, 2010; Sarkar, Ye & Singh, 2016).

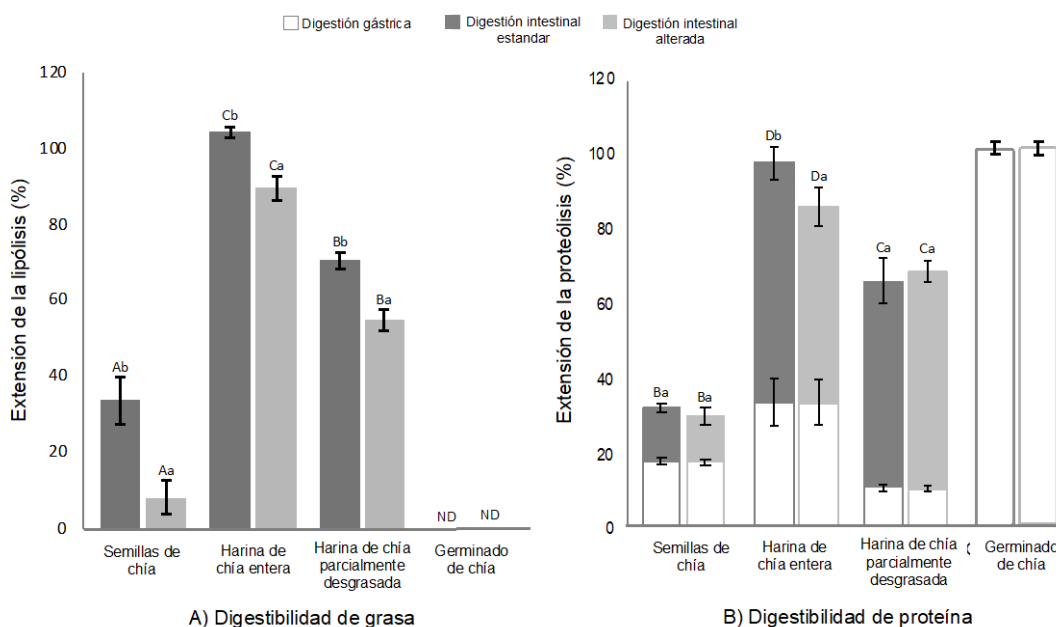


FIGURA 3. Digestibilidad de proteínas (A) y lípidos (B) en semillas de chia, harina de chia entera, harina de chia parcialmente desgrasada y germinados de chia durante la digestión intestinal normal (pH 7, concentración de sales biliares 10 mM) y alterada (pH 6, bilis sales concentración 1 mM). ND = no detectable. Las letras mayúsculas diferentes (A-D) significan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los productos de chia (semillas de chia, harina de chia entera, harina de chia parcialmente desgrasada y germinados de chia). Diferentes letras minúsculas (a-b) significan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las condiciones intestinales (estándar y alternadas).

3.3. Bioaccesibilidad de calcio y polifenoles

Según el análisis de composición, las semillas de chia y sus derivados representan una fuente potencial de calcio considerable. Sin embargo, a pesar de la composición determinada en las materias primas antes de la digestión, la bioaccesibilidad de calcio después de la digestión intestinal, se registraron valores inferiores en todas las estructuras, especialmente en los germinados de

chía (alrededor del 96 %). La baja bioaccesibilidad de calcio en la chía germinada podría estar relacionada con la unión de calcio a la fracción de fibra no celulósica, tal como lo describieron James, Branch y Southgate et al. (1978). Además, los resultados muestran que se obtuvo más calcio disponible en el medio con las condiciones intestinales alteradas. Este hecho podría explicarse por el hecho de que el ion calcio se puede formar complejos con los ácidos grasos liberados del proceso de lipólisis, quedando no disponible (Govers & Van der Meet, 1993). De esta manera, se puede interpretar que en el contexto de las condiciones alteradas, la menor concentración de bilis conllevó a una menor lipólisis, dejando así mayor proporción de calcio disponible que en condiciones estándar.

En cuanto a los polifenoles, la digestión en condiciones intestinales normales permitió una mayor capacidad de extracción que las condiciones alteradas. Este hallazgo se entiende teniendo en cuenta que los polifenoles en la matriz están unidos a macronutrientes (principalmente proteínas y carbohidratos), por lo que su liberación y bioaccesibilidad depende de la hidrólisis de los mismos (Akilloglu y Karakaya, 2010). La mayor extracción se detectó en las formas de harina de chia entera y harina parcialmente desgrasada. Sin embargo, en las semillas de chía no se obtuvieron cambios significativos y en los brotes de chía el aumento fue moderado. Es probable que este resultado esté respaldado por el hecho de que las matrices no estructuradas, en comparación con estructuras completas o parcialmente desintegradas, permiten una mayor liberación de nutrientes al medio de digestión (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertoline & Conte, 2010). Centrándose en el efecto de germinación, los brotes de chía dieron como resultado más polifenoles bioaccesibles que las semillas de chía. Este resultado concuerda con la evidencia de que los nutrientes en los productos germinados son más bioaccesibles y biodisponibles que las semillas de las que provienen (Pajak et al., 2019), pero el proceso de molienda parece ser el más determinante a este respecto.

Para finalizar, la actividad antioxidante disminuyó tras la digestión en todos los casos, siendo más notoria en condiciones alteradas que en la digestión normal (**TABLA 4**). La reducción en la capacidad antioxidante podría estar relacionada con las moléculas bioactivas liberadas que interactúan entre sí en un sentido antagónico (Hidalgo, Sánchez-Moreno & Pascual-Teresa, 2010). Además en las condiciones de digestión alteradas, se produjo una menor degradación de la matriz, por lo tanto, se logró una menor liberación de compuestos al medio de digestión. Para la determinación de la actividad antioxidante se consideró la fracción de compuestos bioactivos presentes en la fase líquida del digerido, pero no en la fase sólida no digerida. Así, en la fase sólida no digerida podrían quedar retenidos parte de los compuestos bioactivos no bioaccesibles. Por el contrario, en el estudio de Pellegrini et al. (2018), se obtuvo un aumento de la capacidad antioxidante de semillas de chía tras la etapa intestinal, ya que en el mismo se consideraron ambas fases, sólida y líquida.

TABLA 4. Concentración de calcio, polifenoles y actividad antioxidante en la fracción bioaccesible después de la digestión *in vitro* en condiciones intestinales estándar y alteradas.

	Condiciones intestinales	Semillas de chía	harina de semilla entera	Harina parcialmente desgrasada	Germinados
Calcio (mg/ g materia seca)	Normales	3.82 (0.03) ^{Ca}	4.22 (0.03) ^{Da}	2.09 (0.07) ^{Ba}	0.15 (0.02) ^{Aa}
	Alteradas	3.77 (0.04) ^{Ca}	4.28 (0.02) ^{Da}	2.07 (0.03) ^{Ba}	0.32 (0.04) ^{Ab}
Polifenoles (mg GA eq./ g materia seca)	Normales	1.81 (0.17) ^{Ab}	6.13 (0.38) ^{Db}	2.67 (0.28) ^{Bb}	4.41 (0.51) ^{Cb}
	Alteradas	1.51 (0.15) ^{Aa}	3.91 (0.16) ^{Da}	2.13 (0.13) ^{Ba}	3.55 (0.13) ^{Ca}
Capacidad antioxidante (mg TX eq./ g materia seca)	Normales	1.17 (0.06) ^{Ab}	4.8 (0.38) ^{Cb}	3.97 (0.75) ^{Bb}	4.21 (1.17) ^{Bb}
	Alteradas	1.03 (0.09) ^{Aa}	3.31 (0.33) ^{Ca}	2.53 (0.39) ^{Ba}	2.23 (0.74) ^{Ba}

Las letras mayúsculas diferentes (A-D) significan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los productos de chía (semillas de chía, harina de chía entera, harina de chía parcialmente desgrasada y germinados de chía). Diferentes letras minúsculas (a-b) significan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las condiciones intestinales (estándar y alteradas). GA eq., Equivalente de ácido gálico; TX, equivalente de trolox.

4. CONCLUSIONES

Los efectos beneficiosos para la salud derivados del consumo directo de semillas de chía estarían limitados debido a la baja digestibilidad de las semillas por su estructura matricial, siendo el principal beneficio asociado su ingesta el aporte de fibra. De acuerdo a los resultados del presente estudio, los diferentes procesados y condiciones de digestibilidad afectan a la digestibilidad de nutrientes y la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos. La harina de chía entera presenta una digestibilidad mayor tanto de proteínas como de lípidos, así como de bioaccesibilidad de calcio, polifenoles y actividad antioxidante, tanto en condiciones intestinales normales como alteradas propias de individuos con insuficiencia pancreática. Finalmente, la germinación facilita la hidrólisis completa de las proteínas y se conduce a un aumento significativo del contenido en polifenoles y de calcio en los brotes de chía, aunque se debe tener presente que la concentración de sus nutrientes es menor que en el resto de estructuras debido al aumento de la humedad. Por ello, los resultados de la digestión *in vitro* respaldan la aplicación de la molienda a las semillas de chía para obtener el máximo beneficio de los componentes nutricionales y funcionales.

En conclusión, los resultados de esta investigación han permitido conocer el efecto de la molienda y la germinación de las semillas de chía y sus derivados en relación a la digestibilidad y bioaccesibilidad de sus componentes nutricionales.

5. REFERENCIAS

- Afghani E, Sinha A, K. Singh V. An Overview of the Diagnosis and Management of Nutrition in Chronic Pancreatitis. *Nutr Clin Pract* 2014 Jun; 29(3): 295-311.
- Akillioglu, H. G., & Karakaya, S. (2010). Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and *in vitro* digestion process. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 633-639.
- Alpers D. Digestion and absorption of carbohydrates and proteins. In: LR J, editor. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Vol. 2. New York: Raven Press; 1994. pp. 1723–1749.
- Antolovich, M., Li, X., y Robards, K. (2001). Detección de adulteración en zumos de naranja australianos mediante análisis de relación de isótopos de carbono estables (SCIRA). *Diario de química agrícola y alimentaria*, 49 (5), 2623-2626.
- AOAC, (2000). *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemist. 15th Edition.
- Benarous, K., Djeridane, A., Kameli, A., & Yousfi, M. (2013). Inhibition of *Candida rugosa* lipase by secondary metabolites extracts of three Algerian plants and their antioxidant activities. *Current Enzyme Inhibition*, 9(1), 75-82.
- Benincasa, P., Falcinelli, B., Lutts, S., Stagnari, F., & Galieni, A. (2019). Sprouted grains: A comprehensive review. *Nutrients*, 11(2), 421.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... & Clemente, A. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14(4), 991-1014.
- Calvo-Lerma, J., Fornés-Ferrer, V., Heredia, A., & Andrés, A. (2018). *In Vitro* Digestion of Lipids in Real Foods: Influence of Lipid Organization Within the Food Matrix and Interactions with Nonlipid Components. *Journal of food science*, 83(10), 2629-2637.
- Capitani MI, Spotorno V, Nolasco SM, Tomás MC (2012) Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds from Argentina. *Food Sci Technol* 45:94–102. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.012>
- Cui, L., Gao, L., Zheng, M., Li, J., Zhang, L., Wu, Y., ... & Huang, D. (2019). Bioaccessibility of short chain chlorinated paraffins in meat and seafood. *Science of The Total Environment*, 668, 996-1003.
- Desnuelle, P., & Savary, P. (1963). Specificities of lipases. *Journal of Lipid Research*, 4(4), 369-384.
- Diéguez Castillo C, Jiménez Luna C, Sánchez Lara FJ, Delgado Maroto A, Íñigo Chaves A, Martín Ruiz JL. Elastasa fecal como método diagnóstico de insuficiencia pancreática exocrina: experiencia en nuestro centro. *RAPD Online*. 2018;41(4):173-176. Acceso 24/08/2019. Disponible en: <https://www.sapd.es/revista/2018/41/4/01>
- Domínguez-Muñoz JE. Pancreatic enzyme therapy for pancreatic exocrine insufficiency. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9(2): 116-122.
- De la Iglesia-García D, Vallejo-Serra N, Iglesias-García J, López-López A, Nieto L, Domínguez-Muñoz JE. Increased Risk of Mortality Associated With Pancreatic Exocrine Insufficiency in Patients With Chronic Pancreatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2017.
- E., Stern, M., Strandvik, B., Wolfe, S., Schneider, S. M., & Wilschanski, M. (2016). ESPEN-ESPGHAN-ECFS guidelines on nutrition care for infants, children, and adults with cystic fibrosis. *Clinical Nutrition* 3, 557-577.
- Grundy, M. M. L., Lapsley, K., & Ellis, P. R. (2016). A review of the impact of processing on nutrient bioaccessibility and digestion of almonds. *International journal of food science & technology*, 51(9), 1937-1946.
- Govers, M. J., & Van der Meet, R. (1993). Effects of dietary calcium and phosphate on the intestinal interactions between calcium, phosphate, fatty acids, and bile acids. *Gut*, 34(3), 365-370.
- Guzmán-Ortiz, F. A., San Martín-Martínez, E., Valverde, M. E., Rodríguez-Aza, Y., Berríos, J. D. J., & Mora-Escobedo, R. (2017). Profile analysis and correlation across phenolic compounds,

- isoflavones and antioxidant capacity during germination of soybeans (*Glycine max* L.). *CyTA-Journal of Food*, 15(4), 516-524.
- Hall, C., Tulbek, M.C., Xu, Y., 2006. Flaxseed. *Advances in food Nutrition Research*, 51, 1-97
- Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., & de Pascual-Teresa, S. (2010). Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food chemistry*, 121(3), 691-696.
- Hur, M., Li, Y., Decker, E. A., & Mc Clements, D. J. (2010). Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 719e725.
- Inglett, G. E., Chen, D., Liu, S. X., & Lee, S. (2014). Pasting and rheological properties of oat products dry-blended with ground chia seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 148-156.
- Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W., ... y Tomás, M. C. (2011). Caracterización de los aceites de semillas de chía obtenidos por prensado y extracción con solvente. *Revista de composición y análisis de alimentos*, 24 (2), 166-174.c
- James, W. P. T., Branch, W. J., & Southgate, D. A. T. (1978). Calcium binding by dietary fibre. *The Lancet*, 311(8065), 638-639.
- Ju, Z. Y., Hettiarachchy, N. S., & Rath, N. (2001). Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. *Journal of food science*, 66(2), 229-232.
- Kylen, A. M., & McCready, R. M. (1975). Nutrients in seeds and sprouts of alfalfa, lentils, mung beans and soybeans. *Journal of Food Science*, 40(5), 1008-1009.
- 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.
- Lamothe, S., Azimy, N., Bazinet, L., Couillard, C., & Britten, M. (2014). Interaction of Green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food & Function*, 5(10), 2621-2631.
- Lindkvist B, Dominguez-Munoz JE, Luaces-Regueira M, Castineiras-Alvarino M, Nieto-Garcia L, Iglesias-Garcia J. Serum nutritional markers for prediction of pancreatic exocrine insufficiency in chronic pancreatitis. *Pancreatology*. 2012; 12(4):305-10.
- Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E., Ciska, E., Piskula, M.K., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C., Frias, J. (2010). Time dependence of bioactive compounds and antioxidant capacity during germination of different cultivars of broccoli and radish seeds. *Food chemistry*, 120, 710-716.
- Minek, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T.O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... y Dufour, C. (2014). Un método estandarizado de digestión *in vitro* estático adecuado para alimentos, un consenso internacional. *Comida y función*, 5 (6), 1113-1124.
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of food Engineering*, 108(1), 216-224.
- Pająk, P., Socha, R., Broniek, J., Królikowska, K., & Fortuna, T. (2019). Antioxidant properties, phenolic and mineral composition of germinated chia, golden flax, evening primrose, phacelia and fenugreek. *Food chemistry*, 275, 69-76.
- Sikkens, E. C. M., Cahen, D. L., Kuipers, E. J., & Bruno, M. J. (2010). Pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 24(3), 337-347.
- Singleton Vernon, L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol. C*, 299, 152-78.
- Paz-Yépez, C., Peinado, I., Heredia, A., & Andrés, A. (2019 a). Lipids digestibility and polyphenols release under *in vitro* digestion of dark, milk and white chocolate. *Journal of functional foods*, 52, 196-203.
- 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.
- Pellegrini, M., Lucas-Gonzalez, R., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2018). Bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Plant foods for human nutrition*, 73(1), 47-53.

- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606.
- Taylor, J. R., Novellie, L., & Liebenberg, N. V. (1985). Protein body degradation in the starchy endosperm of germinating sorghum. *Journal of experimental botany*, 36(8), 1287-1295.
- Ullah, R., Nadeem, M., Khalique, A., Imran, M., Mehmood, S., Javid, A., & Hussain, J. (2016). Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica* L.): a review. *Journal of food science and technology*, 53(4), 1750-1758.
- United States Department of Agriculture - USDA (2010). World Agricultural supply and Demand Estimates. Wasde 486. US Department of Agriculture, Pennsylvania, USA.
- Valdivia-Lopez MA, Tecante A (2015) Chia (*Salvia hispanica*): a review of native Mexican seed and its nutritional and functional properties. *Adv Food Nutr Res* 75:53–75. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2015.06.002>
- Verger, R., & de Haas, G. H. (1976). Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 5(1), 77-117.
- Zettel, V., & Hitzmann, B. (2018). Applications of chia (*Salvia hispanica* L.) in food products. *Trends in Food Science & Technology*, 80(January), 43–50.
- Zhu, Y., Hsu, W. H., & Hollis, J. H. (2013). The impact of food viscosity on eating rate, subjective appetite, glycemic response and gastric emptying rate. *PLoS One*, 8(6), e67482.