

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA  
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## **Influencia de la matriz y tipo de grasa en la digestibilidad de lípidos y proteínas de algunos productos de la pesca**

**TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

ALUMNO: Aurora Barberá Bellés  
TUTOR: Dra. Ana María Andrés Grau  
COTUTOR: Dra. Ana Belén Heredia Gutiérrez  
DIRECTOR EXPERIMENTAL: Dra. Irene Peinado Pardo

Curso académico: 2015-2016

Valencia, Julio 2016



**ALUMNO:** Aurora Barberá Bellés

**TUTOR:** Dra. Ana María Andrés Grau

**COTUTOR:** Dra. Ana Belén Heredia Gutiérrez

**DIRECTOR EXPERIMENTAL:** Dra. Irene Peinado Pardo

**LOCALIDAD Y FECHA:** Valencia, Julio 2016

**TÍTULO:** Influencia de la matriz y tipo de grasa en la digestibilidad de lípidos y proteínas de algunos productos de la pesca.

## **RESUMEN**

La insuficiencia pancreática exocrina (IPE) es una de las complicaciones principales de las enfermedades del páncreas y consiste en la incapacidad del páncreas para sintetizar la cantidad de enzimas necesarias para la adecuada digestión de los alimentos. La terapia clínica habitual en individuos con IPE consiste en la administración por vía oral de un suplemento de enzimas pancreáticas para mejorar la absorción de los macronutrientes, y principalmente los lípidos por estar más comprometida su digestión en estas circunstancias. El suplemento se dosifica actualmente en base al peso y edad del paciente. Sin embargo, estos criterios resultan insuficientes pues existen una serie de factores propios al alimento (estructura, cantidad y origen grasa, etc.) así como al entorno intestinal (pH, concentración biliar entre otros) que podrían condicionar la eficiencia del suplemento, así como la digestibilidad de sus macronutrientes.

Por ello, en el presente trabajo se ha utilizado un método estático de digestión *in vitro* que permite simular las condiciones gastrointestinales de individuos sanos así como de pacientes con insuficiencia pancreática, con el fin de determinar la eficiencia del suplemento enzimático en la digestibilidad de las grasas y proteínas de una serie de productos alimenticios de la pesca. Concretamente, se llevó a cabo la digestión gastrointestinal de atún en aceite, salmón, merluza empanada y merluza con concentraciones variables del suplemento enzimático Kreon® (0-4000 UL / g grasa), y distintas condiciones de pH intestinal (6-7) y concentración biliar (1 y 10 mM).

La digestión dio lugar a una degradación gradual de los distintos tipos de alimentos, facilitando la liberación de los macro y micronutrientes. El índice de degradación de la matriz no se vio afectado ni por el pH ni por la concentración biliar, alcanzando niveles del 80 %, excepto en la merluza en la que se obtuvieron menores valores. Factores como el tipo de cocinado, almacenamiento previo y tipo de grasa, contribuyen de forma diferente a la degradación de la matriz durante el proceso de digestión, favoreciendo o no, tanto el grado de proteólisis como el de lipólisis. En cuanto a la digestibilidad proteica, las mayores diferencias observadas se debieron principalmente a la dosis de Kreon® administrada para todas las matrices y para unas condiciones intestinales constantes (pH 6/ 1 mM). Además, el aumento del pH (de 6 a 7) y de la concentración biliar (de 1 a 10 mM), se tradujo en mayores valores de proteólisis. En cuanto a la lipólisis, sólo en el caso del atún se alcanzaron valores del 100 % para unas condiciones intestinales constantes (pH 6/ 1 mM). En cambio, la composición del fluido biliar contribuyó en

la digestión de los lípidos, pero no así el pH, observándose una mayor extensión de la lipólisis en los pescados más grasos. Así pues, los productos de la pesca con mayor contenido graso serían los más recomendables para pacientes que cursen IPE puesto que presentan mayor digestibilidad de grasa y proteína.

**Palabras clave:** Digestión *in vitro*, lipólisis, proteólisis, atún, salmón, merluza, insuficiencia pancreática.

**STUDENT:** Aurora Barberá Bellés

**TUTOR:** Ana María Andrés Grau

**CO-TUTOR:** Ana Belén Heredia Gutiérrez

**EXPERIMENTAL DIRECTOR:** Irene Peinado Pardo

**DATE:** Valencia, July 2016

**TITLE:** Influence of food matrix and type of fat on the digestibility of lipids and proteins of some fish products

## **ABSTRACT**

Exocrine pancreatic insufficiency (EPI) is one of the main complications the diseases of the pancreas have and consists of the inability of the pancreas to synthesize the amount of enzymes needed for the proper digestion of food. The usual clinical therapy in individuals with EPI involves the oral administration of a pancreatic enzyme supplement to improve absorption of macronutrients, and mainly lipids due to their committed digestion in these circumstances. The dosage of the supplement is currently based on the weight and age of the patient. However, these criteria are insufficient because there are a number of specific factors according to the food (structure, quantity and fatty origin, etc.) and the intestinal environment (pH, bile concentration among others) that could influence the efficiency of the supplement as well as the macronutrients digestibility.

Therefore, in this paper, we have used a static method of *in vitro* digestion to simulate the gastrointestinal conditions of healthy individuals and patients with pancreatic insufficiency, in order to determine the efficiency of the enzymatic supplement on fat and protein digestibility from some seafood products. Specifically, this simulate gastrointestinal digestion has been conducted to oiled tuna, salmon, hake and hake pie varying the concentration of the enzyme supplement Kreon® (0-4000 UL / g fat), the intestinal pH conditions (6-7) and the bile concentration (1 to 10 mM).

Digestion resulted in a gradual degradation of the different types of seafood, making easy the release of macro- and micronutrients. The rate of matrix degradation was not affected by either the pH and bile concentration, reaching levels of 80%, except hake in which lower values were obtained. Factors such as the type of cooking, storage and prior type of fat, contributed differently to degradation of the matrix during the digestion process, favoring or not, both the proteolysis and lipolysis degree. As for protein digestibility, the greatest differences observed were mainly due to the Kreon® administrated doses for all matrices within constant intestinal conditions (pH 6/ 1 mM). Furthermore, the increased pH (6 to 7) and bile concentration (1 to 10 mM) resulted in higher values of proteolysis. According to lipolysis results, only in the case of tuna, 100 % values for constant intestinal conditions (pH 6/ 1 mM) were achieved. Instead, bile fluid composition contributed to lipid digestion, not the case of pH, having the fatty fish a greater

extent of lipolysis. Thus, fishery products with higher fat content would be most recommended for patients who attend EPI since they would have a higher fat and protein digestibility.

**Key words:** *in vitro* digestion, lipolysis, proteolysis, tuna, salmon, hake, pancreatic insufficiency.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a Irene su plena dedicación en este trabajo. Muchísimas gracias por toda tu ayuda, tu tiempo y tu motivación.

Tanto Ana H. como Ana A. han sido partícipes indiscutibles de lo logrado. Sus consejos me han servido de gran ayuda para llevar a cabo este trabajo.

Agradecer también a Virginia, Salva y Quim, que han contribuido de forma muy directa a que todo vaya lo mejor posible.

El ambiente de trabajo ha sido insuperable. Mis compañeros y amigos Sergio, Andrea, Ary y Carmen han logrado que mis días en el laboratorio hayan sido más llevaderos y divertidos.

Por último, dedicar unas breves palabras a mis padres y mi hermana Martina, que siempre me han apoyado (y aguantado) por encima de cualquier otra cosa. Yo no habría llegado hasta aquí si no hubiese sido por vosotros.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS .....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1. Matrices de estudio, reactivos y equipos.....	7
3.1.1. <i>Productos de la pesca (matrices de estudio)</i> .....	7
3.1.2. <i>Reactivos</i> .....	7
3.1.3. <i>Digestor</i> .....	7
3.2. Digestión in vitro gastrointestinal .....	8
3.3. Determinaciones analíticas .....	11
3.3.1. <i>Contenido en humedad y grasa en las matrices no digeridas</i> .....	11
3.3.2. <i>Degradación de la matriz</i> .....	12
3.3.3. <i>Determinación de la proteólisis</i> .....	12
3.3.4. <i>Determinación de ácidos grasos libres (AGL)</i> .....	12
3.3.5. <i>Microscopía óptica</i> .....	13
3.3.6. <i>Análisis estadístico</i> .....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1. Caracterización de los alimentos de pescado previamente a la digestión .....	14
4.2. Influencia de la dosis de suplemento enzimático Kreon® y de las condiciones de pH intestinal y concentración biliar sobre el Índice de Degradación de la Matriz (IDM).....	15
4.3. Influencia de la dosis de suplemento enzimático Kreon® y de las condiciones de pH intestinal y concentración biliar sobre la Extensión de la Proteólisis .....	18
4.4. Influencia de la dosis de suplemento enzimático Kreon® y de las condiciones de pH intestinal y concentración biliar sobre la Extensión de la Lipólisis .....	22
5. CONCLUSIONES .....	29
6. BIBLIOGRAFÍA .....	31

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3.1.</b>	Composición, volumen y concentración de los electrolitos requeridos en la preparación de las disoluciones stock simuladas.....	8
<b>Tabla 3.2.</b>	Composición de los fluidos simulados utilizados durante la digestión.....	8
<b>Tabla 3.3.</b>	Combinaciones unidades lipasa Kreon® (UL/ g grasa)-concentración Kreon® (mg/ mL)-pH intestinal-concentración biliar (mM) ensayadas en la digestión <i>in vitro</i> de los productos de la pesca.....	10
<b>Tabla 3.4.</b>	Concentración de Kreon® y su equivalencia según su actividad lipasa para los cuatro productos de la pesca.....	10
<b>Tabla 3.5.</b>	Concentración de Kreon® y su equivalencia según su actividad proteasa en cada uno de los productos de la pesca por separado.....	11
<b>Tabla 4.1.</b>	Contenido de humedad (%) y grasa (%) de cada uno de los alimentos de pescado después de ser cocinados (n=3).....	14
<b>Tabla 4.2.</b>	Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ( $p < 0,05$ ) en función el tipo de muestra (atún, salmón, merluza empanada, merluza) y de la concentración de Kreon® (mg/ mL) para la variable dependiente índice de degradación de la matriz (IDM (%)).....	17
<b>Tabla 4.3.</b>	Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ( $p < 0,05$ ) en función del tipo de muestra (atún, salmón, merluza empanada, merluza), el pH y la concentración biliar (mM) para la variable dependiente índice de degradación de la matriz (IDM (%)).....	17
<b>Tabla 4.4.</b>	Tabla resumen obtenida al realizar ANOVA unifactorial ( $p < 0,05$ ) en función del tipo de muestra (atún, salmón, merluza empanada, merluza) y concentración de Kreon® referida a su actividad proteasa (UP/ g proteína) para la variable dependiente mg equivalentes de BSA/ 100 g muestra.....	21
<b>Tabla 4.5.</b>	Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ( $p < 0,05$ ) en función del tipo de muestra (atún, salmón, merluza empanada, merluza), pH y concentración biliar (mM) para la variable dependiente mg equivalentes de BSA/ 100 g muestra.....	22
<b>Tabla 4.6.</b>	Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ( $p < 0,05$ ) para el tipo de muestra (atún, salmón, merluza empanada, merluza) y concentración de Kreon® (mg/ mL) para la variable dependiente extensión de la lipólisis (%). .....	24
<b>Tabla 4.7.</b>	Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ( $p < 0,05$ ) para el tipo de muestra (atún, salmón, merluza empanada, merluza), pH y concentración biliar (mM) para la variable dependiente extensión de la lipólisis (%). .....	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b>	Proceso de digestión y absorción de las grasas.....	2
<b>Figura 1.2.</b>	Esquema de la producción enzimática del páncreas de un individuo sano, frente a la producción enzimática de un individuo con insuficiencia pancreática exocrina.....	3
<b>Figura 3.1.</b>	Condiciones de las etapas implicadas en la digestión <i>in vitro</i> gastrointestinal.....	9
<b>Figura 4.1.</b>	Micrografías ópticas representativas de los glóbulos de grasa en los distintos alimentos de pescado.....	15
<b>Figura 4.2.</b>	Influencia de la concentración de Kreon® (mg/ mL) en el índice de degradación de la matriz (IDM (%)) después de la etapa intestinal, para los distintos tipos de muestra.....	16
<b>Figura 4.3.</b>	Influencia del pH y de la concentración biliar (mM) en el índice de degradación de la matriz (IDM (%)) de los alimentos digeridos al final de la digestión.....	17
<b>Figura 4.4.</b>	Extensión de la proteólisis (mg equivalentes de BSA/ 100 g muestra) tras la digestión gástrica de los cuatro alimentos de pescado en estudio.....	18
<b>Figura 4.5.</b>	Extensión de la proteólisis (mg equivalentes de BSA/ 100 g muestra) al final de la digestión de los alimentos de pescado en estudio en función de la dosis de Kreon® expresada en relación a su actividad proteasa (UP/ g proteína).....	19
<b>Figura 4.6.</b>	Influencia del pH (6-7) y la concentración biliar (1-10 mM) sobre la extensión de la proteólisis (mg eq BSA/ 100 g muestra) de los alimentos de pescado al final de la digestión.....	20
<b>Figura 4.7.</b>	Influencia de la concentración de Kreon® (mg/ mL) en la extensión de la lipólisis (%) después de la etapa intestinal.....	23
<b>Figura 4.8.</b>	Influencia del tipo de matriz, pH y concentración biliar (mM) en la extensión de la lipólisis.....	24
<b>Figura 4.9.</b>	Influencia de la concentración de Kreon® en las microestructuras de las emulsiones observadas a 20x en cada una de las matrices.....	26
<b>Figura4.10.</b>	Influencia del pH (6-7) y de la concentración biliar (1-10 mM) en la microestructura de las emulsiones, observadas a 20x, en cada una de las matrices.....	28

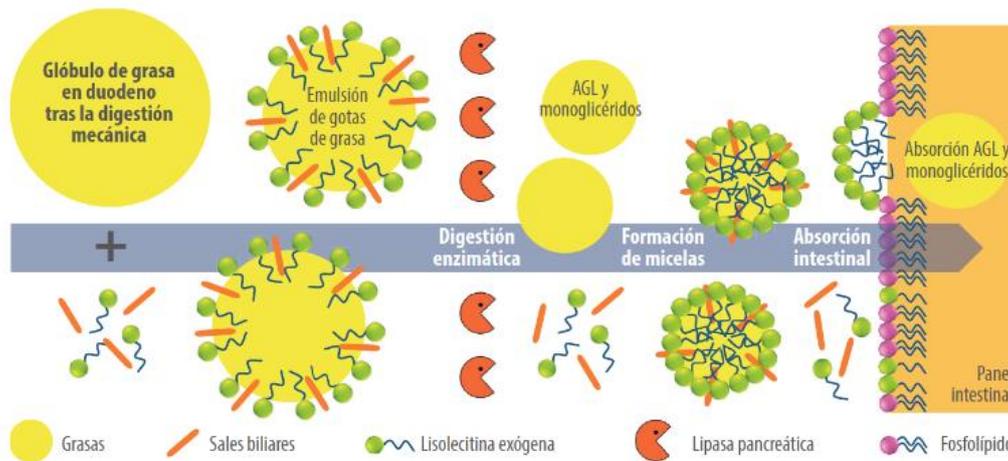
## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el consumo de productos de la pesca ha aumentado gradualmente en todo el mundo, en parte debido a sus efectos positivos sobre la salud. Los diversos efectos beneficiosos de estos productos se atribuyen a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-3, entre los que destacan dos ácidos grasos  $\omega$ -3: el ácido eicosapentaenoico (20:5 $\omega$ -3, EPA) y el docosahexaenoico (22:6 $\omega$ -3, DHA). Éstos son conocidos por presentar propiedades terapéuticas en la prevención de enfermedades relacionadas con el sistema cardiovascular, hipertensión, trastornos autoinmunes, y el desarrollo neuronal infantil. Los organismos marinos han sido identificados como los únicos alimentos que contienen de forma natural una gran cantidad de estos ácidos grasos, por lo que es indispensable incorporar su consumo en la dieta. El contenido total de EPA y DHA en los peces varía en función del tipo y de su hábitat. La proporción de AGPI n-3 en el músculo de pescado es más alta en los pescados grasos, como la caballa, el atún y el salmón, que en los pescados magros, como el bacalao, el abadejo y la merluza. Además de por su alto contenido en AGPI n-3, este producto también es muy apreciado por su abundancia en proteínas de alta calidad y otros nutrientes, tales como minerales (P, I, K), elementos traza y vitaminas (A, D). Las proteínas del pescado poseen excelentes puntuaciones de aminoácidos y características de digestibilidad. Éstas constituyen el 10-25 % y se pueden clasificar como proteínas de tipo sarcoplásmico, miobibrillar y estromal. Al igual que los AGPI n-3, la proteína del pescado en la dieta también tiene efectos beneficiosos, ya que tienen propiedades antihipertensivas, anti-obesidad y estimulantes de la fibrinólisis (Cohen et al., 2005; Hosomi et al., 2012). Los beneficios derivados de estos productos están relacionados con el contenido de estos nutrientes en el alimento así como con los cambios bioquímicos experimentados por los mismos durante el proceso digestivo y que pueden aumentar o disminuir su digestibilidad.

En los seres humanos, la digestión de grasas de la dieta (atribuible a la lipasa gástrica) comienza en el estómago, y se completa gracias a la acción de la lipasa pancreática en el intestino delgado, donde se produce la absorción final de los productos de digestión de los lípidos. El proceso de absorción normal requiere de la coordinación de muchas etapas que incluyen la administración controlada de nutrientes al intestino, la neutralización de los contenidos gástricos ácidos, y la secreción de enzimas pancreáticas y sales biliares que promueven la digestión y solubilización óptima de los productos digestivos, especialmente de los lípidos. Estos productos de la digestión, a continuación, precisan una suficiente área de superficie luminal intestinal para su absorción. Las sales biliares, producidas por el hígado a partir de los ácidos biliares conjugados con glicina o taurina, son secretadas por la vesícula biliar. Éstas, contribuyen a la emulsión de los lípidos favoreciendo la formación de micelas gracias a la acción detergente de la lecitina presente en la bilis. Dicha emulsificación reduce la tensión superficial de los glóbulos grasos, lo que favorece la actuación de las lipasas, facilitando así su absorción en forma micelar. Al formar

la emulsión, las sales biliares se combinan con fosfolípidos, asociando su lado hidrofóbico con los lípidos y su lado hidrofílico con el agua (**Figura 1.1**).

Normalmente, el tracto intestinal es capaz de procesar y absorber aproximadamente el 95 % de la grasa ingerida. El páncreas proporciona la mayor parte de la lipasa necesaria para la hidrólisis de los triglicéridos, así como bicarbonato para neutralizar el contenido gástrico ácido (Trang, 2014). Por ello, la función pancreática normal asegura una eficaz digestión y absorción de nutrientes.

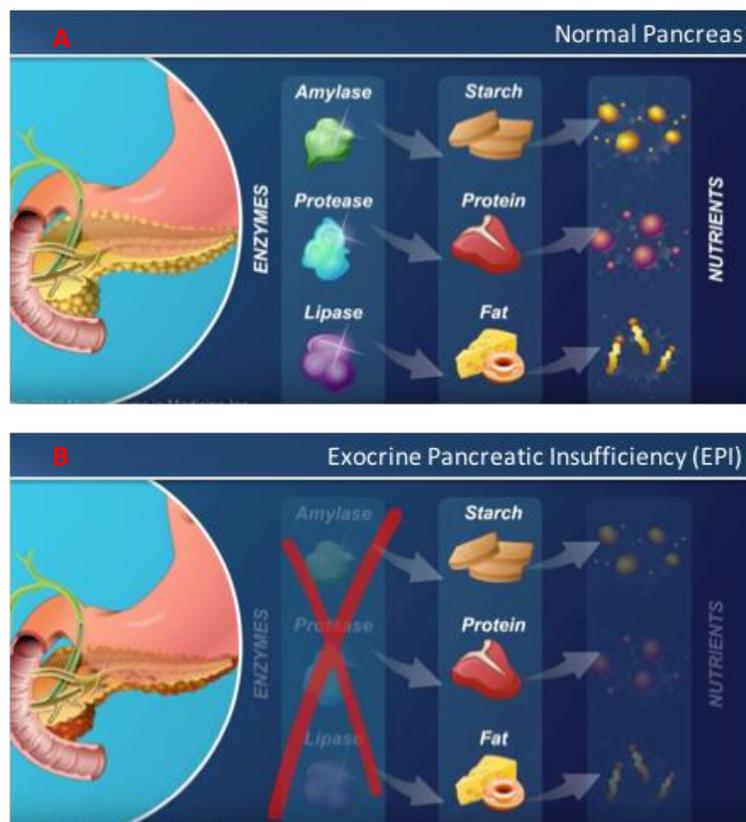


**Figura 1.1.** Proceso de digestión y absorción de las grasas (nutricionanimal info; <http://goo.gl/BY5GPJ>).

Sin embargo, cuando las secreciones del páncreas no mantienen la función normal, las enzimas pancreáticas pueden llegar a reducirse en más de un 90 %, derivando en lo que se conoce como insuficiencia pancreática exocrina (IPE). Las consecuencias de la IPE son la maldigestión y malabsorción de las grasas, lo que a su vez conlleva a un déficit en la absorción de vitaminas liposolubles (A, D, E y K), disminución de micronutrientes, y disminución de lipoproteínas circulantes. Además, pueden producirse otras alteraciones como deposiciones grasas (esteatorrea), dolor o molestias abdominales y pérdida de peso, que a su vez afectan la calidad de vida y, finalmente, dan lugar a la desnutrición (Griffiths, 2014).

Esta mala absorción de grasa precede a la mala absorción de proteínas y carbohidratos y es clínicamente más relevante (Sikkens et al., 2010). En IPE la secreción de bicarbonato por parte del páncreas disminuye considerablemente. Normalmente, el bicarbonato protege a las enzimas pancreáticas de la desnaturización por el ácido gástrico. Debido a la baja secreción de bicarbonato, el pH intraduodenal puede caer por debajo de 4 en la fase tardía postprandial, lo cual afecta negativamente a la actividad de la lipasa (**Figura 1.2**). Otro efecto de la disminución en la secreción de bicarbonato es que las sales biliares pueden precipitar conduciendo a una disminución en la solubilización duodenal postprandial de los lípidos (Sikkens et al., 2010). La

principal causa de insuficiencia pancreática es la pancreatitis crónica (PC), que consiste en un trastorno inflamatorio crónico caracterizado por la destrucción permanente y progresiva del páncreas (Fieker et al., 2011). La IPE puede ocurrir también debido a la pérdida de parénquima funcional (atrofia), obstrucción del conducto pancreático, o asincronía postprandial. Además de PC, otras condiciones que pueden resultar en la pérdida del parénquima son la pancreatitis aguda grave (que puede causar IPE transitoria), la resección pancreática y la fibrosis quística (FQ). La obstrucción crónica del conducto pancreático principal puede ser causada por estenosis o piedras ductales en PC, o por obstrucción debida a una malignidad. La asincronía postprandial es la separación entre el vaciado gástrico de una comida y la entrega de las enzimas pancreáticas en el intestino delgado, que puede ocurrir como resultado de la cirugía gástrica, síndrome de intestino corto, enfermedad de Crohn y diabetes mellitus. Otras causas de IPE incluyen, cáncer de páncreas, y el resultado postoperatorio que se da en el caso de operaciones donde se realiza gastrectomía (D'haese et al., 2014).



**Figura 1.2.** Esquema de la producción enzimática del páncreas de un individuo sano (A), frente a la producción enzimática de un individuo con insuficiencia pancreática exocrina (B). (THE NATIONAL PANCREAS FOUNDATION, 2014. <https://goo.gl/uHHHgY>).

La IPE es una de las alteraciones más frecuentes en los pacientes con fibrosis quística, enfermedad genética autosómica recesiva que presenta mutaciones en el gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana (CFTR). Las manifestaciones

fisiopatológicas afectan principalmente a los pulmones, aunque también se originan otras alteraciones negativas en la funcionalidad fisiológica de páncreas e hígado, así como la aparición de procesos de inflamación en el epitelio intestinal. La alteración del CFTR causa una disminución en la secreción de Cl<sup>-</sup>, agua y HCO<sup>-3</sup> con la consiguiente deshidratación de las secreciones pancreáticas y biliares causando la dilatación y la obstrucción de los conductos pancreático y biliar (Li y Somerset, 2014). Para aquellos pacientes con fibrosis quística, la insuficiencia pancreática es clínicamente aparente en el 85-90 % de los casos, siendo más común en niños (Ferrone et al., 2007; Fieker et al., 2011). Una de las prácticas clínicas más habituales para el tratamiento de la insuficiencia pancreática consiste en una terapia de suplementación enzimática (TSE) cuyo objetivo es minimizar la mala absorción de nutrientes, especialmente de los lípidos por ser los macronutrientes cuya absorción se encuentra más comprometida (Ferrone et al., 2007). Uno de los suplementos enzimáticos utilizados en la TSE, es la pancreatina comercial de uso hospitalario (Kreon®; Abbott Arzneimittel GmbH, Hannover, Alemania) que contiene enzimas pancreáticas con actividad lipolítica, proteolítica y amilolítica y se presenta en forma de minimicroesferas gastroresistentes. La acción de la pancreatina tiene lugar en el intestino delgado, concretamente en el duodeno, donde libera las enzimas digestivas activas (D'haese et al., 2014). Actualmente, las estimaciones de la cantidad lipasa requerida para prevenir esteatorrea, se determinan basándose en resultados obtenidos de ensayos clínicos (Trang, 2014), donde se ha determinado que la dosis requerida está ligada al contenido lipídico de los alimentos y al peso (kg) corporal. Sin embargo, se ha demostrado que la TSE no permite conseguir niveles de digestión de grasa satisfactorios debido a que no se dispone de un método para ajustar la dosis de suplemento enzimático más allá del contenido en grasa del alimento, existiendo otros factores intrínsecos del mismo como su naturaleza matricial, origen y tipo de la grasa, que son determinantes en la efectividad del tratamiento ya que podrían afectar la accesibilidad por parte de la lipasa pancreática a la grasa (Fieker et al., 2011). Del mismo modo, las condiciones del entorno duodenal, como el pH o la concentración biliar, considerados factores extrínsecos al alimento, también podrían afectar a la digestibilidad de los nutrientes del mismo. Así, en los pacientes adscritos a las TSE, siguen presentes las deficiencias en la digestión de alimentos y absorción de nutrientes que no sólo conducen al empeoramiento del estado nutricional, sino que también provocan manifestaciones marginales ocasionando dolor abdominal y esteatorrea. (Ferrone et al., 2007; Mun et al., 2007). Por tanto, en este escenario actual, el evaluar la influencia de la naturaleza matricial del alimento, es uno de los principales factores a tener en cuenta para la determinación de la digestibilidad tanto de lípidos como de proteínas.

Debido a las dificultades técnicas y económicas a la hora de emplear estudios de digestión *in vivo*, los modelos de digestión *in vitro* resultan una alternativa comúnmente utilizada para estudiar el comportamiento gastrointestinal de los alimentos o los productos farmacéuticos. La digestibilidad *in vitro* se ha convertido en una valiosa herramienta de investigación en el estudio de la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de nutrientes (Nieva-Echevarría et al., 2016). Este

modelo presenta varias ventajas frente al modelo *in vivo* ya que son más rápidos, baratos, reproducibles, menos laboriosos y no tienen restricciones éticas (Guerra et al., 2012; Minekus et al., 2014). Existen dos categorías principales de modelos de digestión *in vitro*: estático y dinámico. La mayoría de modelos *in vitro* se consideran estáticos cuando el pH y el volumen se mantienen constantes. Si bien estos modelos, son incapaces de simular adecuadamente las condiciones fisiológicas dinámicas que el alimento encontraría a lo largo del tracto gastrointestinal humano, han sido ampliamente utilizados para examinar la desintegración de alimentos y la liberación de nutrientes esenciales de la matriz alimentaria (Tran Do et al., 2016).

En el presente trabajo se utilizó un método estático de digestión *in vitro* para estudiar la eficacia de un suplemento enzimático de pancreatina (Kreon®), en la digestibilidad de las grasas y proteínas de distintas matrices de la pesca, y en condiciones intestinales (pH y concentración biliar) variables.

## 2. OBJETIVOS

Actualmente la terapia de suplementación enzimática es una de las más habituales para el tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina. Sin embargo, los criterios aplicados para establecer la dosificación se basan en el peso y edad del paciente sin tener en cuenta los diferentes aspectos relacionados con el alimento y/o el proceso digestivo, y que pueden afectar a la digestibilidad de los macronutrientes a lo largo del mismo.

En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar la eficacia del suplemento enzimático de pancreatina Kreon® (1000-4000 Unidades lipasa/ g de grasa del alimento), en condiciones gastrointestinales simuladas de pacientes sanos y con insuficiencia pancreática. Para ello se utilizará un método estático de digestión *in vitro* que permita analizar la influencia de la matriz alimentaria, así como el pH (6 y 7) y la concentración biliar (1 y 10 mM) en la digestibilidad de las grasas y proteínas procedentes de varios alimentos de la pesca (atún en aceite, salmón, merluza y merluza empanada).

Este objetivo general se ha desglosado en los objetivos específicos:

1. **Caracterizar los alimentos de la pesca** objeto de estudio en base a su contenido en humedad y grasa previamente al proceso digestivo.
2. Determinar el **nivel de degradación de las matrices** de estudio al final de la digestión y en las diferentes condiciones ensayadas de dosificación del suplemento enzimático, pH intestinal y concentración de sales biliares.
3. Evaluar la influencia de la matriz alimento, pH intestinal y concentración biliar sobre la eficiencia del suplemento enzimático de pancreatina Kreon® en llevar a cabo la **hidrólisis de las proteínas** utilizando para ello un método espectrofotométrico.
4. Evaluar la influencia de la matriz alimento, pH intestinal y concentración biliar sobre la eficiencia del suplemento enzimático de pancreatina Kreon® en llevar a cabo la **hidrólisis de los lípidos** utilizando para ello un kit enzimático espectrofotométrico.
5. Realizar un análisis microestructural por microscopía óptica con el fin de apoyar los resultados obtenidos y entender mejor la influencia de los diferentes parámetros estudiados sobre la lipólisis alcanzada por el suplemento enzimático Kreon® en los diferentes productos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Matrices de estudio, reactivos y equipos

##### 3.1.1. Productos de la pesca (matrices de estudio)

Los productos de la pesca utilizados en este estudio fueron: atún claro en aceite de girasol, filetes de salmón, porciones de merluza del cabo supercongeladas (Mascato) y merluza empanada (Pescanova). Todos ellos adquiridos en comercios locales de Valencia, España. Se escogieron estos en concreto porque son muy consumidos por la población infantil. También se tuvo en cuenta que el salmón y el atún en lata contienen un mayor porcentaje de grasa con respecto a ambas merluzas y que, además, existen diferencias en cuanto al tratamiento de dichos alimentos. Tanto las porciones de merluza como los filetes de salmón se cocinaron en el microondas a una potencia de 600 W durante 3 y 4 minutos, respectivamente. Por otro lado, la merluza empanada se cocinó en el horno durante 15 minutos a 220 °C, tal y como se indica en el etiquetado. El atún no requirió tratamiento térmico antes de la digestión.

##### 3.1.2. Reactivos

Para llevar a cabo la simulación *in vitro* gastrointestinal, se empleó pepsina procedente de mucosa gástrica porcina (P6887, Sigma-Aldrich) y pancreatina porcina comercial de uso hospitalario (Kreon® Abbott), ésta última disponible en cápsulas de 10.000 unidades lipasa (U)/cápsula. Cada cápsula contiene 150 mg de pancreatina porcina en forma de minimicroesferas gastrorresistentes, equivalentes a: 10.000 U. Ph. Eur. lipasa, 8.000 U. Ph. Eur. amilasa, 600 U. Ph. Eur. proteasa. Además, durante la etapa intestinal de la digestión, se hizo uso de bilis bovina (B3883, Sigma-Aldrich). Los reactivos utilizados, NaOH 1 N y HCl 1 N, se adquirieron de *AppliChem Panreac*.

Durante 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)<sub>6</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y CaCl<sub>2</sub> (0,3 M). Todos ellos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

En las determinaciones analíticas posteriores a la digestión, se utilizó Triton X-100, éter de petróleo, ácido tricloroacético (TCA), ácido palmítico y albúmina sérica bovina (BSA) obtenidos de Sigma-Aldrich, además de Urea cristalina para análisis (ACS) adquirida de *AppliChem Panreac* y etanol (96 %) obtenido de labkem.

##### 3.1.3. Digestor

El equipo utilizado para el desarrollo de la digestión *in vitro*, consistió en una cámara termostática a 37 °C (SELECTA® modelo Boxcult 3000957) con agitadores en su interior (agitación circular arriba-abajo) (agitador modelo Intelli – Mixer RM-2) trabajando a 55 rpm con el fin de simular los movimientos peristálticos que tienen lugar en el estómago y en el intestino delgado durante la digestión.

### 3.2. Digestión *in vitro* gastrointestinal

Se empleó un modelo estático de digestión *in vitro* gastrointestinal que simula las etapas oral, gástrica e intestinal de acuerdo a las condiciones establecidas en el protocolo consensuado a nivel europeo por la ACTIONCOST INFOGEST y publicado por Minekus et al. (2014). Para llevar a cabo la simulación fue necesaria la preparación de las disoluciones stocks simuladas de cada etapa (salival (SSS), gástrica (SGS) e intestinal (SIS) (**Tabla 3.1**) y a partir de estas se prepararon los fluidos simulados gástrico (FSG) e intestinal (FIS) adicionando los componentes fisiológicos propios de cada etapa (enzimas y sales biliares) (**Tabla 3.2**). Las disoluciones stock se prepararon semanalmente mientras que los fluidos requirieron de preparado diario para cada digestión.

**Tabla 3.1.** Composición, volumen y concentración de los electrolitos requeridos en la preparación de las disoluciones stock simuladas. Volumen de cada constituyente para preparar 1 L de disolución stock: salival (SSS), gástrica (SGS) e intestinal (SIS).

DISOLUCIONES STOCK SIMULADAS						
Constituyente	Salival (SSS)		Gástrico (SGS)		Intestinal (SIS)	
	Volumen (mL)	Concentración (mmol /L)	Volumen (mL)	Concentración (mmol/ L)	Volumen (mL)	Concentración (mmol/ L)
KCl	30,2	15,1	13,8	6,9	13,6	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,4	3,7	1,8	0,9	1,6	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	-	-	25	25	95	85
NaCl	6,8	13,6	23,6	47,2	18,3	38,4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	1	0,15	0,8	0,1	2,2	0,33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,12	0,06	1	0,5	-	-
<b>Volumen total sales</b>	52,32		66		121,6	
<b>Volumen agua destilada</b>	947,68		934		878,4	
<b>Volumen disolución stock</b>	1000		1000		1000	

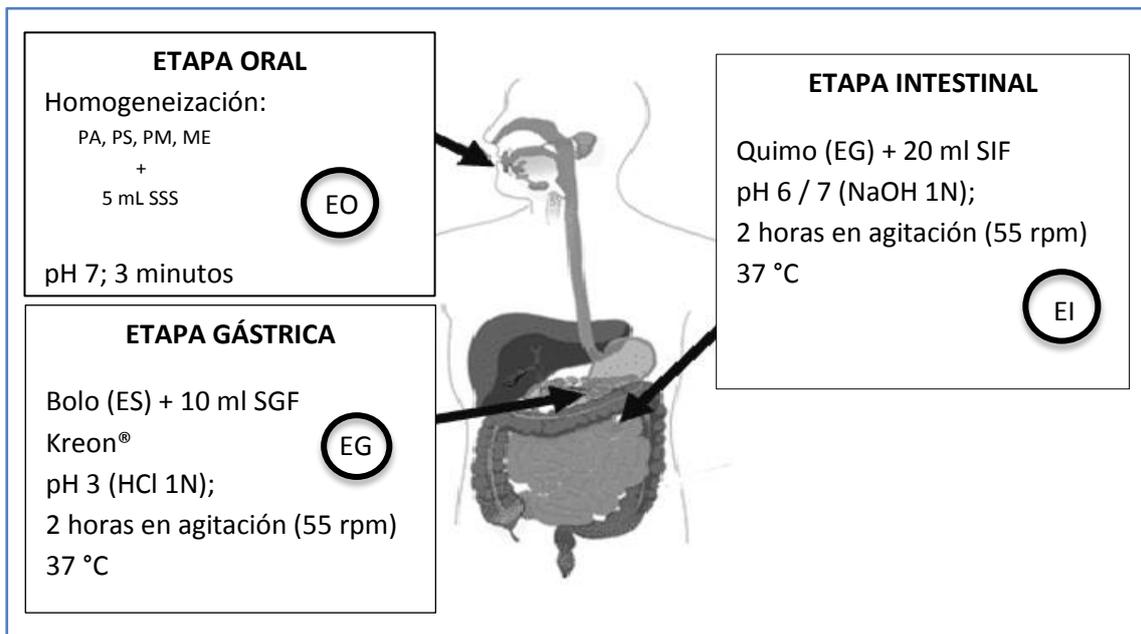
**Tabla 3.2.** Composición de los fluidos simulados utilizados durante la digestión. Volumen calculado para un volumen final de 500 mL en cada fluido simulado: gástrico (FSG) e intestinal (FIS).

Constituyente	FLUIDOS GASTROINTESTINALES SIMULADOS*	
	Gástrico (FSG)	Intestinal (FIS)
SGS	375 mL	-
SIS	-	452,083 mL
Pepsina porcina	41,86 mg	-
CaCl <sub>2</sub>	0,25 mL	0,833 mL
Bilis	-	439,833 mg **
<b>Volumen final de fluido simulado</b>	<b>500 mL</b>	<b>500 mL</b>

\*El pH de ambos fluidos se ajustó a 3, 6 ó 7 dependiendo de la etapa y del tratamiento en estudio con HCl (1 N) o NaOH (1 N) y se enrasó con agua destilada a 500 mL.

\*\*La masa de la bilis corresponde a una concentración final de 1 mM.

Una vez preparados, se procedió al desarrollo del proceso de digestión *in vitro* (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1.** Condiciones de las etapas implicadas en la digestión *in vitro* gastrointestinal: EO (etapa oral), EG (etapa gástrica) y EI (etapa intestinal).

Las condiciones de las etapas oral y gástrica fueron similares en todos los ensayos. En cambio, las condiciones fisiológicas de la etapa intestinal (pH intestinal y concentración biliar) fueron variables con el fin de evaluar el efecto de las mismas en la digestibilidad de las proteínas y grasas. Así, el diseño experimental comprendió un total de 8 ensayos recogidos en la **tabla 3.3**. En 5 de ellos, se varió la dosis de Kreon® (0, 1000, 2000, 3000 y 4000 UL/ g grasa) manteniéndose constante tanto el pH (pH 6) como la concentración biliar (1 mM), considerando que son éstas las condiciones fisiológicas de un sujeto con insuficiencia pancreática (Aseeri et al., 2012; Gelfond et al., 2012). En los 3 ensayos restantes, se varió tanto el pH (pH 6 ó 7) como la concentración biliar (1 ó 10 mM) manteniendo constante la dosis de Kreon® (2000 UL/ g grasa), siendo pH 7 y 10 mM las condiciones fisiológicas propias de un sujeto sano (Gelfond et al., 2012; Minekus et al., 2014).

**Tabla 3.3.** Combinaciones unidades lipasa Kreon® (UL/ g grasa)-concentración Kreon® (mg/ mL)-pH intestinal-concentración biliar (mM) ensayadas en la digestión *in vitro* de los productos de la pesca.

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

\*La concentración de enzima se calculó considerando un volumen final aproximado de 37,5 L añadido a cada tubo de digestión.

**Etapas oral.** Previamente a la digestión, se estimó la cantidad de matriz alimento necesaria para digerir 0,35 g de grasa en cada tubo, siendo diferente la cantidad de proteína según el alimento en estudio. Seguidamente esta cantidad fue homogeneizada junto con 5 mL de la disolución stock salival simulada (SSS), haciendo uso de una batidora doméstica (Ufesa, Vario Mixer, 600 W). La mezcla se homogeneizó durante 3 minutos dando lugar al emulado bolo alimenticio. La cantidad de alimento varió entre 1,5-4 g. No se consideró necesaria la adición de  $\alpha$ -amilasa a la SSS por tratarse de matrices con bajo contenido en carbohidratos y ser objeto de estudio únicamente la lipólisis y proteólisis.

**Etapas gástrica.** A continuación, se adicionaron 10 mL del fluido gástrico simulado (FGS) al bolo alimenticio resultante de la etapa oral. Seguidamente se adicionó la cantidad de Kreon® correspondiente en función del diseño experimental (**Tablas 3.4 y 3.5**) y se ajustó el pH a 3 mediante la adición de HCl (1 N) y la ayuda de un pH-metro (Seven Compact™ S210, Mettler Toledo). Finalmente, se introdujeron los tubos en la cámara termostática a 37 °C, donde permanecieron durante 120 minutos en agitación continuada de arriba-abajo a 55 rpm.

**Tabla 3.4.** Concentración de Kreon® y su equivalencia según su actividad lipasa para los cuatro productos de la pesca.

[Kreon®] (mg/ mL)	Lipasa	
	UL/ g grasa	UL/ mL
0,24	1000	9,33
0,49	2000	18,67
0,72	3000	28
0,96	4000	37,33

**Tabla 3.5.** Concentración de Kreon® y su equivalencia según su actividad proteasa en cada uno de los productos de la pesca por separado.

[Kreon®] (mg/ mL)	Proteasa							
	Atún		Salmón		Merluza empanda		Merluza	
	UP/ g proteína	UP/ mL						
<b>0,24</b>	36,23	0,96	40,09	1,07	53,58	1,43	26,51	0,70
<b>0,49</b>	72,46	1,93	80,19	2,14	107,16	2,85	53,03	1,41
<b>0,72</b>	108,69	2,89	120,28	3,21	160,74	4,28	79,54	2,12
<b>0,96</b>	144,92	3,86	160,38	4,27	214,33	5,71	106,06	2,82

**Etapas intestinal.** Una vez finalizada la etapa gástrica, el quimo gástrico se mezcló con 20 mL de fluido intestinal simulado (FIS), previamente preparado con SIS. La cantidad de sales biliares en el FIS se calculó para obtener una concentración final en el intestino de 1 mM ó 10 mM. El pH se ajustó a 6 o 7 en función del diseño experimental, mediante NaOH (1N). La duración de esta etapa también fue de 120 minutos (37 °C) con agitación constante arriba-abajo. Se controló el pH cada 30 minutos, reajustándose en el caso necesario, con tal de mantener los valores adecuados.

Una vez terminada la etapa intestinal, los tubos se incubaron en frío durante 10 minutos y se aumentó el pH a 9 añadiendo NaOH (1 N) para inactivar la actividad de la lipasa. Seguidamente se procedió a centrifugar las muestras a 1200 rcf durante 15 minutos. El sobrenadante (fase micelar, FM) y el pellet (fase sólida, FS) se separaron mediante el uso de un tamiz (1 mm de diámetro). La fase micelar fue utilizada para los análisis de microscopía, así como de la extensión de la lipólisis y la proteólisis; la fase sólida se utilizó para estimar la degradación de la matriz.

### 3.3. Determinaciones analíticas

#### 3.3.1. Contenido en humedad y grasa en las matrices no digeridas

El contenido en humedad de las matrices de estudio sin digerir se determinó gravimétricamente según el método oficial de la "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC, 2000). Para ello, se depositó aproximadamente 1 g de alimento sin digerir, se disgregó con ayuda de arena de mar y una varilla de vidrio, y el conjunto se colocó en una estufa a vacío a 60 °C hasta alcanzar peso constante. El contenido en humedad se calculó de acuerdo a la variación de masa experimentada por la muestra antes y después del secado en estufa. Por otro lado, se determinó el contenido en grasa por el método Soxhlet. Las muestras previamente liofilizadas (2 g, -45 °C, 1·10<sup>-2</sup> bar, modelo Telstar Lyoalfa-6) se sometieron a una extracción con éter de petróleo, obteniéndose directamente el porcentaje de grasa en la muestra.

### **3.3.2. Degradación de la matriz**

La degradación de la matriz se determinó después de la etapa intestinal en base al protocolo propuesto por Lamothe et al. (2014). Tras la centrifugación de las muestras digeridas, se procedió a determinar la degradación de la matriz en la fracción sólida o pellet. Para ello, las fases sólidas resultantes de las distintas digestiones, se incubaron en estufa de vacío a 60 °C durante 48 horas. El índice de degradación de la matriz (IDM) se calculó de acuerdo a la **ecuación 1**:

$$IDM(\%) = 100 \cdot \frac{m_i \cdot x_i^{st} - m_f \cdot x_f^{st}}{m_i \cdot x_i^{st}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde  $m_i$  es la masa del alimento antes de la digestión,  $x_i^{st}$  es la fracción de sólidos totales de la muestra inicial antes de la digestión y  $m_f \cdot x_f^{st}$  la masa de sólidos totales de la matriz sólida después de la digestión.

### **3.3.3. Determinación de la proteólisis**

La hidrólisis proteica dada en la etapa gástrica e intestinal de la digestión, se determinó en base al protocolo establecido por Lamothe et al., 2014, midiendo la parte soluble de las proteínas en ácido tricloroacético (TCA). Para ello, el TCA se añadió a las muestras digeridas en una concentración final del 12 % p/p, se homogenizó correctamente y se dejó 15 minutos en reposo. Transcurrido este tiempo, las muestras se filtraron a vacío con papel de filtro *Whatman* no. 41 y con ayuda de un embudo *Buchman*. El filtrado, se recogió, puesto que la fracción soluble en el 12 % de TCA está compuesta de pequeños péptidos y residuos de aminoácidos. Para la realización de la medida espectrofotométrica, fue necesario diluir el filtrado (1:50) con un tampón (50 mM EDTA, 8 M urea, pH 10) y a continuación se midieron las absorbancias a 280 nm en cubetas de cuarzo mediante un espectrofotómetro (Beckman Coulter) utilizando al propio tampón como blanco. Los cálculos se efectuaron mediante la curva de calibrado obtenida a partir de BSA y los resultados se expresaron como los mg equivalentes de BSA por 100 g de muestra.

### **3.3.4. Determinación de ácidos grasos libres (AGL)**

Las fases micelares (FM) de las muestras digeridas (100 µL) se diluyeron en una disolución acuosa (5,6 % Triton X-100 y 6 % etanol). Dicha disolución es necesaria para solubilizar a los AGL y para detener la actividad lipasa (Lamothe et al., 2014). Los AGL liberados durante la reacción se midieron utilizando un kit de ensayo enzimático (Roche Diagnostics) determinando la absorbancia a 546 nm mediante un espectrofotómetro UV/Vis (Beckman Coulter). La cuantificación de los AGL se realizó en base a la recta de calibrado obtenida con un estándar de ácido palmítico. El resultado se expresó como extensión de la lipólisis (g de grasa / 100 g grasa inicial) teniendo en cuenta que cada dos moles de ácidos grasos libres corresponden a un triglicérido (Marze et al., 2013).

### ***3.3.5. Microscopía óptica***

Mediante examen microscópico se constató la presencia de grasa no digerida antes y después de la digestión. Para ello, se recogieron las fases micelares de las muestras digeridas (400  $\mu\text{L}$ ) y se depositaron en tubos eppendorf para su posterior estudio. Las muestras no digeridas se centrifugaron a 3000 rfc durante 15 minutos para finalmente recoger el sobrenadante (400  $\mu\text{L}$ ). Las FM obtenidas antes y después de la digestión se mezclaron con una disolución de Red Oil (5 % en isopropanol) en una proporción 4:1 (v/v), se vorteoó durante 10 segundos y se incubó durante 10 minutos a 37 °C. Seguidamente, se tomó una gota de la mezcla y se colocó en un portaobjetos, para su observación en microscopio óptico Leica DM 5000 B. Las imágenes se adquirieron con una cámara (Leica, DFC550) mediante el software de adquisición de imágenes LAS (Leica Application Suite).

### ***3.3.6. Análisis estadístico***

Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media y la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con el programa “Statgraphics Centurion XVI” y con un nivel de confianza del 95 % ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

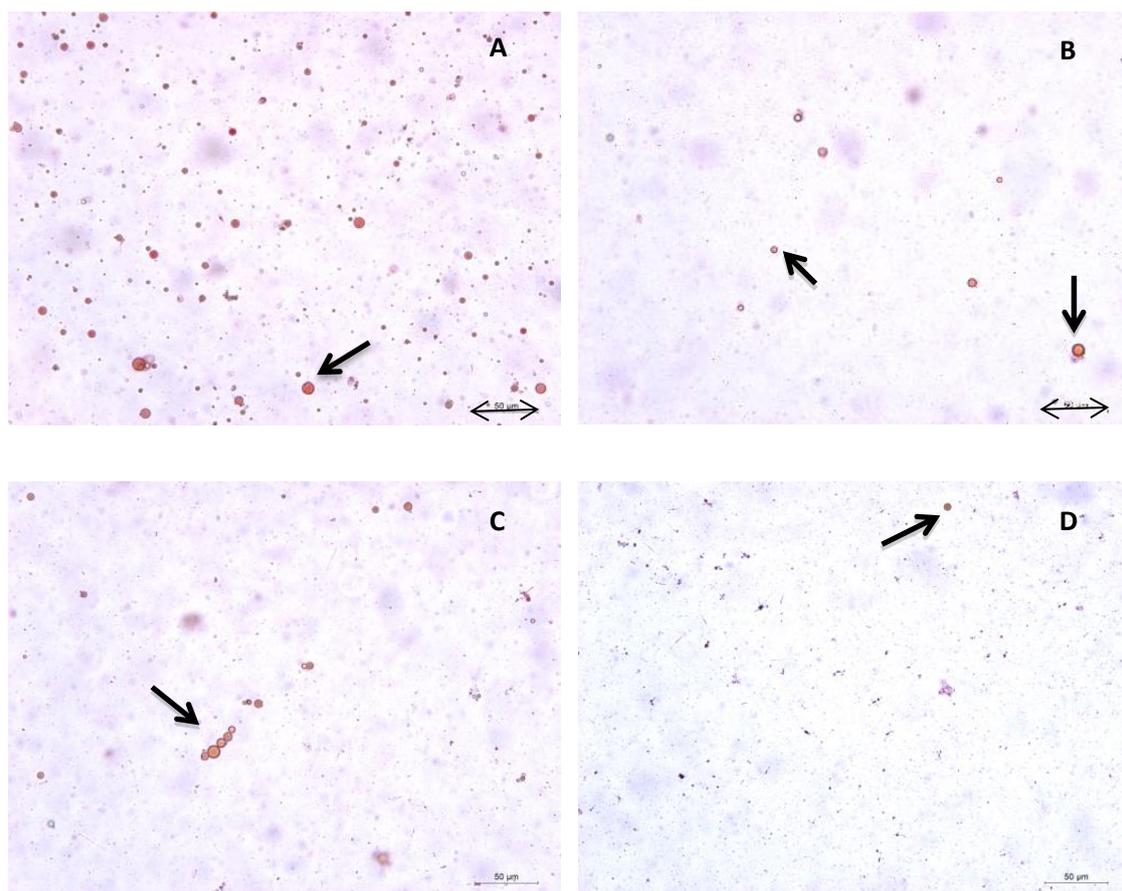
### 4.1. Caracterización de los alimentos de pescado previamente a la digestión

La **tabla 4.1** recoge el contenido en humedad y grasa (%) de los distintos alimentos de pescado tras el cocinado y previamente a la digestión. Estos resultados son coherentes con los indicados en las etiquetas de los distintos productos, así como los reportados por otros autores para matrices similares (Ackman, 1990; Huynh y Kitts, 2009). Tal y como cabía esperar, el salmón fue el que presentó un mayor contenido en grasa, mientras que el atún presentó un contenido algo menor, debido fundamentalmente al aceite de origen vegetal que se incorpora en el envase y que impregna el producto. Finalmente, tanto la merluza fresca como la merluza empanada presentaron el menor contenido en grasa, siendo este contenido algo mayor en la merluza empanada debido a la grasa que incorpora el rebozado.

**Tabla 4.1.** Contenido de humedad (%) y grasa (%) de cada uno de los alimentos de pescado después de ser cocinados (n=3).

Alimento	Humedad (%)	Grasa (%)
Atún en aceite	64,6 ± 0,7	9,5 ± 0,4
Salmón	43,9 ± 1,8	13,0 ± 7,3
Merluza empanada	37,9 ± 2,3	6,7 ± 0,4
Merluza	79,7 ± 0,7	1,8 ± 1,2

Estas diferencias en cuanto a la grasa de las distintas matrices se observan asimismo en las imágenes obtenidas mediante microscopia óptica (**Figura 4.1**). Teniendo en cuenta que el atún natural presenta un contenido graso mucho menor que el atún en aceite (< 1 %) (García-Arias et al., 1994), los glóbulos grasos que se observan en las micrografías son mayoritariamente provenientes del aceite que este producto lleva incorporado. Por ello, en este caso, puesto que la grasa es externa a la propia matriz, los glóbulos grasos se aprecian mejor (más disponibles) que en el resto de matrices. En el caso del salmón (**Figura 4.1 (B)**), se observaron glóbulos dispersos y de tamaño homogéneos. En la merluza empanada (**Figura 4.1 (C)**), y dado que también en este caso la grasa procede de la fracción de empanado, se observó también un elevado número de glóbulos grasos de tamaño variable. Sin embargo, en este caso, al estar formando parte de la matriz del rebozado los glóbulos grasos no se observan con tanta claridad como ocurre con el aceite del atún. En el caso de la merluza sin empanar, con menor contenido graso (1,8 %), los glóbulos grasos son escasos y de muy pequeño tamaño (**Figura 4.1 (D)**).

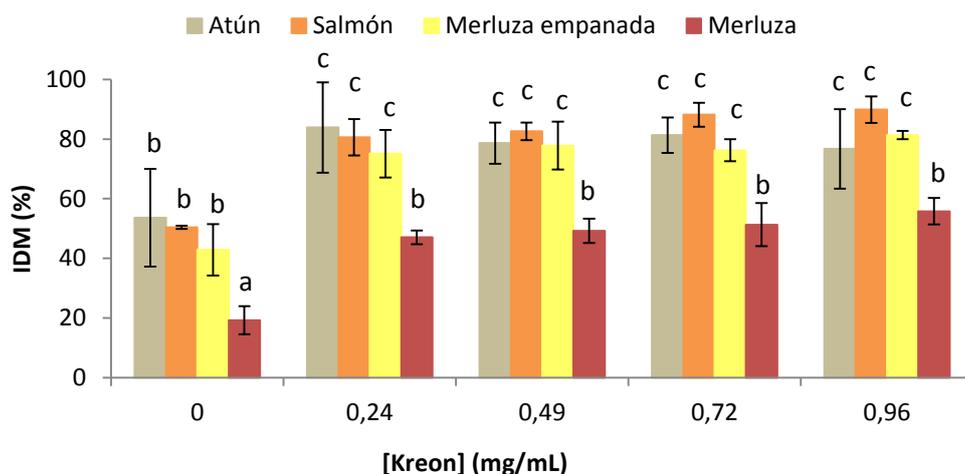


**Figura 4.1.** Micrografías ópticas representativas de los glóbulos de grasa (en rojo) en los distintos alimentos de pescado: atún en aceite (A), salmón (B), merluza empanada (C) y merluza (D). Se han obtenido previamente al proceso de digestión a una magnificación de 20x. La distancia entre las barras horizontales es de 50  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2. Influencia de la dosis de suplemento enzimático Kreon® y de las condiciones de pH intestinal y concentración biliar sobre el Índice de Degradación de la Matriz (IDM)**

Durante la digestión gastrointestinal, la estructura matricial de los alimentos sólidos sufre una degradación o desintegración gradual que contribuye a la liberación de los macro y micronutrientes al medio constituido por los fluidos digestivos. En la **figura 4.2** se ha representado el índice de degradación de la matriz (IDM %) al final de la digestión *in vitro* de cada una de las matrices estudiadas (atún, salmón, merluza empanada y merluza) en función de la concentración de Kreon® utilizado en la simulación del proceso de digestión intestinal a pH 6 y concentración biliar 1 mM, mientras que la **figura 4.3** muestra la influencia del pH intestinal (6 y 7) y concentración biliar (1 y 10 mM) sobre este mismo parámetro, para una concentración fija de Kreon® de 0,49 mg/ mL. La presencia del suplemento enzimático incrementa de manera significativa la degradación de la matriz probablemente como consecuencia de la actividad proteolítica del mismo, si bien este incremento fue independiente de la concentración. Se observa que a excepción de la merluza, en todos los casos se obtuvieron niveles de degradación

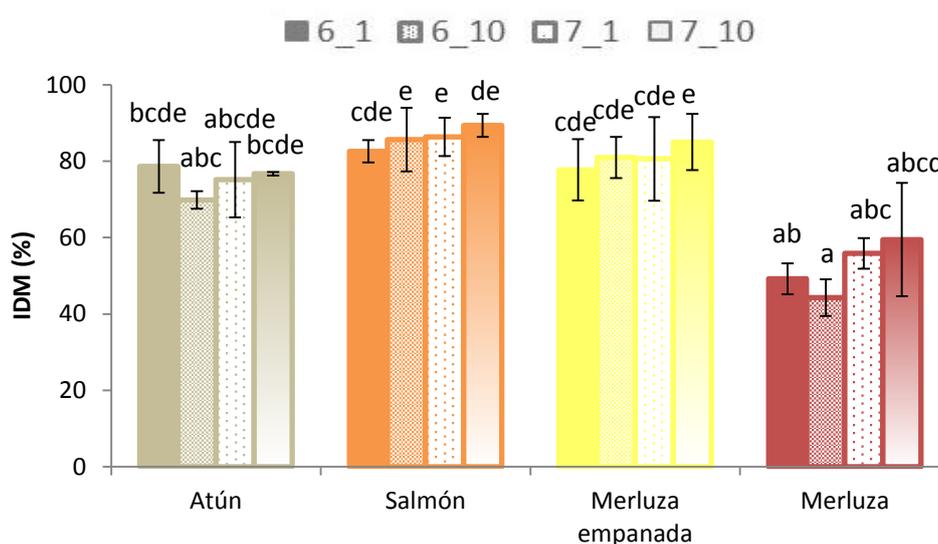
en torno al 80 %, indicando por tanto, propiedades de digestibilidad significativamente diferentes para la merluza en comparación al resto de productos evaluados. Todo ello apoyado por el análisis estadístico recogido en la **tabla 4.2**, donde se indica que tanto la muestra como la concentración de Kreon® influyen significativamente sobre el índice de degradación. Las diferencias entre la merluza empanada y la merluza sin empanar, pueden deberse a que la primera se elabora con pastas de pescado que han sufrido un drástico proceso de desestructuración. Este hecho contribuirá a una estructura más disgregada y accesible, que facilitará la posterior acción enzimática durante la digestión. El salmón y la merluza en cambio, conservaban su estructura original antes del proceso de digestión, si bien la merluza se compró congelada, mientras que el salmón se almacenó en refrigeración. Tanto el procesado, como el almacenamiento podrían contribuir a cambios estructurales, que a su vez influirían en la degradación de la matriz, que vendrá determinada tanto por el grado de proteólisis como por el de lipólisis. En la **figura 4.3** se observa que en cuanto a la influencia del pH intestinal y de la concentración de sales biliares, únicamente el incremento de pH favoreció significativamente la degradación matricial de la merluza sin empanar (**Tabla 4.3**).



**Figura 4.2.** Influencia de la concentración de Kreon® (mg/ mL) en el índice de degradación de la matriz (IDM (%)) después de la etapa intestinal, para los distintos tipos de muestra (atún, salmón, merluza empanada, merluza). Las letras minúsculas corresponden a los grupos homogéneos obtenidos mediante el análisis estadístico de la varianza ANOVA. Barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3).

**Tabla 4.2.** Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) en función el tipo de muestra (atún, salmón, merluza empanada, merluza) y de la concentración de Kreon® (mg/ mL) para la variable dependiente índice de degradación de la matriz (IDM (%)). Las condiciones duodenales corresponden a pH 6 y concentración biliar 1 mM.

EFFECTOS PRINCIPALES	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>A: Muestra</b>	6648,57	3	2216,19	39,84	0,0000*
<b>B: mg Kreon/ mL</b>	6944,72	4	1736,18	31,21	0,0000*
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	296,824	12	24,7354	0,44	0,9281



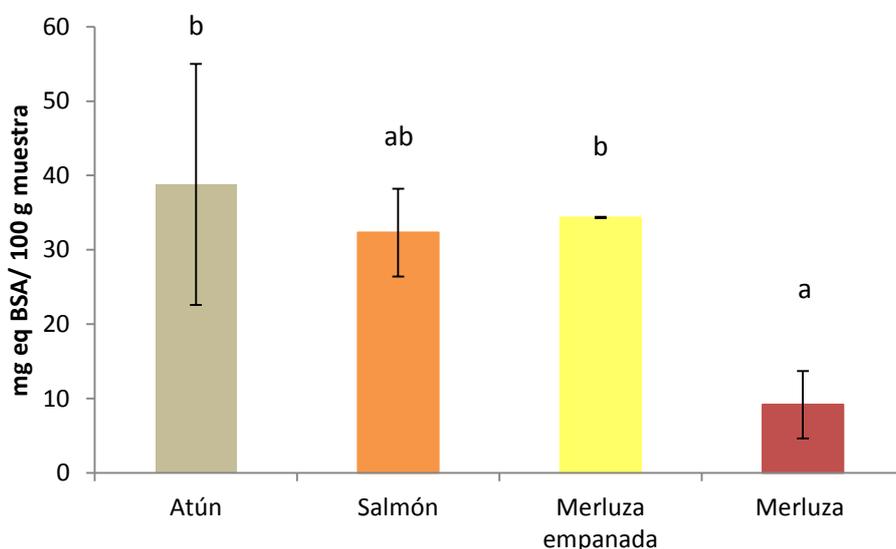
**Figura. 4.3.** Influencia del pH y de la concentración biliar (mM) en el índice de degradación de la matriz (IDM (%)) de los alimentos digeridos al final de la digestión. La dosis de Kreon® se mantiene constante en todas las condiciones duodenales (0,49 mg Kreon® / mL). Las letras minúsculas corresponden a los grupos homogéneos obtenidos tras el análisis estadístico de la varianza ANOVA. Encima de las barras están representadas las desviaciones estándares (n=3). Código de la leyenda: pH\_concentración biliar.

**Tabla 4.3.** Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) en función del tipo de muestra (atún, salmón, merluza empanada, merluza), el pH y la concentración biliar (mM) para la variable dependiente índice de degradación de la matriz (IDM (%)). La concentración de Kreon® se mantiene constante (0,49 mg/ mL).

EFFECTOS PRINCIPALES	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>A: Muestra</b>	5332,71	3	1777,57	12,19	0,0001*
<b>B: pH</b>	232,805	1	232,805	1,60	0,2209
<b>C: [Biliar] (mM)</b>	0,595387	1	0,595387	0,00	0,9497

### 4.3. Influencia de la dosis de suplemento enzimático Kreon® y de las condiciones de pH intestinal y concentración biliar sobre la Extensión de la Proteólisis

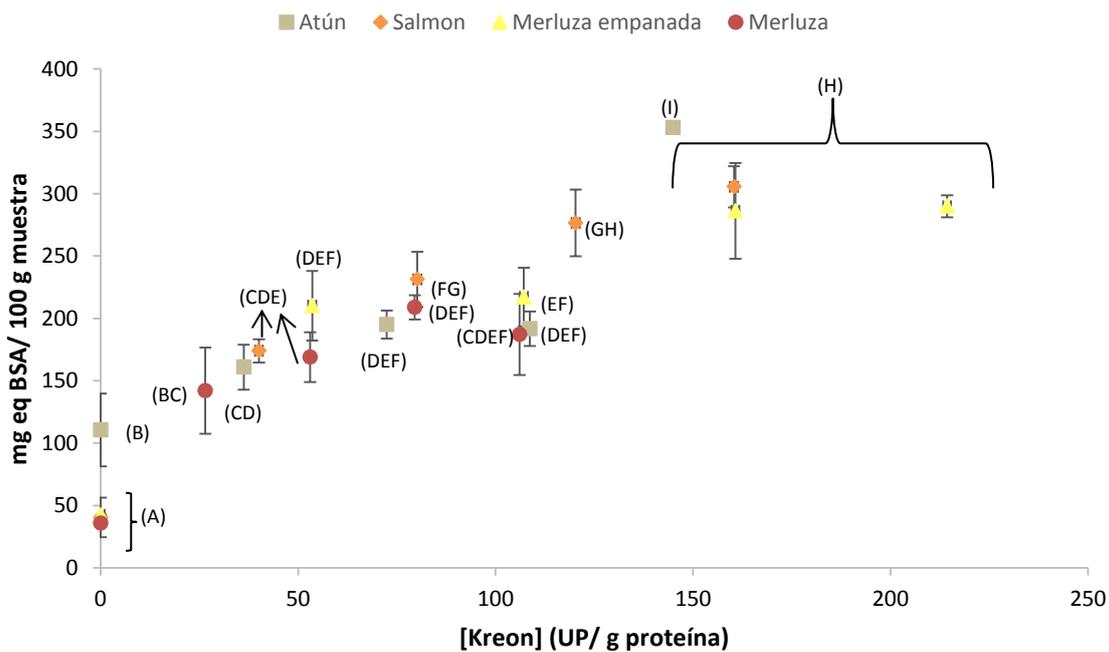
Las figuras 4.4 y 4.5 muestran la extensión de la proteólisis durante las etapas gástrica (Figura 4.4) e intestinal (Figura 4.5) en función de la concentración de Kreon® (mg/ mL) a pH intestinal 6 y concentración biliar 1 mM, respectivamente. Tal y como se ha explicado en el apartado 3 de materiales y métodos, la adición de Kreon® al digestor *in vitro* se estableció para alcanzar relaciones Unidades Lipasa (UL): g de grasa, equivalentes para cada alimento. Como consecuencia, y debido a los diferentes contenidos en proteína de las matrices de estudio, las relaciones Unidades Proteasa (UP): g de proteína, fueron distintas en las digestiones para una dosis de Kreon® equivalente (Tablas 3.4 y 3.5 del apartado materiales y métodos). Adicionalmente, la figura 4.6 muestra la extensión de la proteólisis para una misma concentración de Kreon® (0,49 mg/ mL) expresada como UP/ g de proteína, a diferentes condiciones de pH intestinal (6 y 7) y concentración biliar (1 y 10 mM).



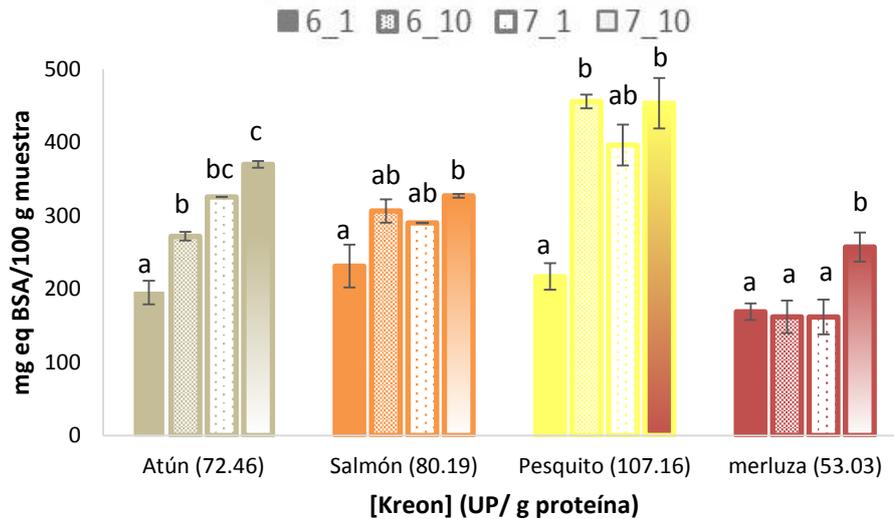
**Figura 4.4.** Extensión de la proteólisis (mg equivalentes de BSA / 100 g muestra) tras la digestión gástrica de los cuatro alimentos de pescado en estudio. Las letras minúsculas corresponden a los grupos homogéneos obtenidos a partir del análisis estadístico ANOVA. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándares (n=3).

La proteólisis, se inicia en el estómago mediante la acción de la pepsina, enzima encargada de iniciar el proceso de hidrólisis; ésta se activa gracias al HCl segregado en el estómago, hidrolizando aproximadamente el 15 % de las proteínas de la dieta en aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular. Una vez en el intestino delgado, las enzimas pancreáticas encargadas de la proteólisis (tripsina, quimiotripsina y carbopeptidasa) continúan el proceso de hidrólisis (Griffiths, 2014). La degradación proteica parcial originada durante la etapa gástrica, implicará una mejora en la digestibilidad de las proteínas facilitando la liberación de los péptidos y aumentando su hidrólisis durante la posterior etapa intestinal (Cabañero et al., 2004).

Tal y como se puede observar, la merluza dio lugar a la menor proteólisis tanto al final de la etapa gástrica como al final de la etapa intestinal. Sin embargo, hay que tener en cuenta que durante la etapa intestinal, las unidades proteasa por gramo de proteína fueron distintas entre las diferentes matrices, siendo concretamente la merluza la matriz a la que se le añadió una dosis menor. Además, esta menor digestibilidad de las proteínas de la merluza con respecto a las otras matrices podría, estar también relacionada con los cambios estructurales ocasionados por la congelación. Las proteínas miofibrilares, que contribuyen en gran medida a las propiedades de textura y funcionales en los alimentos musculares, son las más afectadas durante el almacenamiento en frío. Éstas pueden sufrir desnaturalización y/o agregación debido a factores tales como la deshidratación parcial durante la congelación del agua, la concentración asociada a los solutos en el tejido, o a las interacciones de las proteínas con los lípidos o con sus productos derivados de la oxidación (Careche et al., 1999), limitando u obstaculizando la acción hidrolítica de las proteasas (Costa et al., 2015). Tal y como se observa en la **Tabla 4.4**, si se estudian las cuatro matrices por separado, la concentración de Kreon® influyó significativamente en el grado de proteólisis.



**Figura 4.5.** Extensión de la proteólisis (mg equivalentes de BSA/ 100 g muestra) al final de la digestión de los alimentos de pescado en estudio en función de la dosis de Kreon® (0; 0,24; 0,49; 0,72 y 0,96 mg/ mL) expresada en relación a su actividad proteasa (UP/ g proteína). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándares (n=3). Las letras en mayúsculas (A-H) corresponden a los distintos grupos homogéneos obtenidos tras el análisis estadístico de la varianza (ANOVA).



**Figura 4.6.** Influencia del pH (6-7) y la concentración biliar (1-10 mM) sobre la extensión de la proteólisis (mg eq BSA/ 100 g muestra) de los alimentos de pescado al final de la digestión. Las letras en minúsculas son los grupos homogéneos de cada alimento por separado al realizar análisis unifactorial de la varianza ANOVA. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándares (n=3). Las concentraciones de pancreatina expresadas en UP/ g proteína y marcadas entre paréntesis en el eje X, varían según el contenido proteico inicial de cada matriz, siendo cada una la equivalente a 2000 UL/ g grasa (0,49 mg/ mL). Código de la leyenda: pH\_concentración biliar.

Por otro lado, el atún y la merluza empanada, fueron los que mayores valores de proteólisis registraron, probablemente no sólo debido a las mayores concentraciones de proteasa, sino por la mayor desestructuración de estas matrices durante el proceso de fabricación. No obstante, concentraciones similares de proteasa dieron lugar a valores de proteólisis similares con independencia de la matriz (**Figura 4.5**). Por último, un pH intestinal de 7 y una concentración superior de sales biliares (10 mM) favorecieron la extensión de la proteólisis en términos generales (**Figura 4.6**).

**Tabla 4.4.** Tabla resumen obtenida al realizar ANOVA unifactorial ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ) en función del tipo de muestra (atún, salmón, merluza empanada, merluza) y concentración de Kreon® referida a su actividad proteasa (UP/ g proteína) para la variable dependiente mg equivalentes de BSA/ 100 g muestra.

PRODUCTOS	EFFECTOS PRINCIPALES	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Atún	A: UP/ g proteína	74667,0	4	18666,8	55,97	0,0000*
Salmón	A: UP/ g proteína	117288,0	4	29321,9	64,54	0,0000*
Merluza empanada	A: UP/ g proteína	80758,6	4	20189,7	8,76	0,0176*
Merluza	A: UP/ g proteína	51008,7	4	12752,2	21,23	0,0001*

Únicamente en el caso del atún, se observa un efecto significativo del pH y de la concentración biliar sobre la proteólisis (**Tabla 4.5**). Aun así, comparando las condiciones de digestión más desfavorables (pH intestinal 6 y sales biliares 1 mM) con las propias de un adulto sano (pH 7 y concentración biliar 10 mM) se observa que no solo estaría condicionada la lipólisis en una situación de insuficiencia pancreática sino también la proteólisis.

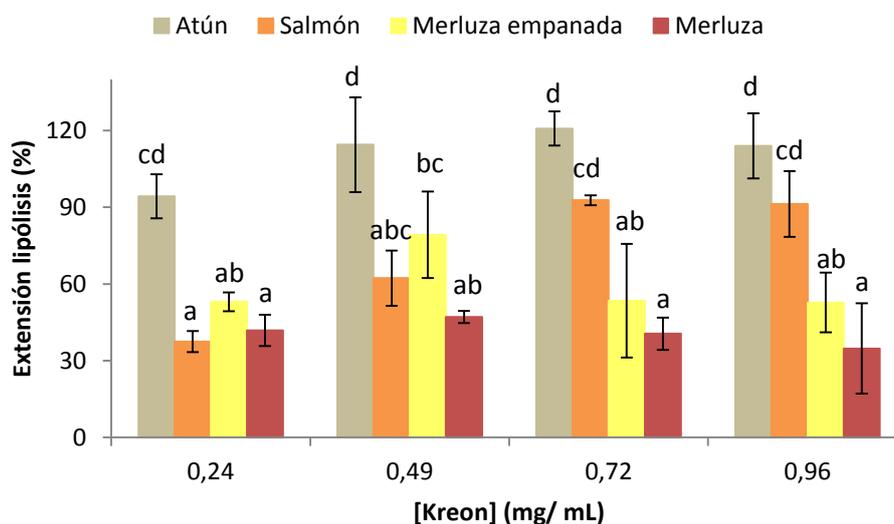
**Tabla 4.5.** Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) en función del tipo de muestra (atún, salmón, merluza empanada, merluza), pH y concentración biliar (mM) para la variable dependiente mg equivalentes de BSA/ 100 g muestra. La concentración de Kreon® referida a su actividad proteasa se mantiene constante en cada muestra: 72,46 UP/ g proteína (atún), 80,19 UP/ g proteína (salmón), 107,16 UP/ g proteína (merluza empanada), 53,03 UP/ g proteína (merluza) siendo éstas las equivalentes a 2000 UL/ g grasa (0,49 mg/ mL).

PRODUCTOS	EFFECTOS PRINCIPALES	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Atún	A: pH	39129,5	1	39129,5	46,50	0,0001*
	B: [Biliar] (mM)	11014,7	1	11014,7	13,09	0,0068*
	<b>INTERACCIONES</b>					
	AB	787,644	1	787,644	0,94	0,3616
Salmón	A: pH	3442,15	1	3442,15	3,27	0,1303
	B: [Biliar] (mM)	6849,8	1	6849,8	6,51	0,0512
	<b>INTERACCIONES</b>					
	AB	794,006	1	794,006	0,75	0,4248
Merluza empanada	A: pH	31,2229	1	31,2229	0,06	0,8268
	B: [Biliar] (mM)	1865,68	1	1865,68	3,40	0,1624
	<b>INTERACCIONES</b>					
	AB	11626,1	1	11626,1	21,19	0,0193*
Merluza	A: pH	4652,37	1	4652,37	3,08	0,1296
	B: [Biliar] (mM)	4685,4	1	4685,4	3,11	0,1285
	<b>INTERACCIONES</b>					
	AB	6322,03	1	6322,03	4,19	0,0866

#### 4.4. Influencia de la dosis de suplemento enzimático Kreon® y de las condiciones de pH intestinal y concentración biliar sobre la Extensión de la Lipólisis

La lipólisis es el proceso de hidrólisis enzimática que experimentan las grasas alimentarias durante su digestión para poder ser absorbidas en el intestino delgado. Este proceso se inicia en el estómago por acción de la lipasa gástrica pero su extensión no supera el 10 % en el caso de individuos sanos, y se completa en el intestino delgado por acción de las lipasas segregadas por el páncreas y por la pared del duodeno (Griffiths, 2014). La lipasa gástrica, además de activar la digestión posterior en la etapa intestinal, promueve la pre-emulsificación de los lípidos mediante la alteración de la superficie interfacial a través de los productos recién generados, principalmente ácidos grasos y diacilglicéridos. No obstante, en estudios *in vitro* en los que se ha comparado la hidrólisis lipídica con y sin lipasa gástrica, no se han observado diferencias significativas en la extensión, por lo que habitualmente y por problemas de disponibilidad no se suelen utilizar en los estudios de simulación *in vitro* (Nieva-Echevarría et al., 2016). En este estudio, y dado que no se ha utilizado lipasa gástrica, toda la lipólisis registrada es debida a la acción lipolítica del suplemento enzimático Kreon® en la etapa intestinal.

Como se ha especificado en el apartado de materiales y métodos, la dosis de Kreon® añadida se estableció en función de la grasa de las distintas matrices, de manera que las cantidades de suplemento enzimático por gramos de grasa utilizado fueran comparables entre sí. La **figura 4.8** muestra los valores de extensión de la lipólisis una vez finalizada la etapa intestinal, en función de las dosis de Kreon® (mg/ mL) y en condiciones duodenales de pH 6 y concentración biliar 1 mM.

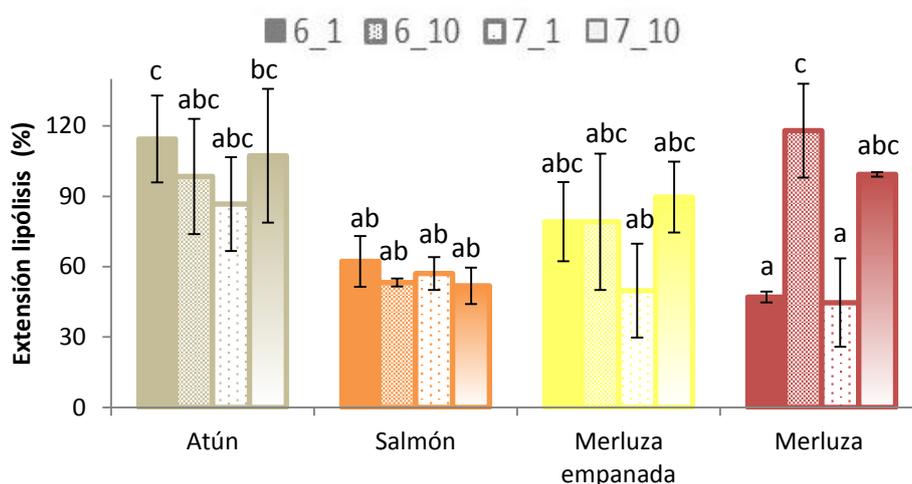


**Figura 4.7.** Influencia de la concentración de Kreon® (mg/ mL) en la extensión de la lipólisis (%) después de la etapa intestinal. Las letras minúsculas corresponden a los grupos homogéneos obtenidos con el análisis estadístico de la varianza ANOVA. Barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3).

Tal y como puede observarse, la grasa del atún fue la más hidrolizada debido a la actividad lipasa del Kreon®. Este hecho puede atribuirse a la presencia del aceite vegetal, externo a la propia matriz de pescado, más fácilmente emulsionado y más accesible a la acción enzimática. En cuanto a la influencia de la dosis de Kreon® sobre la extensión de la lipólisis, en el caso del salmón se produjo un aumento gradual conforme lo hizo la concentración de Kreon®, alcanzándose valores de lipólisis del 100 % a la mayor concentración ensayada. En el resto de alimentos, no se observó una mejora de la extensión de la lipólisis con el aumento de la concentración de suplemento. La **figura 4.8** muestra la extensión de la lipólisis alcanzada en las muestras al final de la digestión para los diferentes pH intestinales y concentraciones biliares ensayadas y una concentración fija de Kreon® de 0.48 mg/ mL. Los resultados indican que no hubo influencia de estos factores en la extensión de la lipólisis de la grasa del atún, salmón y merluza empanada, mientras que la concentración biliar resultó ser clave en la digestibilidad de las grasas de la merluza alcanzándose una lipólisis del 100 % a 10 mM de concentración biliar con independencia del pH (**Tabla 4.7**).

Varios estudios han puesto de manifiesto el papel crucial de la matriz alimentaria con respecto a la digestión de los lípidos, ya que su biodisponibilidad se ve directamente afectada por el

entorno lipolítico (Aarak et al., 2013). En el caso del atún en lata, ya se ha indicado que el proceso de enlatado altera la composición proximal del mismo, lo que resulta en un gran aumento en el porcentaje de lípidos, y una disminución significativa en el porcentaje de humedad (Rasmussen y Morrissey, 2007). Estos cambios deben por tanto tenerse en cuenta al analizar los resultados obtenidos en el atún con respecto a las demás matrices.



**Figura 4.8.** Influencia del tipo de matriz, pH y concentración biliar (mM) en la extensión de la lipólisis. La dosis de Kreon® se mantiene constante en todas las condiciones duodenales (2000 U). Las letras en minúscula corresponden a los grupos homogéneos obtenidos en el análisis de la varianza. Las barras de error representan las desviaciones estándares (n=3). Código de la leyenda: pH\_concentración biliar.

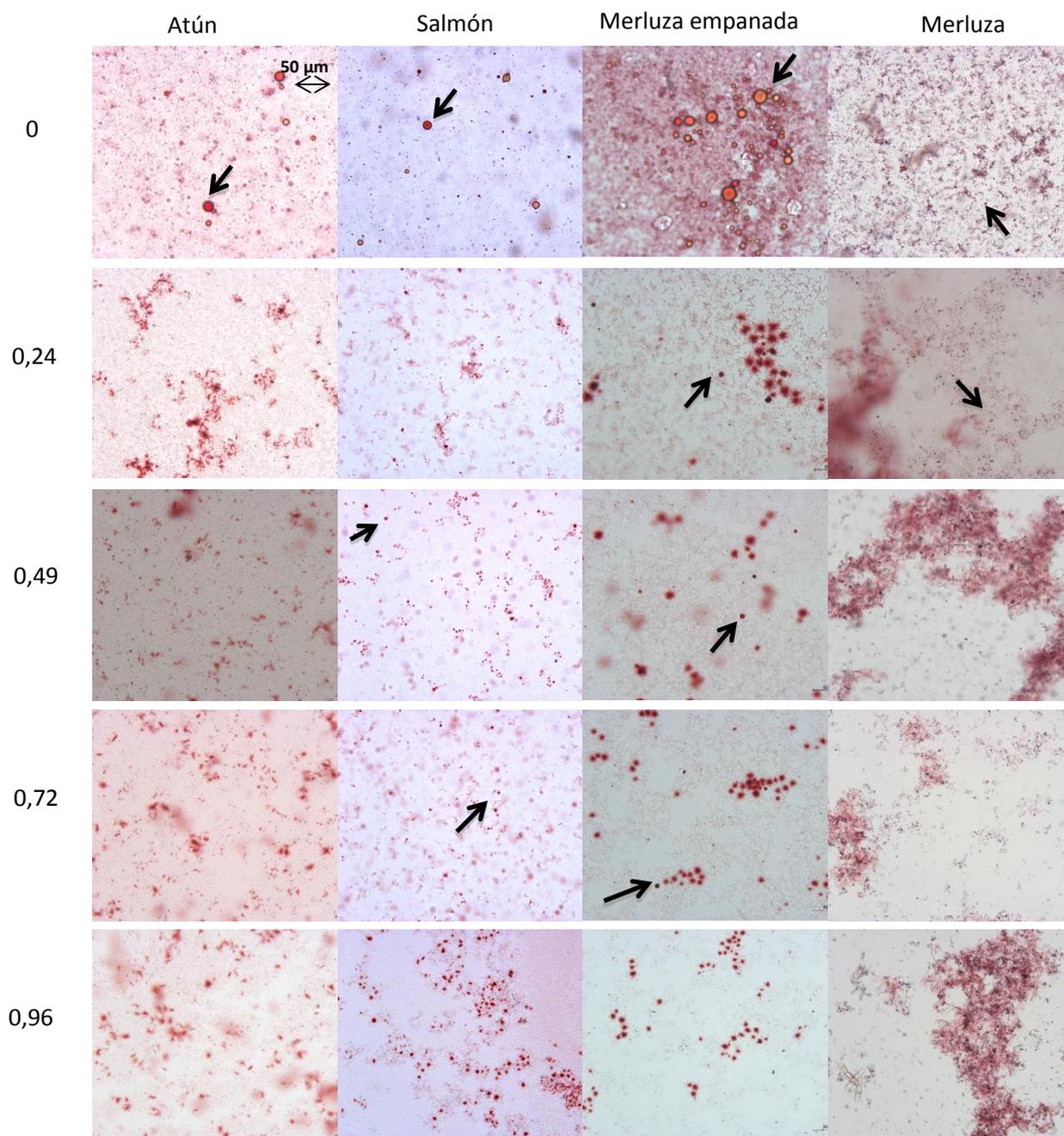
**Tabla 4.6.** Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) para el tipo de muestra (atún, salmón, merluza empanada, merluza) y concentración de kreon® (mg/ mL) para la variable dependiente extensión de la lipólisis (%). Las condiciones gastrointestinales corresponden a pH 6 y concentración biliar 1 mM.

EFFECTOS PRINCIPALES	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>A: Muestra</b>	26689,2	3	8896,42	29,71	0,0000*
<b>B: mg Kreon/ mL</b>	2335,18	3	778,392	2,6	0,0806
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	4025,12	9	447,235	1,49	0,2170

**Tabla 4.7.** Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ) para el tipo de muestra (atún, salmón, merluza empanada, merluza), pH y concentración biliar (mM) para la variable dependiente extensión de la lipólisis (%). La concentración de Kreon® se mantiene constante (0,49 mg/ mL).

<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>A: Muestra</b>	5326,8	3	1775,6	2,34	0,1079
<b>B: pH</b>	838,037	1	838,037	1,10	0,3075
<b>C: [Biliar] (mM)</b>	5742,25	1	5742,25	7,56	0,0132*

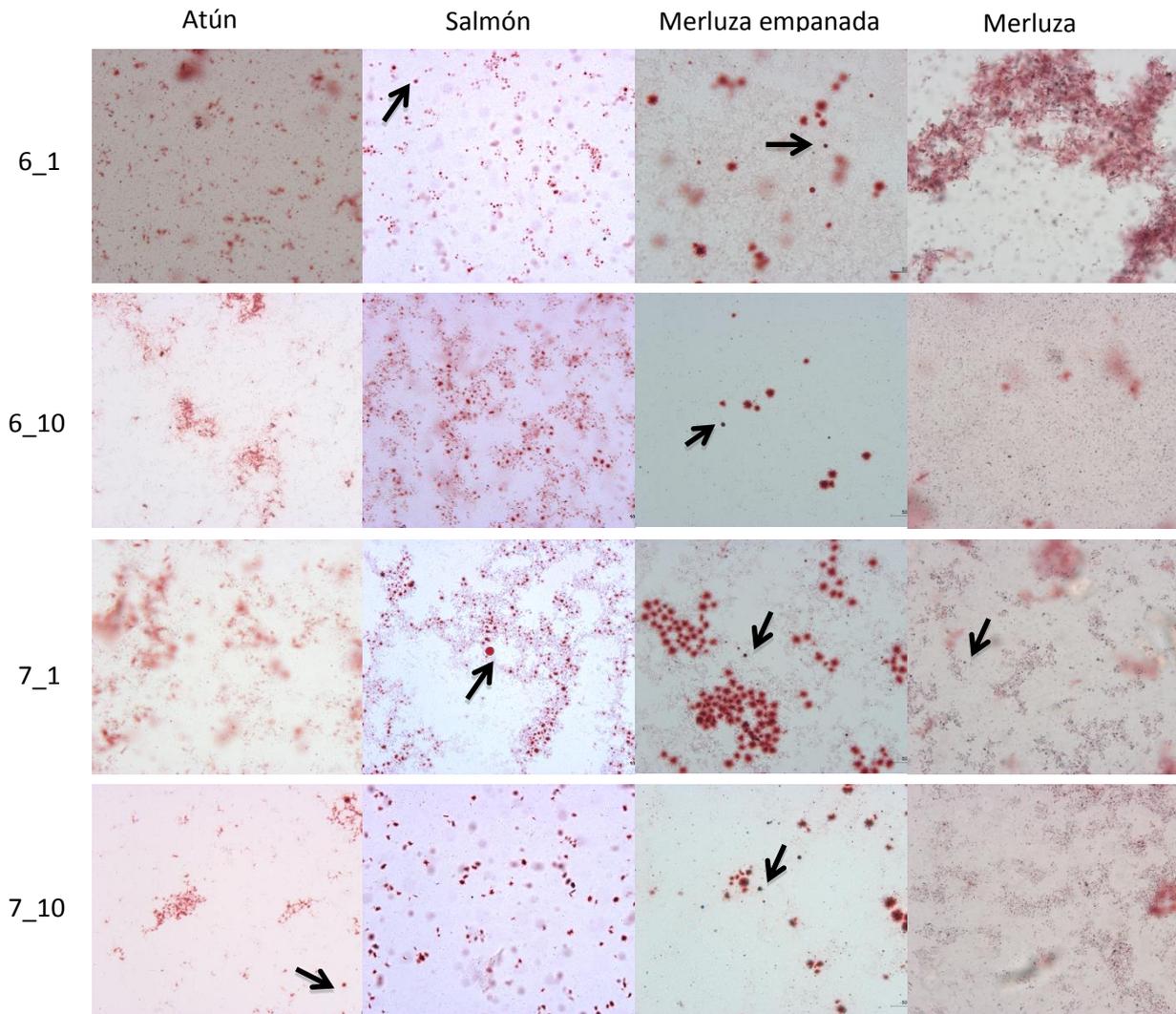
Las observaciones microscópicas permiten apoyar los resultados comentados anteriormente en cuanto al efecto de la concentración de Kreon® sobre la extensión de la lipólisis (**Figura 4.9**). En el caso del atún, el nivel de digestión de las grasas fue similar con independencia de la concentración de Kreon® ensayada. También se observa como en la matriz son kreon®, los glóbulos grasos se encuentran rodeados por las sales biliares, hecho no observable tras la digestión, debido a la digestión del glóbulo y a su reorganización en micelas. En las micrografías de merluza, en cambio, se puede observar cómo el número de glóbulos grasos no digeridos disminuye conforme aumenta la concentración de Kreon®.



**Figura 4.9.** Influencia de la concentración de Kreon® en las microestructuras de las emulsiones observadas a 20x en cada una de las matrices (merluza, merluza empanada, atún y salmón) para unas condiciones duodenales constantes (pH 6 y concentración biliar 1 mM). Las flechas señalan las aparentes gotas de grasa no digeridas.

La **figura 4.10**, recoge las imágenes de microscopía óptica obtenidas tras la digestión de los diferentes productos en condiciones duodenales variables de pH intestinal y concentración biliar (pH 6-7; concentración biliar: 1-10 mM) y una concentración de Kreon® constante de 0,49 mg/mL. Como se ha comentado anteriormente, la variación del pH no influyó significativamente en la extensión de la lipólisis (**Tabla 4.7**), de modo que las diferencias observadas en las micrografías

son atribuibles a la concentración biliar (mM). La digestión *in vivo* de triglicéridos es un proceso eficiente que involucra varios pasos distintos: la emulsificación, la hidrólisis de la grasa, por la acción de las lipasas, en ácidos grasos libres y monoacilglíceroles, la dispersión de estos productos en un ambiente acuoso y la absorción de los mismos por los enterocitos (Lowe, 2002). La bilis juega un importante papel en la emulsificación de los lípidos ya que regula la composición de la interfase lípido-agua, donde la hidrólisis tiene lugar. Esto sugiere que concentraciones altas de bilis (10 mM) promoverán la desorción de cualquier material activo, localizado en las superficies de los lípidos emulsionados, de modo que la lipasa pueda unirse a la superficie interfacial de las sales biliares y promover la digestión de lípidos (Mun et al., 2007). La menor concentración biliar empleada (1 mM), dio lugar a una menor hidrólisis de los triglicéridos (mayor número de glóbulos grasos no digeridos) comparado con la hidrólisis alcanzada a mayor concentración biliar (10 mM) (**Figura 4.10**). Este hecho puede explicarse teniendo en cuenta que la extensión de la lipólisis es directamente proporcional al área de superficie específica de los glóbulos grasos (Benito-Gallo et al., 2015). En el caso de emulsiones con el mismo tamaño de gota y estructura, las diferencias en la lipólisis se pueden atribuir a la diferente composición en ácidos grasos de los triglicéridos contenidos en la matriz. Se ha comprobado también, que la longitud de cadena de los ácidos grasos, influye en la extensión de la lipólisis, de modo que los ácidos grasos de cadena larga y sus 2-monoglicéridos tienen considerablemente mayor actividad interfacial que los ácidos grasos de cadena corta y sus 2-monoglicéridos. Concretamente, el DHA es el que más actividad interfacial presenta, seguido del ácido palmítico (Zhu et al., 2013). Posiblemente la mayor polaridad de los ácidos grasos de cadena corta de determinados triglicéridos promueve su localización en zonas cercanas de la interfase de los glóbulos grasos, donde tienen una mayor probabilidad de entrar en contacto con la lipasa y por consiguiente ser hidrolizados para liberar a los ácidos grasos de cadena corta que los componen (Zhu et al., 2013). Esto podría en parte explicar el por qué la extensión de la lipólisis en salmón y atún (pescados más grasos) resultaron superiores ya que se componen de un mayor número de ácidos grasos de cadena corta que los pescados con menor contenido graso (merluza).



**Figura 4.10.** Influencia del pH (6-7) y de la concentración biliar (1-10 mM) en la microestructura de las emulsiones, observadas a 20x, en cada una de las matrices (merluza, merluza empanada, salmón y atún) al final de la etapa intestinal. Las flechas señalan los aparentes glóbulos de grasa no digeridos. Código margen izquierdo: pH\_concentración biliar.

## 5. CONCLUSIONES

- ✓ La caracterización de los alimentos de la pesca en términos de grasa y humedad antes del proceso de digestión, permitió establecer diferencias, no sólo en cuanto a la cantidad de grasa sino también en cuanto a la distribución de la misma en las distintas matrices. El salmón presentó el mayor contenido graso, con glóbulos dispersos de tamaño homogéneo. En cambio, en el atún, con un contenido graso algo menor, se observaron glóbulos más heterogéneos y accesibles al provenir principalmente del aceite vegetal incorporado. En la merluza empanada se observó también un elevado número de glóbulos grasos de tamaño variable, provenientes del rebozado. Por último, la merluza, con menor contenido graso (1,2 %), presentó glóbulos grasos escasos y de muy pequeño tamaño.
- ✓ El índice de degradación de la matriz alcanzó niveles del 80 % al final de la digestión gastrointestinal excepto en la merluza en la que se alcanzaron menores valores de dicho parámetro. Se observó un aumento de la degradación en presencia de Kreon® independientemente de su concentración, probablemente como consecuencia de su actividad proteolítica. En lo que a este parámetro se refiere, ni la concentración biliar ni el pH tuvieron un efecto significativo.
- ✓ La extensión de la proteólisis aumentó al aumentar la dosis de Kreon® en todos los alimentos en condiciones intestinales constantes (pH 6/ 1 mM). Independientemente del tipo de matriz, se alcanzaron niveles similares de proteólisis, para relaciones UP: g proteína, equivalentes. Además, el aumento del pH (de 6 a 7) y de la concentración biliar (de 1 a 10 mM), se tradujo en mayores valores de proteólisis. Estas diferencias estarán también determinadas por los cambios estructurales debidos a procesos de desnaturalización y/o agregación que pueden darse durante el procesado y el almacenamiento de estos alimentos previamente a la digestión.
- ✓ En cuanto a la extensión de la lipólisis se refiere, únicamente se alcanzaron valores del 100 % en el caso del atún en unas condiciones intestinales de pH 6 y concentración biliar de 1 mM. En cambio, para una concentración de Kreon® constante, un aumento en la concentración biliar contribuyó en la digestión de los lípidos, pero no así el pH. Así pues, se observó una mayor extensión de la lipólisis en los pescados más grasos, probablemente debido a la mayor proporción de ácidos grasos de cadena corta en su perfil lipídico.
- ✓ De los resultados obtenidos en el presente trabajo puede concluirse que los productos de la pesca con mayor contenido graso serían los más recomendables para pacientes que cursen con insuficiencia pancreática, puesto que presentan mayor digestibilidad de grasa y proteína. Además, una desestructuración durante el procesado, contribuye también a la posterior acción enzimática. Sería interesante, el estudio adicional de la accesibilidad y

biodisponibilidad de los ácidos grasos, especialmente de los poliinsaturados como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA), dadas su propiedades funcionales.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AARAK, K. E., RIGBY, N. M., KIRKHUS, B., SALT, L. J., SAHLSTRØM, S., BENGTSSON, G. B., VEGARUD, G. E. Y MACKIE, A. R. (2013). The impact of meal composition on the release of fatty acids from salmon during in vitro gastrointestinal digestion. *Food & function*, 4(12): 1819-1826.
- ACKMAN, R. (1990). Seafood lipids and fatty acids. *Food Reviews International*, 6(4): 617-646.
- AOAC, 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15<sup>th</sup> Edition.
- ASEERI, A., BRODLIE, M., LORDAN, J., CORRIS, P., PEARSON, J., WARD, C. Y MANNING, N. (2012). Bile acids are present in the lower airways of people with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 185(4): 463-463.
- BENITO-GALLO, P., FRANCESCHETTO, A., WONG, J. C., MARLOW, M., ZANN, V., SCHOLE, P. Y GERSHKOVICH, P. (2015). Chain length affects pancreatic lipase activity and the extent and pH-time profile of triglyceride lipolysis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 93: 353-362.
- CABAÑERO, A. I., MADRID, Y., Y CÁMARA, C. (2004). Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Analytica Chimica Acta*, 526(1): 51-61.
- CARECHE, M., HERRERO, A. M., RODRÍGUEZ-CASADO, A., DEL MAZO, M. L., Y CARMONA, P. (1999). Structural changes of hake (*Merluccius merluccius* L.) fillets: effects of freezing and frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3): 952-959.
- COHEN, J., BELLINGER, D., CONNOR, W., KRISETHERTON, P., LAWRENCE, R., SAVITZ, D., SHAYWITZ, B., TEUTSCH, S. Y GRAY, G. (2005). A quantitative risk-benefit analysis of changes in population fish consumption. *American journal of preventive medicine*, 29(4): 325-334.
- COSTA, S., AFONSO, C., CARDOSO, C., BATISTA, I., CHAVEIRO, N., NUNES, M. L., Y BANDARRA, N. M. (2015). Fatty acids, mercury, and methylmercury bioaccessibility in salmon (*Salmo salar*) using an in vitro model: Effect of culinary treatment. *Food chemistry*, 185: 268-276.
- D'HAESE, J. G., CEYHAN, G. O., DEMIR, I. E., LAYER, P., UHL, W., LÖHR, M., RYCHLIK, R., PIRILIS, K., ZÖLLNER, Y., GRADL, B., FOERSTER, D., MÖBIUS, J., HENNIGES, F. Y FRIESS, H. (2014). Pancreatic enzyme replacement therapy in patients with exocrine pancreatic insufficiency due to chronic pancreatitis: a 1-year disease management study on symptom control and quality of life. *Pancreas*, 43(6): 834-841.
- DIEU HUYNH, M., D. Y KITTS, D. (2009). Evaluating nutritional quality of pacific fish species from fatty acid signatures. *Food Chemistry*, 114(3), 912-918.
- FERRONE, M., RAIMONDO, M. Y SCOLAPIO, J. S (2007). Pancreatic Enzyme Pharmacotherapy. *Pharmacotherapy*, 27(6): 910-920.
- FIEKER, A. P., PHILPOTT, J. Y ARMAND, M. (2011). Enzyme replacement therapy for pancreatic insufficiency: present and future. *Clinical and experimental gastroenterology*, 4(4): 55-73.
- GARCÍA-ARIAS, M., SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J., CASTRILLÓN, A. M. Y PILAR NAVARRO, M. (1994). White tuna canning, total fat, and fatty acid changes during processing and storage. *Journal of Food Composition and Analysis*, 7(1): 119-130.

- GELFOND, D., MA, C., SEMLER, J. Y BOROWITZ, D. (2012). Intestinal pH and gastrointestinal transit profiles in cystic fibrosis patients measured by wireless motility capsule. *Digestive diseases and sciences*, 58(8): 2275-2281.
- GOLDING, M. Y WOOSTER, T. J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1): 90-101.
- GRIFFITHS, M. 2014. Lo esencial en aparato digestivo. Elsevier. 4ª edición.
- GUERRA, A., ETIENNE-MESMIN, L., LIVRELLI, V., DENIS, S., BLANQUET-DIOT, S. Y ALRIC, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in biotechnology*, 30(11): 591-600.
- HOSOMI, R., YOSHIDA, M. Y FUKUNAGA, K. (2012). Seafood consumption and components for health. *Global journal of health science*, 4(3): 72.
- HUYNH, M. D., Y KITTS, D. D. (2009). Evaluating nutritional quality of pacific fish species from fatty acid signatures. *Food Chemistry*, 114(3), 912-918.
- LAMOTHE, S., AZIMY, N., BAZINET, L., COUILLARD, C. Y BRITTEN, M. (2014). Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food & function*, 5(10): 2621-2631.
- LI, L. Y SOMERSET, S. (2014). Digestive system dysfunction in cystic fibrosis: challenges for nutrition therapy. *Digestive and Liver Disease*, 46(10): 865-874.
- LOWE, M. E. (2002). The triglyceride lipases of the pancreas. *Journal of Lipid Research*, 43.
- MARZE, S., MEYNIER, A. Y ANTON, M. (2013). In vitro digestion of fish oils rich in n-3 polyunsaturated fatty acids studied in emulsion and at the oil–water interface. *Food & function*, 4(2): 231-239.
- 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. J., MÉNARD, O., RECIO, I., SANTOS, C. N., SINGH, R. P., VEGARUD, G. E., WICKHAM, M. S. J., WEITSCHIES, W. Y BRODKORB, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6): 1113-1124.
- MUN, S., DECKER, E. A. Y MCCLEMENTS, D. J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*, 40(6), 770-781.
- NÉSTOR SERRA GÓMEZ-NICOLAU. (Noviembre 2015). Lisolectinas para mejorar la digestibilidad de las grasas. *nutriNews*, 35-42.
- NIEVA-ECHEVARRÍA, B., GOICOECHEA, E., MANZANOS, M. J. Y GUILLÉN, M. D. (2016). A study by 1 H NMR on the influence of some factors affecting lipid in vitro digestion. *Food Chemistry*, 211, 17-26.
- RASMUSSEN, R. S., Y MORRISSEY, M. T. (2007). Effects of canning on total mercury, protein, lipid, and moisture content in troll-caught albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chemistry*, 101(3): 1130-1135.
- SIKKENS, E., CAHEN, D., KUIPERS, E. Y BRUNO, M. (2010). Pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 24(3): 337-347.

- THE NATIONAL PANCREAS FOUNDATION, 2014. *Exocrine pancreatic insufficiency (EPI)*, Bethesda, Maryland, visto el 5 de Julio de 2016. <https://goo.gl/uHHHgY>
- TRAN DO, D. H., KONG, F., PENET, C., WINETZKY, D. Y GREGORY, K. (2016). Using a dynamic stomach model to study efficacy of supplemental enzymes during simulated digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 65: 580-588.
- TRANG, T. (2014). Pancreatic enzyme replacement therapy for pancreatic exocrine insufficiency in the 21st century. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(33): 11467.
- ZHU, X., YE, A., VERRIER, T., Y SINGH, H. (2013). Free fatty acid profiles of emulsified lipids during in vitro digestion with pancreatic lipase. *Food chemistry*, 139(1): 398-404.