

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE DIGESTIÓN DE LA GRASA DE LA LECHE BAJO DISTINTAS CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Sergio Villa Consuegra

TUTOR: Dra. Ana María Andrés Grau

COTUTOR: Dra. Ana Belén Heredia Gutiérrez

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Dra. Irene Peinado Pardo

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, julio de 2016



Estudio de la cinética de digestión de la grasa de la leche bajo distintas condiciones gastrointestinales simuladas

Autor: Sergio Villa Consuegra

Tutor: Ana María Andrés Grau

Cotutor: Ana Belén Heredia Gutiérrez

Valencia, Julio 2016

Resumen

La insuficiencia pancreática es una manifestación clínica que se caracteriza por la incapacidad del páncreas de liberar suficiente enzima pancreática al intestino delgado, necesaria para digerir los nutrientes intraluminales. La falta de enzimas digestivas lleva a la dificultad en la absorción de nutrientes, que conduce a la desnutrición y la falta de crecimiento y desarrollo, debido a la pérdida de calorías. El tratamiento habitual en personas que padecen esta enfermedad consiste en la administración por vía oral de enzimas pancreáticas que presentan actividades proteasa, lipasa y amilasa. No obstante, existen una serie de factores relativos al alimento (matriz, tipo de grasa, etc.), así al entorno digestivo (pH intestinal, concentración biliar entre otros), que pueden influir en la digestibilidad de los nutrientes. Por ello y debido a las limitaciones de este tratamiento en términos de eficacia, se propuso el presente trabajo con la finalidad de profundizar en el conocimiento del funcionamiento de las enzimas pancreáticas en diferentes condiciones intestinales simuladas.

En un primer momento se procedió a evaluar la actividad lipolítica del suplemento enzimático de pancreatina (SEP), utilizado habitualmente en el tratamiento de la insuficiencia pancreática, en diferentes condiciones intestinales de pH (6, 7 y 8) y concentración biliar (1, 10 y 20). Los resultados obtenidos se compararon con los resultados de lipólisis obtenidos a partir de disoluciones de pancreatina porcina y lipasa: colipasa (10:1). Posteriormente, se utilizó un modelo de digestión *in vitro* para estudiar y caracterizar la cinética de la reacción de lipólisis de la grasa de leche. Para ello se simularon diferentes condiciones de pH (6, 7 y 8) y concentración biliar (1, 5 y 10 mM) empleando una concentración conocida de suplemento de pancreatina (8,27 UL/mL). De esta forma, a partir de la información de las constantes cinéticas calculadas, se obtuvo la relación enzima: sustrato que maximiza la eficiencia catalítica de la enzima.

Los resultados mostraron la influencia del efecto del pH y la concentración biliar en la actividad de las disoluciones enzimáticas (SEP, pancreatina porcina y lipasa: colipasa). La actividad aumentó tanto al incrementar el pH de 6 a 8, como al aumentar la concentración de bilis alcanzando un máximo a 10 mM. Por otro lado, los resultados de cinética mostraron que el aumento del pH y concentración biliar tiende a aumentar la velocidad de reacción (aumenta r_m) así como la afinidad de la enzima por el sustrato (disminuye k_m). Finalmente, las relaciones E/S que saturan a la enzima mostraron que para aquellas condiciones duodenales favorables (pH 7-8 y 10 mM), la enzima es capaz de alcanzar valores máximos de velocidad con bajas cantidades de sustrato. De esta forma, conociendo la relación E/S para la cual se alcanza la velocidad máxima, será posible calcular la dosis óptima de enzima para lograr la máxima eficiencia lipolítica.

Palabras claves: digestión *in vitro*, insuficiencia pancreática, pancreatina, lipólisis, cinética enzimática, leche

Study of the kinetics of digestion of milk fat under different simulated gastrointestinal conditions

Author: Sergio Villa Consuegra

Tutor: Ana Maria Andrés Grau

Co-tutor: Ana Belén Heredia Gutiérrez

Valencia, July 2016

Summary

Pancreatic insufficiency is a clinical manifestation characterized by the inability of the pancreas to release enough pancreatic enzyme into the small intestine, necessary to digest intraluminal nutrients. The lack of digestive enzymes leads to the difficulty to absorb nutrients, which drives to malnutrition and lack of growth and development, due to the loss of calories. The habitual treatment of these patients involves oral administration of pancreatic enzymes with protease, lipase and amylase activities. However, there are a number of food related factors (matrix, type of fat, etc.) and digestive environment (intestinal pH, bile concentration, among others), which will influence the digestibility of nutrients. Therefore, and due to the limitations of this treatment in terms of efficacy, this study was proposed in order to deepen the understanding of the functioning of pancreatic enzymes under different simulated intestinal conditions.

At first study was addressed to evaluate the lipolytic activity of the pancreatic enzyme supplement (PES), commonly used in the treatment of pancreatic insufficiency, under different intestinal conditions of pH (6, 7 and 8) and bile concentrations (1, 10 and 20 mM). The obtained results were compared to those obtained with solutions of porcine pancreatin and lipase: colipase (10: 1). Subsequently, an *in vitro* digestion model was used to study and characterize the kinetics of the lipolysis reaction of milkfat. For this, different pH conditions (6, 7 and 8) and bile concentrations (1, 5 and 10 mM) were simulated, using a fixed concentration pancreatic supplement (8.27 UL / mL). Thus, from the information of the calculated kinetic constants, it was possible to obtain the enzyme: substrate ratio that maximizes the catalytic efficiency of the enzyme.

The results illustrate the influence of the pH and bile concentration in the activity of the enzyme solutions (SEP, porcine pancreatin and lipase: colipase). The activity increased by increasing both the pH from 6 to 8, as well as by increasing the bile concentration, from 1 to 10 mM. Moreover, the results showed that an increase in pH and bile concentration tends to increase the reaction rate (increases r_m) as well as the affinity of the enzyme for the substrate (decreases k_m). Finally, relations E/S saturating the enzyme showed that, at favorable duodenal conditions (pH 7, 8 and 10 mM) the enzyme is able to reach a maximum speed with low amounts of substrate. Thus, knowing the E/S at which the maximum speed is reached, it will be possible to calculate the optimal enzyme dose to achieve the maximum lipolytic efficiency.

Keywords: *in vitro* digestion, pancreatic insufficiency, pancreatin, lipolysis, enzyme kinetics, milk

Estudi de la cinètica de digestió del greix de la llet baix diferents condicions gastrointestinals simulades

Autor: Sergio Villa Consuegra

Tutor: Ana María Andrés Grau

Cotutor: Ana Belén Heredia Gutiérrez

València, Juliol 2016

Resum

La insuficiència pancreàtica és una manifestació clínica que es caracteritza per la incapacitat del pàncrees d'alliberar suficient enzim pancreàtica a l'intestí prim, necessària per digerir els nutrients intraluminals. La manca d'enzims digestius te com a conseqüència la dificultat en l'absorció de nutrients, que condueix a la desnutrició i la manca de creixement i de desenvolupament, a causa de la pèrdua de calories. El tractament habitual en persones que pateixen aquesta malaltia consisteix en l'administració per via oral d'enzims pancreàtics que presenten activitats proteasa, lipasa i amilasa. Tanmateix, existeixen una sèrie de factors relatius a l'aliment (matriu, tipus de greix, etc.), així com a l'entorn digestiu (pH intestinal, concentració biliar entre altres), que poden influir en la digestibilitat dels nutrients. Per això i a causa de les limitacions d'aquest tractament en termes d'eficàcia, es va proposar el present treball amb la finalitat d'aprofundir en el coneixement del funcionament dels enzims pancreàtics en diferents condicions intestinals simulades.

En un primer moment es va procedir a avaluar l'activitat lipolítica del suplement enzimàtic de pancreatina (SEP), utilitzat habitualment en el tractament de la insuficiència pancreàtica, en diferents condicions intestinals de pH (6, 7 i 8) i concentració biliar (1, 10 i 20 mM). Els resultats obtinguts es van comparar amb els resultats de lipòlisi obtinguts a partir de dissolucions de pancreatina porcina i lipasa: colipasa (10: 1). Posteriorment, es va utilitzar un model de digestió *in vitro* per estudiar i caracteritzar la cinètica de la reacció de lipòlisi del greix de llet. Per a això es van simular diferents condicions de pH (6, 7 i 8) i concentració biliar (1, 5 i 10 mM) emprant una concentració coneguda de suplement de pancreatina (8,27 UL / ml). D'aquesta manera, a partir de la informació de les constants cinètiques calculades, es va obtenir la relació enzim: substrat que maximitza l'eficiència catalítica de l'enzim.

Els resultats van mostrar la influència de l'efecte del pH i la concentració biliar en l'activitat de les dissolucions enzimàtiques (SEP, Pancreatina porcina i lipasa: colipasa). L'activitat va augmentar tant en incrementar el pH de 6 a 8, com en augmentar la concentració de bilis aconseguint un màxim a 10 mM. D'altra banda, els resultats de cinètica van mostrar que l'increment del pH així com el de la concentració biliar tendeix a augmentar la velocitat de reacció (augmenta r_m) així com l'afinitat de l'enzim pel substrat (disminueix k_m). Finalment, les relacions E/S que saturen a l'enzim van mostrar que per a aquelles condicions duodenals més favorables (pH 7-8 i 10 mM), l'enzim és capaç d'arribar a valors màxims de velocitat amb baixes quantitats de substrat. D'aquesta manera, coneixent la relació E/S per a la qual s'arriba a la velocitat màxima, serà possible calcular la dosi òptima d'enzim per aconseguir la màxima eficiència lipolítica.

Paraules claus: digestió *in vitro*, insuficiència pancreàtica, pancreatina, lipòlisi, cinètica enzimàtica, llet

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y muy especialmente, quería agradecer a Irene por tu dedicación y por haber estado ahí siempre que me has hecho falta. Gracias por habernos acogido tan bien en tu laboratorio desde el primer día y por habernos ayudado a ir aprendiendo de nuestros aciertos, pero sobretodo de nuestros errores. Gracias, sin ti este trabajo no hubiera sido posible.

A las chicas (Aurora, Andrea, Carmen y Carolina) por vuestra compañía, en las buenas y en las malas. Entre todos hemos aprendido lo que significa estar en un laboratorio, las obligaciones que ello conlleva, pero en especial las gratificaciones del trabajo bien hecho.

A mis tutoras "las Anas", vuestros consejos y sugerencias de mejora me han ayudado enormemente en mi trabajo.

A mi familia (mis padres y mis hermanos), por su comprensión y esfuerzo y por haber estado ahí siempre que me han hecho falta. Sin vuestra ayuda y apoyo no hubiera podido llegar donde he llegado.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIALES Y MÉTODO	6
3.1. Materiales y equipos.....	6
3.1.1. Materia prima	6
3.1.2. Reactivos y enzimas utilizadas	6
3.1.3. Equipos	7
3.2. Comparación de la actividad de SEP, lipasa y pancreatina.	7
3.2.1. Diseño experimental	7
3.2.2. Tratamiento de resultados	9
3.3. Estudio cinético de la reacción de hidrólisis de la grasa láctea a diferentes condiciones de pH y concentración biliar.....	9
3.3.1. Diseño experimental	9
3.3.2. Tratamiento de resultados	12
3.4. Análisis estadístico de los datos	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1. Puesta a punto del método.....	16
4.1.1. Filtrado de las disoluciones de pancreatina	16
4.1.2. Influencia del tiempo de medida en la actividad enzimática	16
4.2. Influencia del tipo de enzima, pH del medio y concentración biliar en la actividad lipasa.	17
4.2.1. Comparación de la actividad específica real y teórica	18
4.2.2. Estudio del efecto de los factores experimentales en la actividad enzimática	18
4.3. Determinación de los parámetros cinéticos del SEP en distintas condiciones del medio utilizando leche como fuente de sustrato.	20
4.2.1. Estudio comparativo de la lipólisis en pH stat y kit enzimático	20
4.2.2. Caracterización cinética de la lipólisis de la grasa de la elche	22
5. CONCLUSIONES	29
6. BIBLIOGRAFÍA	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema de la producción enzimática del páncreas de un individuo sano, frente a la producción enzimática de un individuo con insuficiencia pancreática exocrina	1
Figura 1.2. Características específicas de las regiones del tracto gastrointestinal humano.....	3
Figura 3.1. Representación de las distintas etapas de la digestión <i>in vitro</i> de la leche.....	11
Figura 3.2. Representación de la evolución de la reacción medida como la adición de NaOH (mL) a lo largo del tiempo.....	13
Figura 3.3. Diagrama del análisis matemático realizado para identificar el final del periodo de activación (ta).....	13
Figura 3.4. Diagrama del cálculo de la velocidad de reacción a partir de la pendiente (pte) de las diferentes curvas de valoración.	14
Figura 4.1. Intervalos LSD (con un 95% de confianza) obtenidos del análisis estadístico (ANOVA simple) para la media de la actividad lipasa de una disolución de pancreatina porcina (1,987 g/L) antes y después de filtrar con un filtro de 1 mm de diámetro.	16
Figura 4.2. Actividad específica (UL/mg) de la disolución de SEP (2,554 g/L) a pH 6/10 mM y pH 7/ 1 mM medida a diferentes tiempos.....	16
Figura 4.3. Media y desviación típica de la actividad enzimática específica (UL/mg) de las disoluciones de pancreatina (1,987 g/L), lipasa (2,554 g/L) y SEP (2,554 g/L) en las diferentes condiciones experimentales de pH (6-8) y molaridad de la bilis (1-20 mM).....	17
Figura 4.4. Gráfico de interacciones entre molaridad de la bilis y pH (a), molaridad de la bilis y enzima (b) y entre pH y disolución enzimática (c).	19
Figura 4.5. Correlación de los datos de % de digestión de TG entre el kit enzimático y el pH stat a pH7/10 mM.....	20
Figura 4.6. Micrografías (20X) obtenidas mediante microscopía óptica de las alícuotas de la fase intestinal a diferentes tiempos, obtenidas de la digestión de leche a dos condiciones experimentales: pH 6/1 mM (a) y pH 7/10 mM (b).....	21
Figura 4.7. Curvas de progreso de la lipólisis en las diferentes condiciones experimentales.....	22
Figura 4.8. Gráficas de la velocidad de reacción ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$) frente a concentración de sustrato (triglicéridos; mM)	24
Figura 4.9. Micrografías (20X) obtenidas mediante microscopía óptica tras los 30 minutos de la fase intestinal en la cámara termostataada.....	26
Figura 4.10. Gráfico de interacciones entre pH y molaridad de la bilis resultado del análisis estadístico (ANOVA multifactorial) de los datos de k_{cat} (seg^{-1}).....	27
Figura 4.11. Gráfico de interacciones entre pH y concentración biliar según el ANOVA multifactorial de los resultados de k_{cat}/km ($\text{M}^{-1}\cdot\text{seg}^{-1}$)	27

INDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Composición de las disoluciones stock empleadas para preparar los fluidos de digestión (SGS, SIS) y el stock salival (SSS).	7
Tabla 3.2. Concentración (g/L), actividad específica (UL/mg) y condiciones evaluadas en el estudio de actividad enzimática de las disoluciones de SEP, lipasa y pancreatina.....	8
Tabla 3.3. Condiciones experimentales de pH y concentración biliar (mM) del estudio cinético de la lipólisis.....	9
Tabla 3.4. Cantidad de sustrato (g) y leche (g) evaluadas en el estudio cinético y unidades de actividad lipasa del SEP por gramo de grasa en cada condición.	10
Tabla 3.5. Composición del <i>simulated gastric fluid</i> (SGF) y el <i>simulated intestinal fluid</i> (SIF) empleados en la digestión.....	10
Tabla 3.6. Cantidad de leche (mL) y grasa (g) en cada tubo y SEP (mL) adicionado para cada punto experimental. En base al volumen final (mL) en el vaso de reacción se calculó la concentración (mg/mL) de sustrato y enzima final.	12
Tabla 4.1. Comparación de la actividad enzimática específica (UL/mg) real y teórica para las tres enzimas ensayadas (lipasa, SEP y pancreatina) a pH 8 y 10 mM.	18
Tabla 4.2. Factores experimentales, p-value y significación estadística con un 95% de confianza del análisis estadístico (ANOVA) de los datos de actividad enzimática.....	18
Tabla 4.3. Valores medios y desviación típica de la constante de Michaelis-Menten (k_m ; mM) y de la velocidad máxima (r_m ; $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$) obtenidos en cada una de las condiciones experimentales para una concentración enzimática de 0,21 g/L (8,27 UL/mL) y bondad de ajuste (R^2).	25
Tabla 4.4. Constante catalítica (K_{cat} ; seg^{-1}) y constante de especificidad (k_{cat}/k_m ; $\text{M}^{-1}\cdot\text{seg}^{-1}$) a las diferentes condiciones experimentales de pH y molaridad de la bilis.....	26
Tabla 4.5. Relación enzima: sustrato (E/S; g/g) a la que se alcanza el 95% de la velocidad máxima (r_m ; $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$) para cada una de las condiciones de pH y molaridad de la bilis ensayadas.	28

ABREVIATURAS

- ANOVA: Análisis de varianza
- Activ.: Actividad
- AGL: Ácidos grasos libres
- [E]: Concentración de enzima (mM)
- [E]₀: Concentración de enzima inicial (mM)
- E/S: Relación enzima: sustrato
- IPE: Insuficiencia pancreática exocrina
- Kcat: Constante catalítica
- Kcat/km: Constante de especificidad
- Km: Constante de Michaelis-Menten
- LSD: Least Significant Difference
- min: Minutos
- PM: Peso molecular
- Pte.: Pendiente
- r: Velocidad de reacción
- Reac.: Reacción
- r_m: Velocidad de reacción máxima
- rpm: Revoluciones por minuto
- [S]: Concentración de sustrato
- seg: Segundos
- SEP: Suplemento enzimático de pancreatina
- SGF: *Simulated gastric fluid*
- SGS: *Stock gastric solution*
- SIF: *Simulated intestinal fluid*
- SIS: *Stock intestinal solution*
- SSS: *Stock salival solution*
- ta: Tiempo de adsorción del enzima al glóbulo
- TG: Triglicéridos
- U. Ph. Eur.: Unidades de farmacopea europea
- UL: Unidades lipasa
- UV/vis: Ultravioleta-visible
- Vol.: Volumen

1. INTRODUCCIÓN

La insuficiencia pancreática exocrina (IPE) es una grave manifestación clínica que aparece asociada a varias enfermedades como son la pancreatitis crónica, la fibrosis quística, el cáncer de páncreas, así como resultado de una intervención quirúrgica (resección pancreática). La IPE se caracteriza por la incapacidad del páncreas de liberar suficiente enzima pancreática al intestino delgado, necesaria para digerir los nutrientes intraluminales (Figura 1.1). Ésta puede ocurrir debido a diversas causas como por ejemplo, una pérdida de parénquima funcional (atrofia), bloqueo del ducto pancreático o por asincronía postprandial (Sikkens et al, 2010). La falta de enzimas digestivas pancreáticas conlleva un déficit en la hidrólisis de los macronutrientes (proteínas, lípidos y glúcidos), limitando su absorción, y favoreciendo su posterior excreción en heces. Estos trastornos conocidos como maldigestión y malabsorción conducen a un estado de desnutrición en individuos con IPE de cualquier edad, y falta de crecimiento y desarrollo en niños y adolescentes (Naikwade et al., 2009).

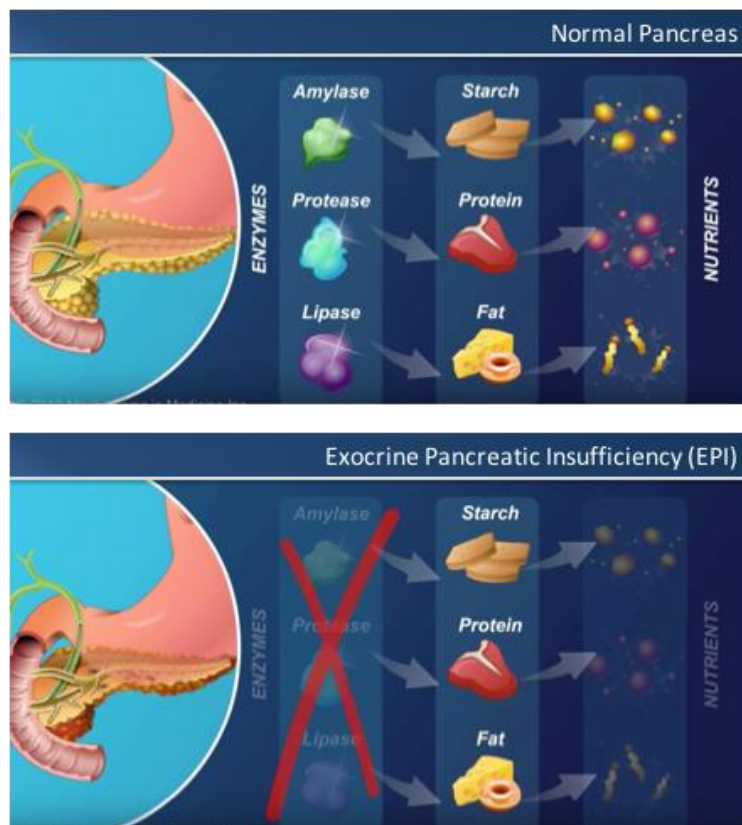


Figura 1.1. Esquema de la producción enzimática del páncreas de un individuo sano, frente a la producción enzimática de un individuo con insuficiencia pancreática exocrina. (THE NATIONAL PANCREAS FOUNDATION, 2014).

De entre los macronutrientes presentes en la dieta, los lípidos son aquellos cuya digestión está más comprometida en situaciones de IPE, puesto que esta tiene lugar mayoritariamente en la región duodenal del intestinal delgado. La mala digestión de la grasa da como resultado la esteatorrea, o secreciones lipídicas en heces, que causa síntomas como mal olor en las heces, heces de color grisáceo, calambres abdominales, hinchazón y dolor abdominal crónico (Pasquali et al., 1996; Naikwade et al., 2009). Además, la esteatorrea puede ir asociada a una pérdida de

peso debido a la pérdida de fuentes dietéticas de elevado valor energético como las grasas (38 kJ/g) (Roberts, 1989; Sikkens et al, 2010).

La terapia clínica habitual en individuos que cursan insuficiencia pancreática consiste en la administración por vía oral de enzimas pancreáticas que se extraen principalmente de fuentes porcinas. Estas preparaciones, también llamados pancrelipasa o pancreatina, presentan actividades proteasa, lipasa y amilasa que varían dependiendo de la marca (Dobrilla, 1989; Layer y Holtmann, 1994; Poustie et al., 2006; Naikwade et al., 2009). Los enzimas pancreáticos se desnaturalizan en condiciones de pH ácido propias de la etapa gástrica que tiene lugar en el estómago; por lo que se comercializan con una película polimérica gastrorresistente que permite su liberación por encima de un umbral de seguridad de pH (pH 5,0-5,5) evitando así la desnaturalización en el estómago (Sax et al., 1987; Naikwade et al., 2009). Actualmente hay disponibles varias preparaciones de pancreatina consistentes en cápsulas de gelatina que contienen mini-microesferas, gránulos o micro-comprimidos de menos de 2 mm de diámetro dotados de un recubrimiento entérico gastrorresistente. Estas preparaciones están diseñadas para promover una adecuada mezcla intragástrica de las enzimas exógenas encapsuladas con el quimo mediante la desintegración de la cápsula de gelatina y liberar las enzimas microencapsuladas en condiciones de pH duodenal. En el caso de no producirse la correcta liberación del recubrimiento entérico, puede ocurrir que la cápsula en sí, atraviese a ubicaciones distales (colon) donde el pH es alcalino y la liberación de enzimas allí puede producir efectos adversos, tales como la fibrosis del colon (Genta et al, 2001; Ferrone et al., 2007; Naikwade et al., 2009).

Las recomendaciones actuales de administración de estos suplementos se basan en evidencias limitadas, puesto que no se han realizado estudios para averiguar los factores determinantes en la efectividad de la terapia (Feiker et al., 2011). Así, las dosis óptimas por comida se desconocen y se establece una dosis diaria máxima por peso y edad del paciente (Feiker et al., 2011). Sin embargo, la realidad es que estas pautas son insuficientes, puesto que factores individuales como el tiempo de vaciado gástrico, las condiciones de acidez, el tránsito intestinal etc., así como características inherentes a los alimentos como el contenido graso, origen y perfil lipídico o la matriz estructural pueden condicionar la digestibilidad de las grasas (Borowitz et al., 2013; Rovner et al., 2013). En individuos con IPE, los factores individuales se caracterizan por una disminución de secreción de bicarbonato sódico y sales biliares al intestino delgado debido a la obstrucción del conducto pancreático por el que acceden (Layer y Keller, 2003; Whitcomb et al., 2010). En consecuencia, el pH en este tramo del tracto es más ácido (pH en torno a 6) que en individuos sanos (pH 7) mientras que la concentración biliar es inferior en individuos con IPE (1mM) que en sanos (10 mM) (Aseeri et al., 2012; Borowitz et al., 2013). Adicionalmente, el tránsito intestinal se encuentra acelerado por desajustes hormonales derivados de la maldigestión y el tiempo de vaciado gástrico está aumentado, así como la secreción ácida del mismo (Rovner et al., 2013).

Por tanto, el analizar la influencia de factores inherentes al alimento y/o al entorno duodenal en el que ha de trabajar el suplemento podría contribuir a la mejora y la adecuación del ajuste de la terapia de suplementación enzimática en individuos con insuficiencia pancreática. En este sentido, los experimentos de digestibilidad *in vitro* suponen una aproximación útil para abordar el estudio de la influencia de los factores implicados en la digestibilidad de la grasa de los alimentos, ya que permiten la reproducción del proceso gastrointestinal fisiológico de forma controlada y reproducible (Hu et al., 2010; Li et al., 2011). La digestión humana es un proceso esencial en la salud donde la comida ingerida es disgregada en nutrientes que pueden ser utilizados por el cuerpo para el crecimiento, mantenimiento celular y como fuente de energía. Durante la digestión, ocurren fundamentalmente dos procesos como son la reducción del tamaño de las partículas de comida (que tiene lugar fundamentalmente en la boca y el estómago) y la trasfor-

mación enzimática, donde las macromoléculas son hidrolizadas en constituyentes más pequeños que son absorbidos por el torrente sanguíneo (que tiene lugar fundamentalmente en el intestino delgado y grueso) (Figura 1.2). La necesidad de conocer mejor el funcionamiento del sistema digestivo, así como los problemas en cuanto a coste y dificultad técnica del estudio *in vivo* del proceso de digestión han llevado al necesario desarrollo de modelos *in vitro* que mimeticen los procesos fisiológicos que ocurren durante la digestión. Estos modelos deben ser flexibles, precisos y reproducibles (Guerra et al., 2012).

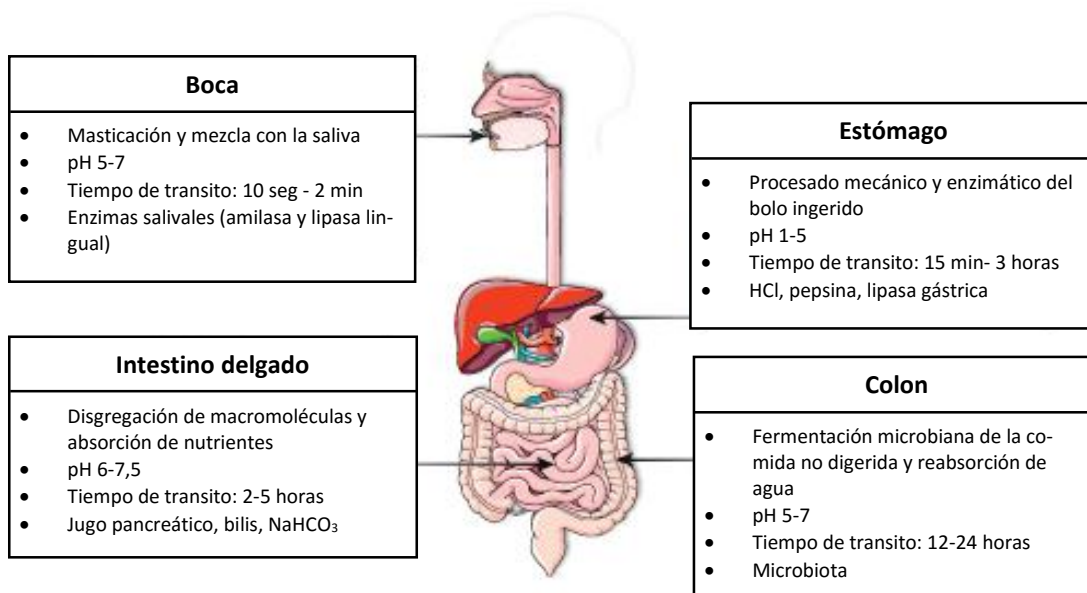


Figura 1.2. Características específicas de las regiones del tracto gastrointestinal humano. (Guerra et al., 2012)

En las últimas décadas, se han llevado a cabo múltiples intentos para modelizar el funcionamiento del estómago e intestino delgado humano. Muchos de estos modelos *in vitro* son estáticos, y consisten en una sucesión de biorreactores que tratan de recrear el ambiente que los alimentos se encuentran cuando entran a los diferentes compartimentos del tracto digestivo. En cada compartimento (boca, estómago, duodeno, etc.) el pH, la fuerza iónica y la concentración de las enzimas digestivas están previamente fijadas. Desde un punto de vista fisiológico estos modelos estáticos no son capaces de recrear la complejidad del tracto gastrointestinal ni, por lo tanto, el continuo cambio de las condiciones bioquímicas y el flujo de comida a través de los diferentes compartimentos del sistema digestivo real (Guerra et al., 2012). Sin embargo, dichos sistemas presentan importantes ventajas como la sencillez y la facilidad de manejo y el bajo coste de estos modelos como herramientas de alto rendimiento, aportando gran cantidad de información (Guerra et al., 2012). Por ello, y a pesar de las evidentes ventajas que los sistemas dinámicos aportan en el modelado de la digestión, los modelos de digestión *in vitro* estáticos son los más empleados actualmente, especialmente en aplicaciones concretas como el estudio de la digestibilidad de proteínas, almidón o lípidos.

En el caso concreto del estudio de digestibilidad de grasa en pacientes enfermos con insuficiencia pancreática exocrina, un aspecto importante a la hora de establecer la dosificación adecuada del suplemento enzimático, reside en conocer la relación enzima: sustrato óptima para la cual se obtiene la máxima digestibilidad del alimento. Para ello, existen fundamentalmente dos estrategias mediante sistemas de digestión *in vitro*. Una de ellas consiste en mantener constante la concentración de sustrato e ir incrementando la cantidad de enzima que se adiciona; obteniendo de esta manera la extensión de la lipólisis en función de la concentración inicial de en-

zima y, por consiguiente, la relación enzima: sustrato para la cual se alcanza la máxima digestibilidad del sustrato. Alternativamente, se puede estudiar la cinética de la reacción de hidrólisis enzimática fijando la concentración de enzima, y variando la de sustrato al inicio de la reacción. De esta forma, se obtendrán valores de velocidad para las diferentes concentraciones de sustrato a partir de las cuales, se podrá conocer la concentración de sustrato que satura la enzima y, por tanto, la relación enzima: sustrato óptima.

A la hora de estudiar la cinética de reacción de las lipasas en una emulsión de grasa en un medio acuoso, debe tenerse en cuenta que se trata de una reacción heterogénea en la que la enzima, al ser soluble, únicamente tienen acceso a las moléculas de sustrato situadas en la superficie de la gota de la fase dispersa (sustrato) (Román, 2005). Este hecho hace que la actividad de la enzima no dependa de la concentración molar de la enzima, sino de la concentración de sustratos en las interfases (Reis et al., 2009a). Por consiguiente, el área interfacial específica de la emulsión es un parámetro crítico en este tipo de sistemas, de igual forma que la concentración de sustrato lo es en los sistemas homogéneos. Por ello, es frecuente encontrar trabajos que estudian la cinética de las reacciones lipolíticas en emulsiones preparadas de aceite en agua, en las que el tamaño de las gotas y, por consiguiente, el área interfacial es conocida (Román, 2005). Sin embargo, para determinados sistemas heterogéneos de enorme variabilidad natural (leche, purés, yogures, etc.), conocer el tamaño de las gotas resulta complicado. Por ello, es habitual en estudios de cinética enzimática de sistemas heterogéneos el asumir que se trata de un sistema homogéneo (el sustrato se encuentra disperso por todo el volumen de reacción) y no un sistema heterogéneo, y así obviar la superficie de contacto como parámetro cinético. No obstante, sería interesante abordar en trabajos futuros el seguimiento del tamaño de los glóbulos de grasa y de las características de la interfase durante el proceso de digestión de la leche y tratar de relacionarlos con el proceso de lipólisis a fin de vincular los parámetros cinéticos con el área interfacial de las gotas de grasa.

En este sentido, en el presente trabajo se plantea el estudio de la digestibilidad de la grasa láctea, mediante un sistema de digestión estático *in vitro*, en condiciones gastrointestinales típicas de pacientes que cursan insuficiencia pancreática y mediante ensayos de cinética enzimática.

2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental del tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina (IPE) es permitir una digestión normal de los nutrientes para así asegurar un estado nutricional adecuado. Por ello, en la actualidad el tratamiento de la IPE se basa en la terapia de suplementación enzimática mediante la administración de preparados farmacológicos ricos en enzimas pancreáticas que contienen actividad lipasa, amilasa, y proteasa. No obstante, y a pesar de la mejora sustancial en el tratamiento que ha supuesto el desarrollo de la terapia de suplementación, este tratamiento no es del eficiente puesto que la dosificación se establece en función de la edad y peso del paciente sin tener en cuenta otros factores relacionados con el alimento y/o las condiciones duodenales dónde ha de actuar el suplemento. Por tanto, a fin de profundizar en el conocimiento de la actividad de las enzimas pancreáticas bajo condiciones intestinales, tanto de individuos sanos como con insuficiencia pancreática, se ha llevado a cabo el presente trabajo.

El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar la digestibilidad enzimática de la grasa láctea bajo distintas condiciones intestinales simuladas de pH y concentración biliar, a fin de obtener la relación Enzima/Sustrato (E/S) a la cual la enzima es más eficiente, y haciendo uso de un sistema de digestión *in vitro* gastrointestinal.

Para alcanzar dicho objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Comprobar la actividad del suplemento enzimático de pancreatina (SEP) empleado en el tratamiento de la IPE a diferentes condiciones de pH intestinal y concentración biliar, y compararlo con la actividad de pancreatina de origen porcino y una mezcla de lipasa:colipasa.
2. Comparar los resultados de lipólisis obtenidos mediante dos métodos de medida de ácidos grasos, un kit enzimático y el equipo de valoración ácido-base "pH-stat" para comprobar la validez del pH-stat como método directo para la determinación de la extensión de la lipólisis en alimentos.
3. Caracterizar la cinética (k_m , r_m , k_{cat} , k_{cat}/k_m) de la reacción de lipólisis utilizando el suplemento enzimático de pancreatina a diferentes condiciones intestinales simuladas de pH y concentración biliar.
4. Evaluar la influencia del pH duodenal (6, 7 y 8) y concentración de sales biliares (1, 5 y 10 mM) sobre la cinética enzimática del suplemento enzimático de pancreatina (SEP).

3. MATERIALES Y MÉTODO

3.1. Materiales y equipos

3.1.1. *Materia prima*

Para estudiar la cinética de la reacción de lipólisis catalizada por el suplemento enzimático de pancreatina (SEP) se empleó leche entera con un contenido graso del 3,6 %. La leche es un alimento naturalmente emulsionado con la componente lipídica en forma de glóbulo graso en emulsión, en una fase continua acuosa con la lactosa, vitaminas y minerales hidrosolubles disueltos en la misma. La componente proteica (micelas de caseína) se encuentra asimismo dispersas en la fase continua.

3.1.2. *Reactivos y enzimas utilizadas*

Para simular la digestión se utilizaron distintas enzimas, entre ellas la pepsina, procedente de mucosa gástrica porcina suministrada por Sigma Chemicals así como suplementos enzimáticos de pancreatina (SEP) de origen porcino (Kreon®, Abbott). El SEP se presenta en formato de gránulos recubiertos de una película entérica de gelatina, y contenidos en el interior de una cápsula. Los suplementos están disponibles en dos dosificaciones a nivel comercial, de 10.000 y 25.000 unidades lipasa (UL), empleándose la de 10.000 UL en este estudio. Cada cápsula contiene 150 mg de pancreatina porcina en forma de minimicroesferas gastroresistentes, equivalentes a: 8.000 U. Ph. Eur. amilasa, 10.000 U. Ph. Eur. lipasa y 600 U. Ph. Eur. proteasa.

Por otro lado, para estudiar la actividad enzimática del SEP, pancreatina y lipasa se empleó una disolución de pancreatina de origen porcino (50,4 UL/mg) y otra de lipasa/colipasa (10:1). La lipasa presenta una actividad en un rango de 30-90 UL/mg usando triacetina como sustrato, por lo que a la hora de realizar los cálculos se consideró que tiene la misma actividad que el SEP (39,3 UL/mg). Las enzimas mencionadas fueron suministradas por la casa comercial Sigma Chemicals.

Para simular la etapa intestinal se empleó bilis de origen bovino (Peso molecular aproximado: 440 g/mol), que actúa emulsionando la grasa facilitando de esta forma la acción del enzima.

Para preparar los fluidos empleados en la etapa gástrica (*simulated gastric fluid*; SGF) e intestinal (*simulated intestinal fluid*; SIF) se emplearon disoluciones stock que se prepararon en base a las proporciones de los componentes recogidos en la tabla 3.1 (Minekus et al., 2014). Por otro lado, en la etapa salival se empleó una disolución stock (*stock salival solution*; SSS) que simula la composición electrolítica de la saliva y cuyos componentes aparecen recogidos en la tabla 3.1. En la preparación del SSS no se añadió amilasa ya que el sustrato utilizado (leche) carece de almidón, por lo que no requiere la amilasa salival.

Tabla 3.1. Composición de las disoluciones stock empleadas para preparar los fluidos de digestión (SGS, SIS) y el stock salival (SSS).

	SSS	SGS	SIS
	vol. (mL)	vol. (mL)	vol. (mL)
KCl	30,2	13,8	13,6
KH ₂ PO ₄	7,4	1,8	1,6
NaCl	6,8	36,1	60,8
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	1	0,8	4,4
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,12	1	-
H ₂ O	954,48	946,5	919,6
Vol. Total	1000	1000	1000

3.1.3. Equipos

Para realizar la determinación de la cinética de reacción se empleó el equipo 718 STAT Titrino de la casa Methrom, conectado al software informático Tiamo 1.3. Se trata de un equipo que permite automatizar reacciones ácido-base. Para ello, se introduce la muestra en un vaso analizador con doble camisa conectado a un baño termostatado para conducir la reacción a la temperatura de trabajo deseada (37 °C). En el vaso analizador se encuentra, a su vez, una sonda de temperatura y pH, y un dosificador automático con el valorante (ácido o base). El software del equipo permite configurar diferentes métodos de trabajo seleccionando el tipo de análisis y parámetros específicos de cada uno, a través de un diagrama de flujo, que ilustra cada una de las etapas y cuyos parámetros se ajustan individualmente. En el caso particular del presente trabajo, las funciones que comprendió el análisis fueron “measure pH” en la que se monitorizó el pH del medio, “set pH” en la que el equipo añadía el volumen de valorante necesario para alcanzar el pH seleccionado como punto de partida y “pH-stat” para que el equipo añadiese valorante cuando se produjesen cambios de pH en el medio debido a la reacción que estaba ocurriendo y mantener así constante el valor de pH previamente fijado en el “set-pH”. A medida que avanza el análisis, el equipo va registrando el consumo de valorante en función del tiempo, que está directamente relacionado con la liberación de ácidos grasos al medio como consecuencia de la acción de la enzima sobre el sustrato graso.

3.2. Comparación de la actividad de SEP, lipasa y pancreatina.

3.2.1. Diseño experimental

Previamente al estudio de cinética enzimática, se realizó un estudio preliminar con el fin de comparar la actividad enzimática del SEP con la de una disolución de lipasa/colipasa (10:1) y otra de pancreatina de origen porcino a diferentes condiciones de pH y molaridad biliar para evaluar el efecto que dichas condiciones en la actividad de las distintas enzimas sobre el sustrato graso (tabla 3.2). Para llevar a cabo el estudio, se prepararon las disoluciones de las enzimas mencionadas en agua, a la concentración necesaria en cada caso para alcanzar una actividad teórica equivalente (tabla 3.2).

Para cada enzima se midió la actividad a tres valores de pH (6, 7 y 8) y a tres concentraciones de bilis: 1 mM, 10 mM y 20 mM. En el caso particular de la pancreatina, y debido a su aspecto gelatinoso tras disolver la enzima en agua, se realizó una medida extra a pH 7 y 20 mM tras haber filtrado la enzima. Para cada una de las condiciones mencionadas se realizaron tres replicas.

La determinación de la actividad se llevó a cabo en base a una modificación de un protocolo de medida de la actividad enzimática de lipasas digestivas (Carrière et al., 2000), al cual se le sustituyó la disolución de reacción (compuesta por sales y taurodesoxicolato sódico) por una solución de bilis previamente preparada (se empleó la misma disolución que la empleada en los estudios de cinética enzimática en leche). De esta manera, se adicionó 0,5 mL de tributirina (97 %) a 14,5 mL del SIF previamente preparado. Una vez ajustado la solución al pH correspondiente, se añadieron 100 µL de la disolución enzimática y se monitorizó la cantidad de valorante (NaOH 0,1 N) necesaria para neutralizar los ácidos grasos liberados por la acción del enzima durante 600 segundos.

Tabla 3.2. Concentración (g/L), actividad específica (UL/mg) y condiciones evaluadas en el estudio de actividad enzimática de las disoluciones de SEP (kreon®), lipasa y pancreatina.

Enzima	Concentración (g/L)	Activ. Teórica (UL/mL)	Activ. Específica (UL/mg)	pH	Concentración biliar (mM)
<i>SEP</i>	2,5538	100,162	39,220	6	1
					10
					20
				7	1
					10
					20
				8	1
					10
					20
<i>Lipasa/colipasa</i>	2,5538	100,162	39,220	6	1
					10
					20
				7	1
					10
					20
				8	1
					10
					20
<i>Pancreatina</i>	1,9874	100,162	50,398	6	1
					10
					20
				7	1
					10
					20
				8	1
					10
					20

3.2.2. Tratamiento de resultados

Una vez obtenida la curva de valoración en los primeros 600 segundos se calculó la actividad enzimática a partir de la pendiente de la curva en el tramo inicial (primeros 300 segundos). A partir de la pendiente se obtuvo la actividad enzimática (UL), sabiendo que 1 UL equivale a 1 μmol de ácido butírico liberado por minuto a 37 °C (Carrière et al., 2000). Teniendo en cuenta que en nuestro vaso de reacción tenemos 100 μL de la disolución enzimática de concentración conocida, se obtuvieron los mg de enzima presentes en el vaso y con ello se obtuvo la actividad enzimática específica (UL/mg).

3.3. Estudio cinético de la reacción de hidrólisis de la grasa láctea a diferentes condiciones de pH y concentración biliar

3.3.1. Diseño experimental

La cinética de la reacción de hidrólisis de la grasa láctea se ensayó a diferentes condiciones experimentales (pH y concentración biliar) a fin de evaluar el efecto de las mismas en la cinética de la reacción enzimática del SEP en la etapa intestinal. La tabla 3.3 recoge las condiciones experimentales ensayadas en el experimento. Los valores de pH seleccionados son aquellos que se encuentran en el rango de mayor actividad de la enzima y que a su vez corresponden a valores cercanos al pH fisiológico del intestino delgado (pH 6-7,5) (Etienne-Mesmin et al., 2012). Se ensayaron tres concentraciones biliares: baja (1 mM), intermedia (5 mM) y alta (10mM). La concentración más baja (1 mM), es la presentada por sujetos con fibrosis quística (Aseeri et al., 2012; Borowitz et al., 2013), mientras que la alta (10 mM) es propia de un individuo sano (Charman y Stella, 1992). Adicionalmente, se evaluó una concentración biliar intermedia para obtener mayor información sobre la influencia de este parámetro sobre la cinética enzimática. Cada una de las condiciones ensayadas se llevó a cabo por duplicado.

Tabla 3.3. Condiciones experimentales de pH y concentración biliar (mM) del estudio cinético de la lipólisis.

pH	Concentración biliar (mM)
6	10 mM
	1 mM
7	10 mM
	5 mM
	1 mM
8	10 mM
	1 mM

Para cada una de las condiciones previamente descritas, se midió la cinética (véase apartado 3.3.2.) a diferentes concentraciones de sustrato. Teniendo en cuenta que la dosis de suplementación enzimática recomendada en pacientes con IPE se encuentra en un rango de 2000-4000 UL/g (Turck et al., 2016), se procedió a seleccionar un intervalo de concentraciones de grasa en un rango más amplio al previamente citado (tabla 3.4). De esta forma se logró caracterizar la cinética de lipólisis de una forma más representativa.

Tabla 3.4. Cantidad de sustrato (g) y leche (g) evaluadas en el estudio cinético y unidades de actividad lipasa del SEP por gramo de grasa en cada condición.

g grasa/tubo	Masa alimento (g)	UL SEP/g grasa
0,05	1,389	6000
0,10	2,778	3000
0,15	4,167	2000
0,20	5,556	1500
0,25	6,944	1200
0,30	8,333	1000
0,40	11,111	750
0,50	13,889	600
0,60	16,667	500
0,70	19,444	430

Digestión in vitro

Para cada una de las condiciones experimentales descritas anteriormente se midieron las cantidades de leche indicadas previamente y se introdujeron en tubos Falcon de 50 mL (T1-T10). Cada uno de estos tubos se sometió a un proceso de digestión *in vitro*. El método *in vitro* utilizado está basado en un protocolo consensuado internacionalmente por la ACTIONCOST INFOGEST de simulación del proceso gastrointestinal en tres etapas: oral, gástrica e intestinal (Minekus et al., 2014) (figura 3.1.). Sobre este protocolo se han realizado modificaciones del valor de pH en la etapa intestinal y en la concentración del fluido biliar adaptándolo a los valores correspondientes de cada condición experimental. Las composiciones de los fluidos preparados para la simulación de cada una de las etapas del proceso de digestión se indican en la Tabla 3.5. Para su elaboración se emplearon las disoluciones stock salival (SSS) y gástrica (SGS), así como una disolución de pepsina de concentración 6,25 g/L para la formulación del fluido gástrico (SGF).

Tabla 3.5. Composición del *simulated gastric fluid* (SGF) y el *simulated intestinal fluid* (SIF) empleados en la digestión. El pH de ambos fluidos está ajustado de forma que el SGF presenta un pH menor a 3 y el pH del intestinal está ajustado en función de la condición a evaluar (6, 7 u 8).

	SGF	SIF
	Vol. (mL)	Vol. (mL)
SGS	375	-
SIS	-	387,50
pepsina	6,67	-
bilis (mg)*	-	437,50
CaCl ₂	0,30	1
H ₂ O	118,03	111,50
Volumen final	500	500

* La cantidad de bilis indicada corresponde a la bilis de concentración 1 mM.

Salival

SSS: Se mezcla el alimento con el SSS que simula la composición electrolítica de la saliva.

- Leche+5 mL SSS

Gástrico

SGF: El SGF contienen pepsina que digiere las proteínas de la leche.

- Leche+9 mL de SGF
- pH<3
- 2 horas en agitación a 37 °C



Intestinal

SIF: El SIF contiene la bilis de origen bovino disuelta en una solución electrolítica que simula el fluido intestinal.

- 18 mL de SIF
- Ajustar pH con NaOH y HCl 1N
- Suplemento enzimático (0,21 g/L)
- Valoración con NaOH 0,05N

Figura 3.1. Representación de las distintas etapas de la digestión *in vitro* de la leche. Para cada una de las etapas se empleó un fluido diferente para simular las condiciones propias de cada etapa (SSS: *simulated salival stock*, SGF: *simulated gastric fluid*; SIF: *simulated intestinal fluid*).

1. Etapa salival

Previamente a la etapa gástrica, se añadió un volumen de 5 mL de stock salival (SSS) a cada uno de los tubos previamente llenados con leche para simular la etapa oral y se mantuvo a 37 °C sin agitación durante 5 minutos.

2. Etapa gástrica

Una vez transcurrido este tiempo, se adicionaron 9 mL de SGF y se ajustó el pH a 3 mediante la adición de HCl 1 N para, de este modo reproducir las condiciones propias de la etapa gástrica. Por último, los tubos se introdujeron en una cámara termostataada (SELECTA modelo Boxcult 3000957) a temperatura controlada de 37 °C y se mantuvieron en agitación rotacional de arriba-abajo (55 rpm) durante 120 minutos (agitador modelo Intelli-Mixer RM-2).

3. Etapa intestinal

Una vez transcurrido el tiempo indicado de la fase gástrica, se procedió a medir la cinética de la reacción de lipólisis durante la fase intestinal. A diferencia de la anterior, esta fase se llevó a cabo en el 718 STAT Titrino, un equipo que, como ha sido comentado previamente, permite seguir la valoración de los ácidos grasos liberados a lo largo del tiempo. Para ello, se procedió a extraer los tubos de la cámara termostataada que hacía las veces de digestor y el digerido resultante de la fase gástrica se transfirió al vaso del equipo. A continuación, se adicionaron los 18 mL de SIF de la siguiente forma: primeramente, se adicionaron 10 mL del SIF y se ajustó dicha mezcla al valor de pH de la condición experimental correspondiente (6, 7 u 8) mediante el uso de NaOH 1N. Para no alterar la concentración de enzima final, se tuvo en cuenta ese volumen adicional añadido a la hora de añadir los siguientes 8 mL de SIF.

Una vez ajustado el pH y añadida la bilis, se procedió a la adición del correspondiente volumen de SEP (tabla 3.6). Debido a que al aumentar la cantidad de leche en el tubo aumenta el volumen, fue necesario ir incrementando el volumen de solución de SEP que se adiciona en la etapa intestinal a fin de mantener una concentración constante de enzima de 0,21 g/L (8,27 UL/mL).

Tabla 3.6. Cantidad de leche (mL) y grasa (g) en cada tubo y SEP (mL) adicionado para cada punto experimental. En base al volumen final (mL) en el vaso de reacción se calculó la concentración (mg/mL) de sustrato y enzima final.

Tubo	Masa grasa (g)	Vol. Muestra (mL)	Vol. SEP (mL)	Volumen final (mL)*	[S] (mg/mL)	[E] (mg/ml)
T1	0,05	1,348	3,00	36,360	1,375	0,21
T2	0,10	2,697	3,11	37,720	2,651	0,21
T3	0,15	4,045	3,22	39,049	3,841	0,21
T4	0,20	5,394	3,33	40,394	4,951	0,21
T5	0,25	6,742	3,45	41,740	5,989	0,21
T6	0,30	8,091	3,56	43,115	6,958	0,21
T7	0,40	10,787	3,78	45,793	8,735	0,21
T8	0,50	13,484	4,00	48,485	10,312	0,21
T9	0,60	16,181	4,22	51,188	11,721	0,21
T10	0,70	18,878	4,45	53,880	12,992	0,21

*El volumen final corresponde al volumen total en el vaso de reacción que incluye: la muestra, 5 mL de SSS, 9 mL de SGF, 18 mL de SIF y el correspondiente volumen de SEP adicionado.

Tras la adición del correspondiente volumen de SEP, se utilizó la función “pH-stat” del programa Tiamo para mantener constante el valor de pH deseado mediante la adición de valorante NaOH 0,05 N, simulando así las condiciones intestinales a las que trabajará la enzima. De esta forma, se compensa la disminución de pH debida a la liberación de ácidos grasos libres (AGL) al medio como consecuencia de la hidrólisis de las grasas con la adición del correspondiente volumen de NaOH 0,05N como valorante. La duración de esta etapa fue de 30 minutos. Aunque la duración de la etapa intestinal a nivel fisiológico es mayor, a efectos de cinética enzimática, 30 minutos fueron suficientes para obtener el tramo lineal de máxima pendiente que proporciona los valores de velocidad máxima para las diferentes relaciones enzima: sustrato.

Paralelamente, se procedió a realizar dos digestiones a diferentes condiciones experimentales (pH 6/1 mM y pH7/10 mM), sustituyendo la etapa intestinal en el equipo de valoración por una etapa equivalente en la cámara de temperatura controlada. Ambas digestiones se realizaron exclusivamente para el punto de 0,3 g (T6), siguiendo el procedimiento previamente detallado. Durante la etapa intestinal se tomaron alícuotas (100 µL) a diferentes tiempos (0; 5; 10; 25; 30 min). Posteriormente, las alícuotas extraídas se analizaron mediante un kit de ensayo enzimático (*Roche Diagnostics*) determinando la absorbancia a 546 nm mediante un espectrofotómetro UV/vis (*Beckman Coulter*).

Por otro lado, se realizaron análisis de microscopía a los mismos tiempos. Para ello se tomaron alícuotas (400 µL) y se mezclaron con una disolución de Red Oil (5% isopropanol) en una proporción 4:1, se vortió durante 10 segundos y se incubó durante 10 minutos a 37 °C. Seguidamente se tomó una gota de la mezcla y se colocó sobre 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). Adicionalmente, para las muestras a las condiciones simuladas de pH 6 y pH 8 (1 y 10 mM) se procedió a analizar alícuotas (400 µL) obtenidas a los 30 minutos de fase intestinal y se visualizaron por microscopía óptica siguiendo el procedimiento descrito.

3.3.2. Tratamiento de resultados

Una vez obtenida la curva de hidrólisis de los triglicéridos de la leche durante los primeros 30 minutos, se procedió a realizar el análisis cinético de la reacción. Como se puede observar en la figura 3.2, la curva de hidrólisis presenta tres regiones: una zona de activación interfacial que

corresponde con el tiempo en el que la enzima se une a la interfase y comienza a catalizar la reacción, un periodo de velocidad constante donde se alcanza la velocidad máxima y un periodo de velocidad decreciente.

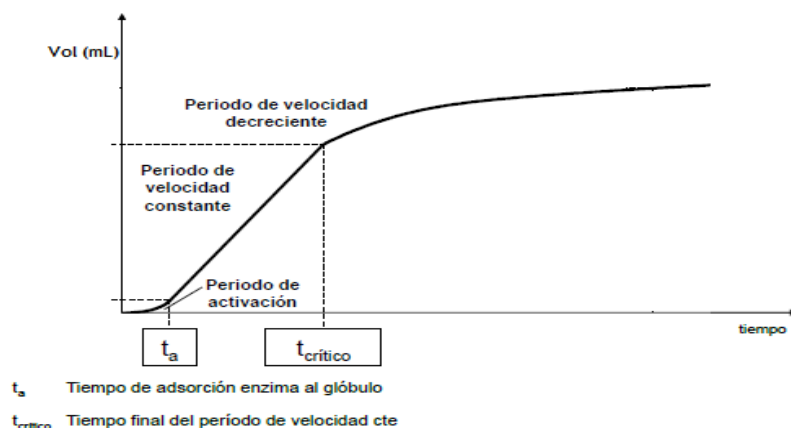


Figura 3.2. Representación de la evolución de la reacción medida como la adición de NaOH (mL) a lo largo del tiempo. En ella se muestran las tres regiones típicas de una curva de lipólisis: periodo de activación (hasta el tiempo de adsorción al glóbulo; t_a), periodo de velocidad constante (hasta $t_{crítico}$) y periodo de velocidad decreciente.

Para localizar el punto en el que termina el periodo de activación interfacial y comienza el tramo de velocidad constante es necesario identificar el momento en el que la pendiente de la curva sufre una mayor variación. Para ello, se tomaron intervalos móviles de 3-5 puntos con respecto a cada punto experimental obtenido. Seguidamente se realizaron ajustes lineales a cada intervalo con el fin de obtener la velocidad de reacción en cada punto. A continuación, se procedió a calcular el cociente entre la pendiente de cada punto y la del inmediatamente anterior. El mayor cociente corresponderá al punto en el que culmina la fase de activación interfacial y se inicia la fase de velocidad constante (figura 3.3).

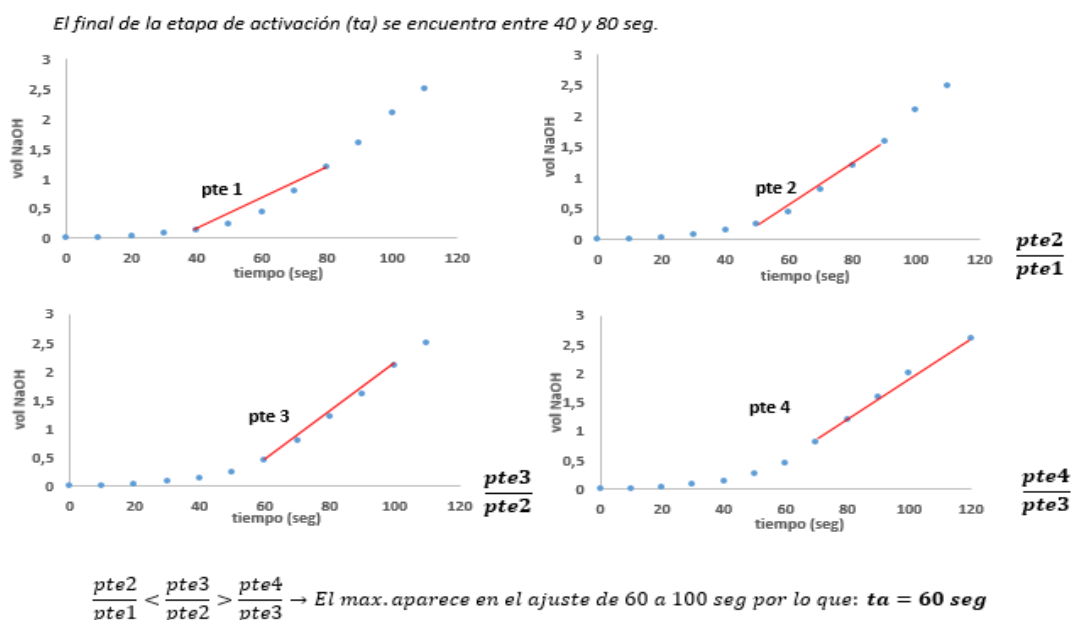


Figura 3.3. Diagrama del análisis matemático realizado para identificar el final del periodo de activación (t_a). Los puntos en azul corresponden a la medida obtenida en la valorización por el método pH-stat y la recta en roja corresponde al ajuste lineal de los puntos. Para determinar el final de la etapa de activación se hicieron ajustes lineales (5 puntos) en cada punto experimental y se calculó el cociente entre cada pendiente y la inmediatamente anterior. El máximo cociente ($pte3/pte2$) nos proporciona el t_a (60 seg), que será aquel punto experimental usado para calcular la pendiente del numerador del cociente ($pte3$).

Una vez identificado el punto en el que se inicia la fase de velocidad constante, se procedió a calcular la velocidad máxima de reacción, que corresponde a la pendiente del tramo de velocidad constante. Para ello se realizaron sucesivos ajustes lineales por mínimos cuadrados desde el punto en el que comienza el tramo lineal e incorporando sucesivamente nuevos puntos hasta que la pendiente comienza a decrecer, momento en el cual, la velocidad deja de ser máxima (figura 3.4).

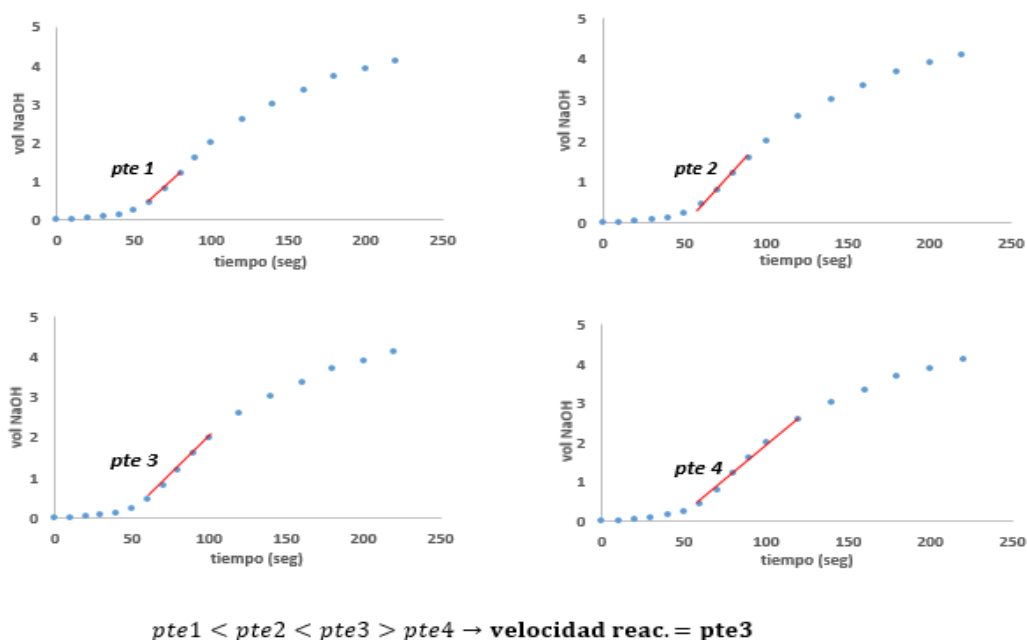


Figura 3.4. Diagrama del cálculo de la velocidad de reacción a partir de la pendiente (pte) de las diferentes curvas de valoración. Los puntos azules corresponden a la medida obtenida en la valoración por el método del pH-stat y la recta roja corresponde al ajuste lineal de los puntos experimentales. Para calcular la velocidad de reacción se hicieron ajustes lineales partiendo de un punto fijo (t_a) y se calculó la pendiente de cada ajuste, añadiendo sucesivamente un punto experimental a dicho ajuste. La pendiente del ajuste a partir del cual comienza a disminuir su valor (pte3) corresponde con la velocidad de reacción.

De esta forma se obtuvo la pendiente de la curva de valoración para las diferentes concentraciones de sustrato ensayadas a las distintas condiciones de pH y concentración de sales biliares, y se calculó la velocidad en base a la ecuación 1.

$$vel. \text{reacción} \left(\frac{\mu\text{mol FFA}}{\text{min}\cdot\text{mL}} \right) = \frac{pte.máx. \left(\frac{\text{ml NaOH}}{\text{min}} \right)}{vol. \text{reacción} (\text{mL})} \cdot \frac{0,05 \text{ mol NaOH}}{1000 \text{ ml NaOH}} \cdot \frac{10^6 \mu\text{mol FFA}}{1 \text{ mol NaOH}} \quad \text{ecuación 1}$$

Una vez obtenidas las velocidades a las diferentes concentraciones de sustrato se procedió a ajustar el modelo de Michaelis-Menten (ecuación 2).

$$r = \frac{r_m \cdot [S]}{k_m + [S]} \quad \text{ecuación 2}$$

Donde:

- r : velocidad de reacción ($\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$)
- r_m : velocidad de reacción máxima ($\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$)
- k_m : constante de Michaelis-Menten (mM)
- $[S]$: concentración de Sustrato inicial (mM)

Para ajustar los datos experimentales a la ecuación 2, se realizaron 3 ajustes: un ajuste por optimización con solver, una linealización de Lineweaver-Burk (ecuación 3) y una linealización de Lagmuir (ecuación 4). Para cada condición, se seleccionó aquel ajuste de entre los tres mencionados que presentara una mayor R^2 y, por consiguiente, aquel que explicara con mayor exactitud la variabilidad de los datos.

$$\frac{1}{r} = \frac{km}{rm} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{rm} \quad \text{ecuación 3}$$

$$\frac{s}{r} = \frac{km}{rm} + \frac{s}{rm} \quad \text{ecuación 4}$$

Una vez obtenidos los datos de km y rm , se procedió a calcular la constante catalítica ($kcat$) y la constante de especificidad ($kcat/km$). La constante catalítica o número de recambio mide la cantidad máxima de moléculas sustrato transformadas a producto por unidad de tiempo y por molécula de enzima o número de sitios activos. El número de recambio se calcula mediante la ecuación 5 y se mide en s^{-1} . Por otro lado, la constante de especificidad es una medida de la eficiencia de una enzima, ya que la velocidad de la reacción se encuentra directamente relacionada con la frecuencia con la que se encuentran las moléculas de enzima y sustrato, y con cuan eficientemente se unen en solución. Por tanto, la constante de especificidad es una medida de la especificidad de una enzima por determinado sustrato y se calcula con la ecuación 6.

$$kcat = \frac{rm}{[E]_0} \quad \text{ecuación 5}$$

Donde:

- $Kcat$: constante catalítica (s^{-1})
- $[E]_0$: Concentración de enzima inicial (mM)

$$cte. \text{ especificidad} = \frac{kcat}{km} \quad \text{ecuación 6}$$

3.4. Análisis estadístico de los datos

Para realizar el análisis estadístico de los resultados de actividad enzimática y de cinética enzimática (km , rm , $kcat$, $kcat/km$), se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA, unifactorial y multifactorial), con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0,05$). Para realizar dichos análisis se utilizó el programa "Statgraphics Centurion XVI".

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Puesta a punto del método

4.1.1. Filtrado de las disoluciones de pancreatina

En el caso particular de la pancreatina, y debido a las características de la disolución resultante, se procedió a medir la actividad enzimática (pH 7 y concentración biliar 10 mM) antes y después de filtrar la disolución (Figura 4.1). El análisis estadístico de los resultados reveló una disminución significativa de la actividad enzimática después del filtrado (p-value: 0.0134).

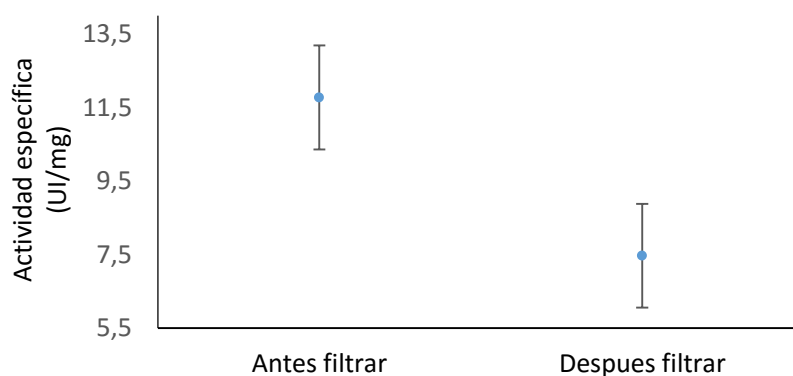


Figura 4.1. Intervalos LSD (con un 95% de confianza) obtenidos del análisis estadístico (ANOVA simple) para la media de la actividad lipasa de una disolución de pancreatina porcina (1,987 g/L) antes y después de filtrar con un filtro de 1 mm de diámetro.

Dado que el filtrado de la disolución enzimática disminuye significativamente la actividad de la disolución, se decidió trabajar con disoluciones sin filtrar y cuantificando la actividad enzimática específica de la disolución en dichas disoluciones.

4.1.2. Influencia del tiempo de medida en la actividad enzimática

Para evaluar la estabilidad de la actividad enzimática de las disoluciones durante el tiempo posterior a su preparación, se midió la actividad específica de la disolución de SEP a distintos tiempos en dos condiciones de pH y concentración biliar (pH 7/1 mM y pH 6/10 mM) (Figura 4.2).

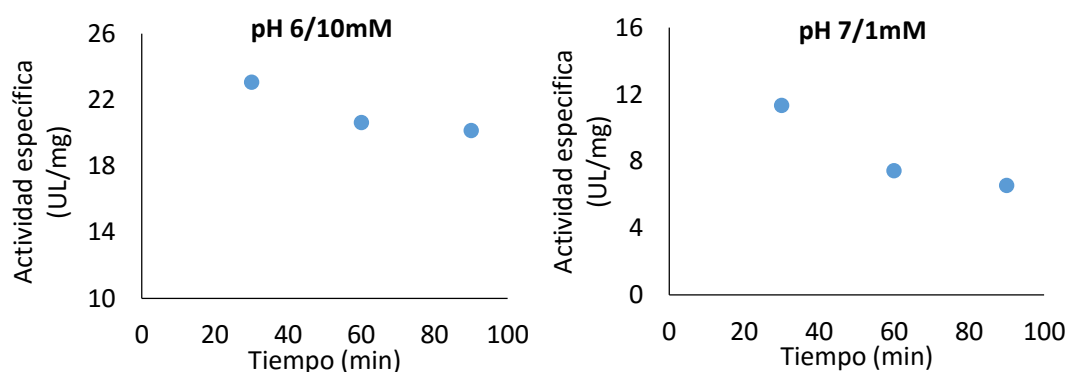


Figura 4.2. Actividad específica (UL/mg) de la disolución de SEP (2,554 g/L) a pH 6/10 mM y pH 7/ 1 mM medida a diferentes tiempos. Se consideró como tiempo 0 el momento de preparación de la disolución.

Como se puede observar en la figura 4.2, la actividad lipasa de la disolución del SEP disminuyó durante los primeros 60 minutos independientemente del pH utilizado y de la concentración biliar. A partir de este momento, la actividad enzimática parece estabilizarse al menos en el intervalo de tiempo analizado. En base a estos resultados, se estableció un tiempo de reposo de 60 minutos para las disoluciones utilizadas en las experiencias posteriores de cinética enzimática, con el objetivo de trabajar en condiciones de actividad más controladas.

4.2. Influencia del tipo de enzima, pH del medio y concentración biliar en la actividad lipasa.

Tal y como se ha explicado en el apartado de materiales y métodos, la actividad enzimática específica de las disoluciones enzimáticas preparadas se calculó mediante la pendiente del tramo inicial de la curva obtenida durante la valoración de los ácidos grasos libres (AGL) liberados durante la hidrólisis de la tributirina, teniendo en cuenta que 1 U equivale a 1 μmol de ácido butírico liberado por minuto a 37 °C (Carrière et al., 2000). La figura 4.3. muestra los resultados obtenidos del ensayo de actividad lipasa de las tres disoluciones enzimáticas en diferentes condiciones experimentales del medio.

Con el fin de comprobar la existencia de diferencias significativas en la actividad enzimática debidas a las diferentes condiciones ensayadas, se realizó un análisis estadístico de la varianza simple (ANOVA) (figura 4.3). De esta forma se logró identificar las condiciones a las cuales la actividad de las enzimas es mayor (concentración biliar 10 mM y pH 8). Previamente al ANOVA, se comprobó que se cumplían los requisitos previos de distribución normal de los residuos y homocedasticidad (McDonald, 2009).

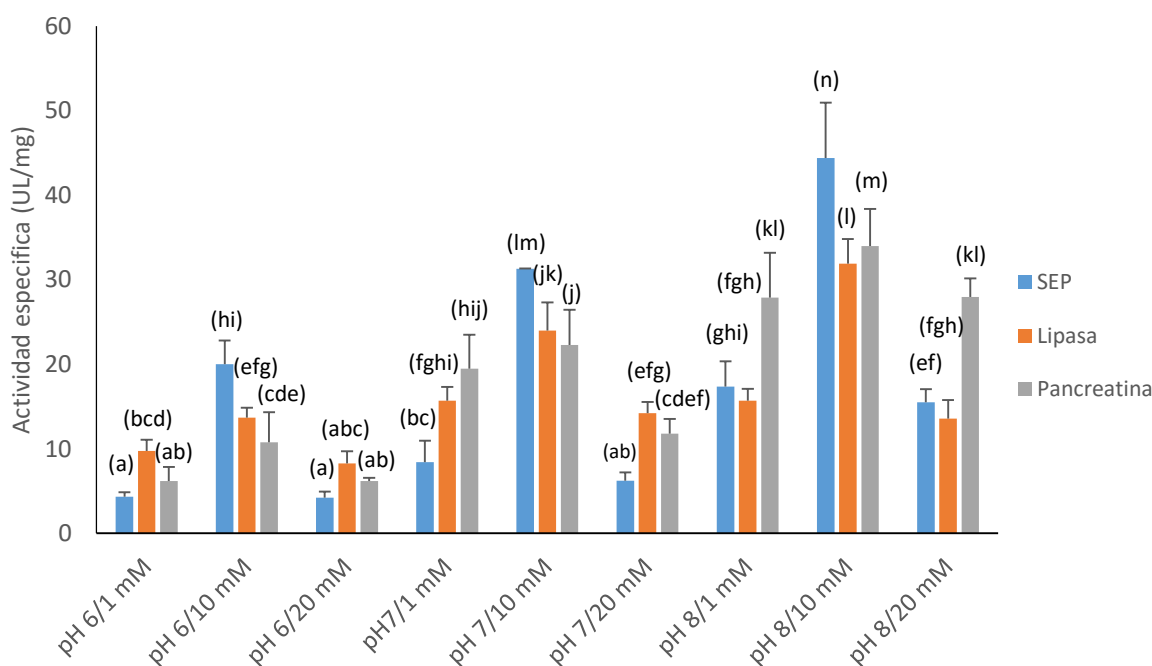


Figura 4.3. Media y desviación típica de la actividad enzimática específica (UL/mg) de las disoluciones de pancreatina (1,987 g/L), lipasa (2,554 g/L) y SEP (2,554 g/L) en las diferentes condiciones experimentales de pH (6-8) y molaridad de la bilis (1-20 mM). La actividad específica se midió a partir de la pendiente de la curva de valoración con NaOH 0,1 N del ácido butírico generado en la reacción. Las letras (a-n) representan los catorce grupos homogéneos obtenidos tras el análisis estadístico (ANOVA simple) de los datos de actividad enzimática de cada enzima a las diferentes condiciones experimentales (eje x).

4.2.1. Comparación de la actividad específica real y teórica

Las disoluciones de las tres enzimas ensayadas, fueron preparadas de modo que todas ellas tuvieran la misma actividad teórica (100,16 UL/mL), y por consiguiente diferente actividad específica: SEP (39,22 UL/mg), lipasa (39,22 UL/mg) y pancreatina porcina (50,39 UL/mg). La actividad específica real se determinó experimentalmente y se comparó con su correspondiente actividad teórica. Si se comparan los resultados de actividad medidos a pH 8 y 10 mM (máxima actividad específica entre todas las condiciones ensayadas), se observa que la disolución de SEP presentaba una actividad real similar a la teórica (tabla 4.1.), mientras que para la lipasa y la pancreatina presentaron valores de actividad específica por debajo de la teórica (ratio actividad menor al 100%).

Tabla 4.1. Comparación de la actividad enzimática específica (UL/mg) real y teórica para las tres enzimas ensayadas (lipasa, SEP y pancreatina) a pH 8 y 10 mM.

Enzima	Actividad real (UL/mg)	Actividad teórica (UL/mg)	Ratio Actividad* (%)
SEP	44,390 ± 6,558	39,220	113,180 ± 16,721
Lipasa	31,896 ± 2,929	39,220	81,323 ± 7,468
Pancreatina	33,997 ± 4,371	50,390	67,457 ± 8,674

*El ratio de actividad representa el cociente entre la actividad real y la teórica expresada en porcentaje.

4.2.2. Estudio del efecto de los factores experimentales en la actividad enzimática

Para evaluar el efecto de los factores experimentales en la actividad enzimática se realizó un análisis de la varianza (ANOVA multifactorial) con 3 factores (enzima, pH y concentración biliar) y se estudió la significación estadística de estos factores y sus interacciones en la actividad enzimática. Los resultados del análisis estadístico pusieron de manifiesto que tanto el tipo de enzima como el pH y la concentración biliar, así como sus interacciones, influyen de manera significativa en la actividad enzimática (tabla 4.2). La figura 4.4. muestra el gráfico de interacciones entre pH, molaridad y tipo de enzima; en ellos puede observarse como el efecto de cada uno de los factores experimentales sobre la actividad enzimática varía en los diferentes niveles del otro factor, indicativo de que las interacciones entre factores son significativas.

Tabla 4.2. Factores experimentales, p-value y significación estadística con un 95% de confianza del análisis estadístico (ANOVA) de los datos de actividad enzimática.

Factor	p-value	Significación estadística (95 %)
A: Enzima	0,0053	SÍ
B: pH	0,0000	SÍ
C: Molaridad	0,0000	SÍ
AB	0,0000	SÍ
AC	0,0000	SÍ
BC	0,0000	SÍ
ABC	0,0156	SÍ

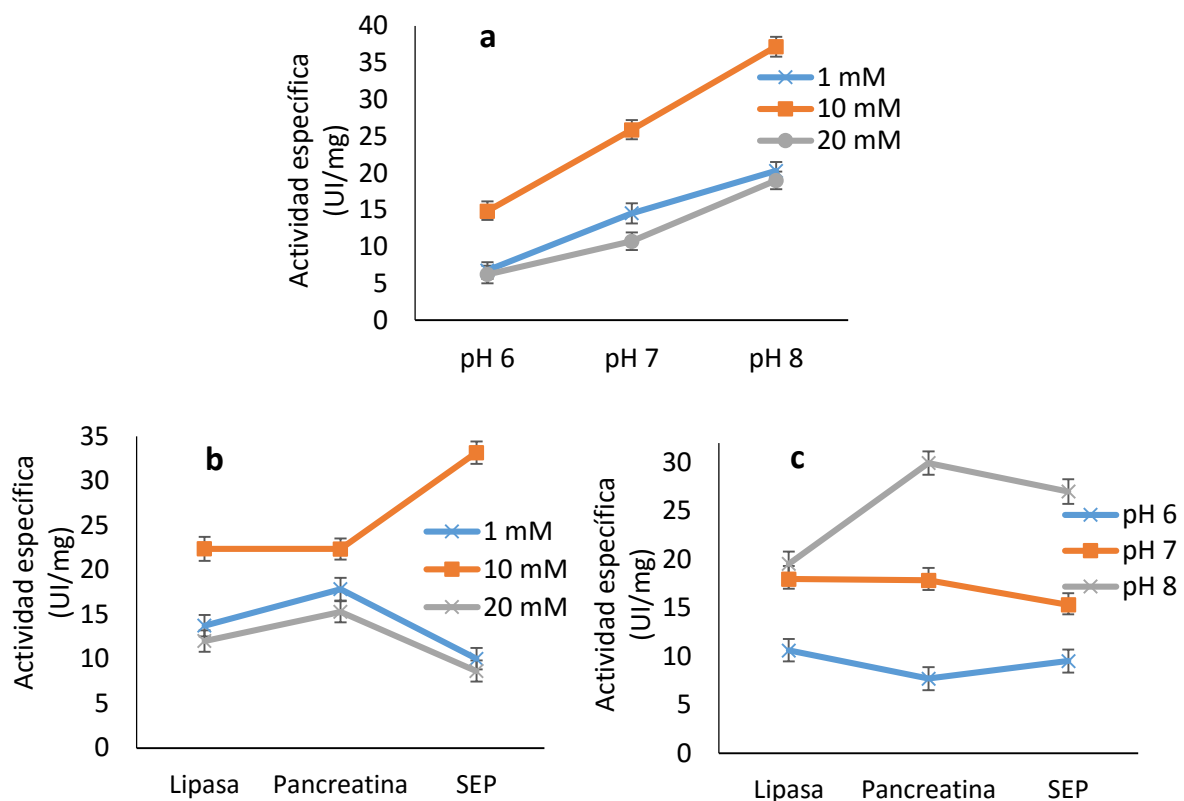


Figura 4.4. Gráfico de interacciones entre molaridad de la bilis y pH (a), molaridad de la bilis y enzima (b) y entre pH y disolución enzimática (c). Los gráficos de interacciones se obtuvieron del estudio estadístico (ANOVA multifactorial) de los resultados de actividad específica (UI/mg) de las disoluciones enzimáticas de lipasa (2,554 g/L), SEP (2,554 g/L) y pancreatina porcina (1,987 g/L).

Como se puede observar en las figuras 4.4.a y 4.4.b, al aumentar la concentración biliar hasta valores de 10 mM se produjo un aumento significativo de la actividad enzimática en todos los valores de pH. En cambio, cuando la concentración biliar aumentó a 20 mM se observó un descenso de la actividad específica. Este descenso en la actividad enzimática probablemente es debido a un efecto inhibitorio por elevada concentración de sales biliares. Dicho efecto inhibitorio durante la digestión de lípidos por las sales biliares ha sido anteriormente atribuido a la capacidad de las sales biliares de desplazar la lipasa de la interfaz aceite-agua, evitando de este modo que la enzima entre en contacto con el sustrato lipídico (Patton y Carey, 1981; Lowe, 2002; Bauer et al., 2005; Reis et al., 2009b; Li et al., 2011). Se ha demostrado, que la colipasa, presente en las disoluciones enzimáticas, actúa revirtiendo este efecto y restaurando de esta forma la actividad lipasa (Bauer et al., 2005; Li et al., 2011). Sin embargo, cuando las sales biliares están en exceso, la colipasa no es suficiente para revertir el efecto inhibitorio con el consiguiente descenso de la actividad enzimática.

En cuanto a la influencia del pH en la actividad específica de las enzimas, se puede observar un incremento en la misma conforme aumenta el pH de 6 a 8, alcanzándose un máximo a pH 8 en el caso de la pancreatina y en el SEP, mientras que en el caso de la lipasa, la diferencia de actividad específica entre pH 7 y 8 no es significativa. Este resultado concuerda con la literatura, ya que el pH óptimo para las lipasas se encuentra generalmente en el intervalo 7 - 9 cuando la actividad enzimática se ensaya frente a sus sustratos específicos, como la tributirina, así como otros triacilglicéridos pequeños o la trioleína (Rúa et al., 1993; Prazeres et al., 1996, González-Bacerio et al., 2010).

Por último, cabe destacar que, la máxima actividad específica de las distintas enzimas dependió de las condiciones ensayadas. Así, por ejemplo, a una concentración biliar de 10 mM el SEP presentó la mayor actividad enzimática, independientemente del pH ensayado (figura 4.4.b). Sin embargo, a concentraciones biliares de 1 mM y 20 mM, la enzima con mayor actividad específica fue la pancreatina, seguida de la lipasa y el SEP.

4.3. Determinación de los parámetros cinéticos del SEP en distintas condiciones del medio utilizando leche como fuente de sustrato.

4.2.1. Estudio comparativo de la lipólisis en pH-stat y kit enzimático

A fin de comprobar la correlación existente entre el kit enzimático y el pH-stat, se procedió a medir los ácidos grasos libres digeridos a diferentes tiempos (0-30 min) a dos condiciones experimentales diferentes (pH 6/1 mM y pH 7/10 mM) (figura 4.5).

En el caso de la muestra a pH 6/1 mM, la cantidad de ácidos grasos libres hidrolizados durante los primeros 30 minutos de la fase intestinal no fue suficiente para su detección mediante el kit enzimático. Esto es debido a la baja velocidad de lipólisis a estas condiciones, ya que como se puede observar en la figura 4.6.a, a pH 6/1 mM pueden detectarse fácilmente grandes glóbulos de grasas durante los 30 minutos que duró la fase intestinal. Esto indica que la reacción de lipólisis transcurre lentamente y por consiguiente la cantidad de grasa digerida durante los 30 minutos de la fase intestinal es muy baja.

En cambio, en las condiciones intestinales simuladas de pH 7/10 mM, la mayor velocidad de hidrólisis permitió la detección y cuantificación de los ácidos grasos liberados mediante el kit enzimático. De hecho, si se observa la figura 4.6.b, se puede constatar que a pH 7/10 mM, la reacción de lipólisis transcurre mucho más rápido, de forma que a partir de los 5-10 minutos ya no hay glóbulos de grasa visibles. Esto indica que la cinética de reacción es mayor que en las condiciones anteriores.

La figura 4.5, muestra los resultados obtenidos mediante el pH-stat frente a los obtenidos con el kit enzimático en las condiciones intestinales pH 7/ 10 mM. Como se puede observar, existe una correlación lineal entre los datos obtenidos con el kit y los obtenidos con el pH-stat. De esta forma, se puede asumir que las variaciones de pH registradas en el pH-stat son debidas exclusivamente a la generación de ácidos grasos libres como consecuencia de la lipólisis de la grasa de la leche.

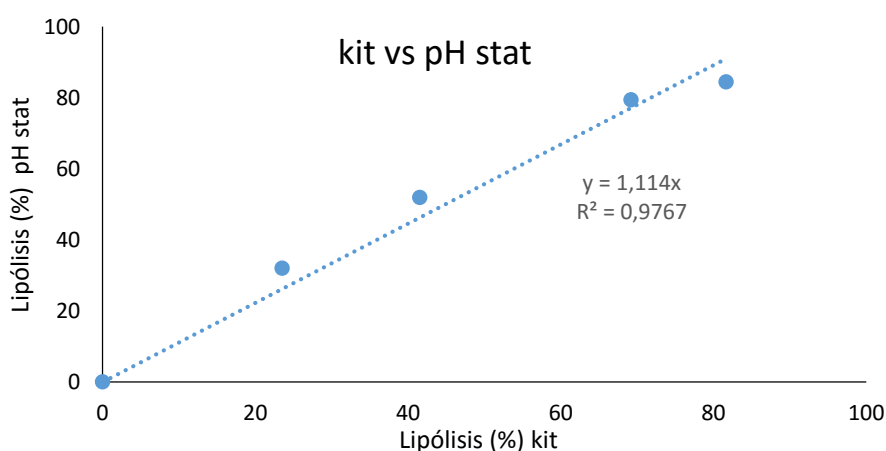


Figura 4.5. Correlación de los datos de % de digestión de triglicéridos (TG) entre el kit enzimático y el pH-stat a pH 7/10 mM. Los puntos azules correlacionan el % de TG digeridos medidos a 5 tiempos distintos (0, 5, 10, 25 y 30 minutos desde el inicio de la fase intestinal).

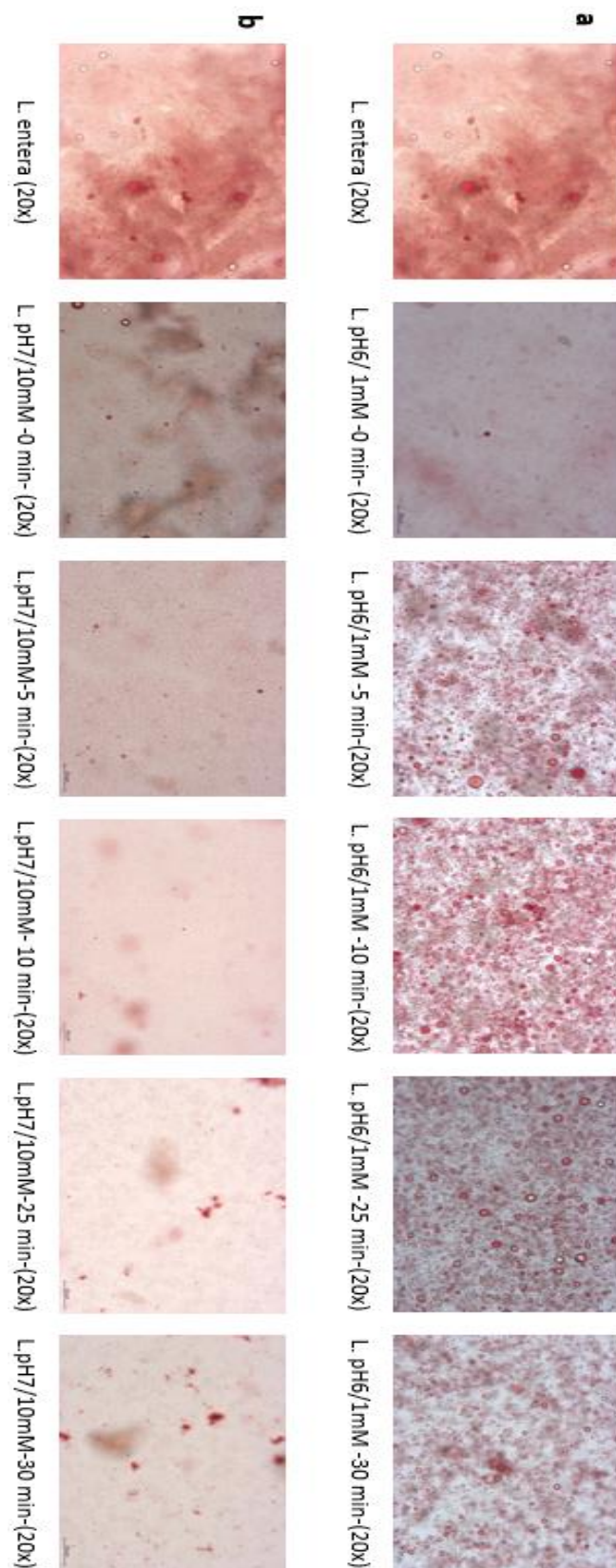


Figura 4.6. Micrografías (20X) obtenidas mediante microscopía óptica de las alícuotas de la fase intestinal a diferentes tiempos, obtenidas de la digestión de leche a dos condiciones experimentales: pH 6/1 mM (a) y pH 7/10 mM (b). Para la visualización de la grasa se realizó una tinción con Red Oil (5% isopropanol). Las micrografías corresponden a observaciones a diferentes tiempos (0, 5, 10, 25 y 30 min). Las alícuotas se obtuvieron a partir de una muestra de leche de 0,3 g grasa sometida al proceso de digestión *in vitro*.

4.2.2. Caracterización cinética de la lipólisis de la grasa de la leche

El seguimiento de la hidrólisis de los triglicéridos de la leche utilizando una concentración conocida de SEP (8,27 UL/mL) permitió obtener las correspondientes curvas de progreso para cada una de las condiciones experimentales detalladas en el apartado 3.3.1. de Materiales y método (Figura 4.7).

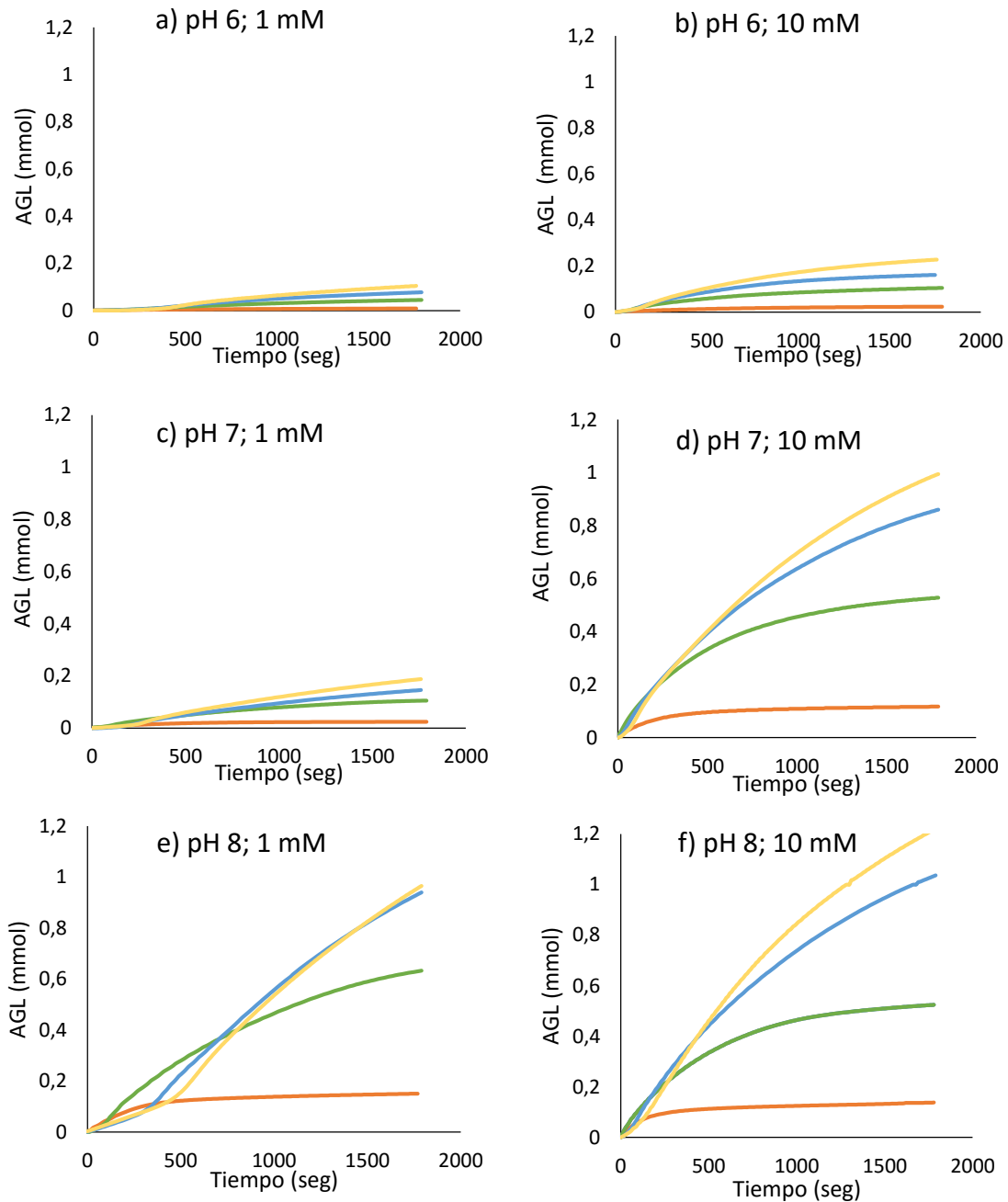


Figura 4.7. Curvas de progreso de la lipólisis en las diferentes condiciones experimentales. Las condiciones experimentales ensayadas son: pH 6/1 mM (a); pH 6/10 mM (b); pH 7/1 mM (c); pH 7/10 mM (d); pH 8/1 mM (e) y pH 8/10 mM (f). Cada color de la curva se corresponde con una cantidad diferente de grasa en el medio de reacción: 0,05 g (naranja), 0,25 g (verde), 0,5 g (azul) y 0,7 g (amarillo). La curva de lipólisis se obtuvo mediante valorización de los AGL por el método pH-stat usando NaOH 0,05 N como valorante. A partir del volumen de NaOH 0,05 N adicionado se calculó los mmol de AGL valorados en cada momento (eje x).

Las curvas de progreso de la lipólisis (figura 4.7) ponen de manifiesto que tanto la velocidad de la reacción enzimática como la extensión de la digestión de las grasas presentan una fuerte dependencia tanto del pH del medio como de la concentración biliar utilizada. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la actividad enzimática del suplemento es mucho más eficaz a pH 7 y 8, y concentración 10 mM, tanto desde el punto de vista cinético (velocidad de la reacción) como desde el punto de vista del alcance de la digestión de la grasa (% de Ácidos Grasos Libres (AGL) liberados). La influencia de estas variables también se manifiesta en el patrón o forma de las curvas, en las que dependiendo de las condiciones puede apreciarse con mayor o menor claridad el periodo de activación interfacial. El periodo de activación se corresponde con el tramo inicial en el que la enzima se adsorbe a la superficie de las gotas de grasa. Cuando la enzima entra en contacto con la interfase, el ambiente dieléctrico en la superficie proteica se modifica de modo que se potencian las interacciones electrostáticas. Ello posibilita el desplazamiento de la cubierta del centro activo (Grochulski et al., 1994; Petersen, 1996; Foresti y Ferreira, 2004;), y la reestructuración de la conformación de la molécula (Jensen et al., 2002; Aloulou et al., 2006; Lin et al., 2007; González-Bacero et al., 2010). Como resultado, los grupos amino quedan expuestos en una orientación adecuada, permitiendo el acceso al centro activo, hasta ese momento inaccesible (Brzozowski et. al, 1991; González-Bacero et al., 2010). Su duración (tiempo de activación; t_a) depende de la concentración de enzima y la liberación de ácidos grasos.

Durante este proceso de activación interfacial, se establece una competencia por la interfase aceite/agua entre las lipasas y otros compuestos emulsificantes presentes en el sistema que rodean las gotas de grasa. En el caso del sistema utilizado en este trabajo (leche), podría existir una competencia entre la enzima y las caseínas para posicionarse en la interfase aceite/agua. Según algunos autores, a muy bajas concentraciones de enzima, podría no haber enzima suficiente para desplazar las caseínas y por consiguiente no se establecería el contacto adecuado entre el enzima y el sustrato (Macierzanka et al., 2009). A concentraciones mayores de grasa, dependiendo de las condiciones de pH del medio y concentración biliar, se puede observar claramente la etapa interfacial, con una velocidad inicial de liberación de AGL muy baja, que puede explicarse en base al tiempo (t_a) que se requiere para que el enzima desplace las caseínas y alcance la interfase del sustrato. Sin embargo, en condiciones determinadas (pH 7-8; 10 mM), estos procesos de desplazamiento y adsorción ocurren muy rápidamente y la digestión de los lípidos empieza casi inmediatamente.

En general, se observa en la figura 4.7, a medida que aumenta la concentración de grasa y por consiguiente disminuye la relación enzima: sustrato (UL/g grasa), la fase de activación interfacial es cada vez más larga. Por el contrario, para las concentraciones de sustrato más bajas (0,05 g y 0,25 g), la fase de latencia prácticamente es inexistente ya que la enzima rápidamente se une a la interfase de las micelas de grasa.

Una vez termina la etapa de activación, se inicia el periodo de velocidad de reacción constante, etapa en la que la velocidad depende del pH del medio y de la concentración biliar en el medio de reacción (Figura 4.7). Para cada una de las condiciones de pH y concentración biliar ensayadas, se procedió a calcular la velocidad en el tramo lineal de la curva de progreso, lo que permite representar las curvas de correlación entre la velocidad de reacción en el tramo lineal ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$) y la concentración de sustrato $[S]$, para la concentración de enzima ensayada (Figura 4.8). Tal y como se esperaba, la velocidad de digestión de los lípidos aumentó con el pH y la concentración biliar, esto último relacionado con el poder emulsionante de las sales biliares, aumentando la superficie de contacto entre la enzima y las gotas de grasa, permitiendo de esta forma que la reacción trascorra a mayor velocidad.

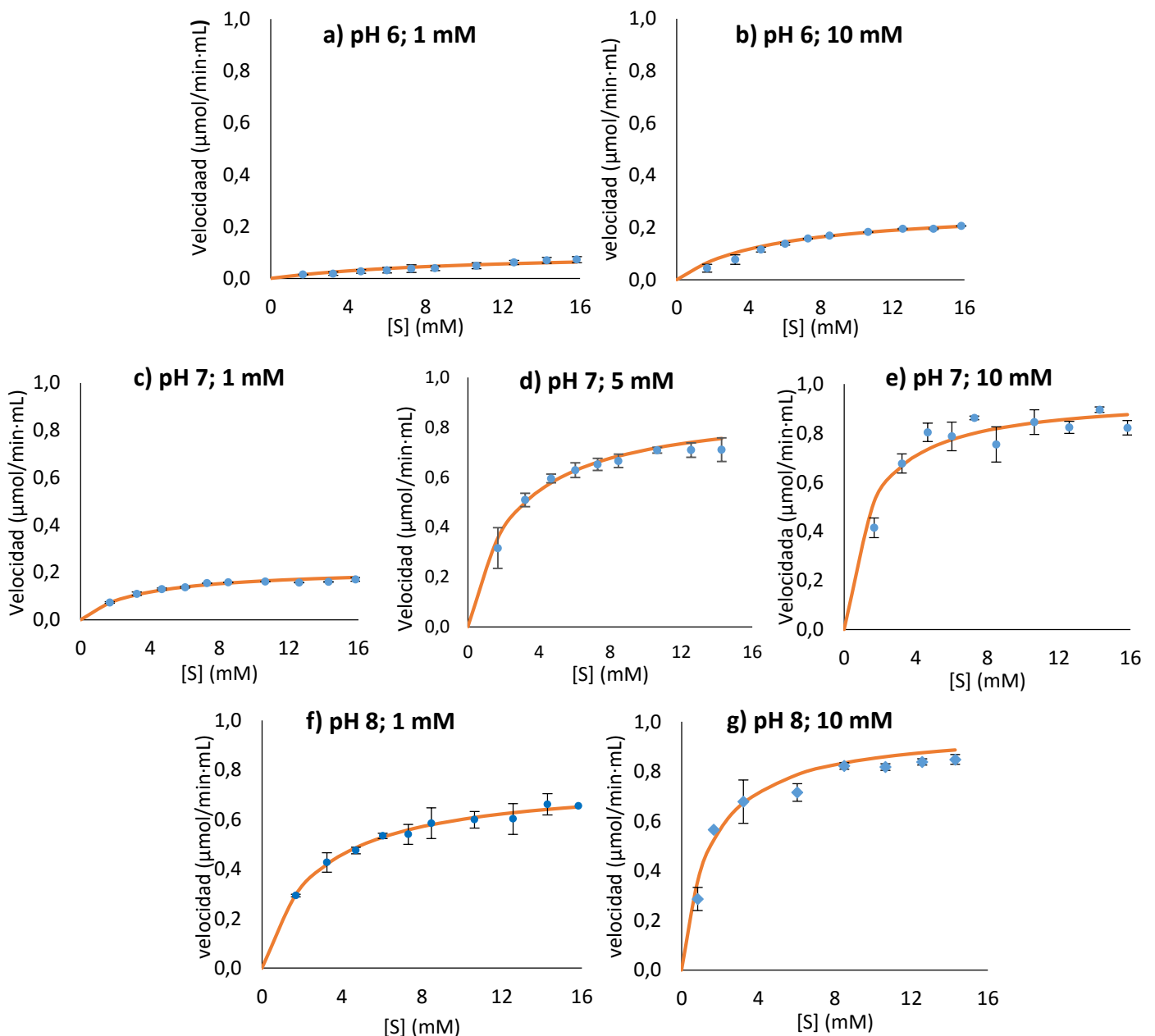


Figura 4.8. Gráficas de la velocidad de reacción ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$) frente a concentración de sustrato (triglicéridos; mM). Para cada una de las condiciones de reacción ensayada (pH 6/1 mM; pH 6/10 mM; pH 7/1 mM; pH 7/5 mM; pH 7/10 mM; pH 8/1 mM y pH 8/10 mM) se procedió a ajustar el modelo de Michaelis-Menten (curva naranja).

Como se ha mencionado previamente, las lipasas presentan el fenómeno de catálisis interfacial. Este hecho hace que la actividad de la enzima no dependa de la concentración molar de la enzima, pero sí de la concentración de sustratos en las interfases (Reis et al., 2009). Ello complicaría sustancialmente los análisis, puesto que la leche es un sustrato natural con una enorme variabilidad natural y donde la estandarización de medidas y parámetros de referencia resulta complicada. Por ello, se ha asumido la simplificación de considerar que se trata de un sistema homogéneo (el sustrato se encuentra disperso por todo el volumen de reacción) y no un sistema heterogéneo y así obviar la superficie de contacto como parámetro cinético.

Teniendo en cuenta lo mencionado previamente, los resultados mostrados en la figura 4.8 se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, obteniendo los valores de la constante de la ecuación de Michaelis-Menten (k_m) y de la velocidad máxima de reacción (r_m) para cada una de las condiciones ensayas (tabla 4.3).

Tabla 4.3. Valores medios y desviación típica de la constante de Michaelis-Menten (k_m ; mM) y de la velocidad máxima (r_m ; $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$) obtenidos en cada una de las condiciones experimentales para una concentración enzimática de 0,21 g/L (8,27 UL/mL) y bondad de ajuste (R^2). Las letras corresponden a los grupos homogéneos obtenidos mediante el análisis estadístico (ANOVA simple, con un 95 % de confianza) de los datos de r_m (a-f) y k_m (a-e) a las diferentes condiciones de pH y concentración biliar,

Condición	r_m ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$)	k_m (mM)	R^2
pH 6/ 1 mM	0,106 \pm 0,001 (a)	10,582 \pm 0,071 (e)	0,970
pH 6/ 10 mM	0,279 \pm 0,019 (c)	5,055 \pm 0,137 (c)	0,975
pH 7/ 1 mM	0,222 \pm 0,006 (b)	3,563 \pm 0,178 (d)	0,958
pH 7/ 5 mM	0,873 \pm 0,022 (e)	2,564 \pm 0,051 (b)	0,987
pH 7/ 10 mM	0,953 \pm 0,012 (f)	1,474 \pm 0,257 (a)	0,978
pH 8/ 1 mM	0,755 \pm 0,002 (d)	2,636 \pm 0,081 (b)	0,978
pH 8/ 10 mM	0,979 \pm 0,002 (f)	1,550 \pm 0,127 (a)	0,983

Como se puede ver en la tabla 4.3, a medida que aumenta el pH se produce una disminución en la k_m del enzima, indicativo de que el incremento del pH aumenta la afinidad del enzima por el sustrato. De igual forma, al incrementar la concentración de bilis de 1 a 10 mM se produce una disminución de la k_m y por consiguiente aumenta la afinidad de la enzima por el sustrato. Por tanto, el incremento del pH y de la molaridad de la bilis tienen un efecto directo sobre la enzima aumentando la afinidad de esta por el sustrato.

A fin de confirmar dichos resultados, se realizó por microscopia una comparativa del estado de la muestra de leche tras los 30 minutos de fase intestinal para pH 6 y pH 8 a las dos concentraciones de bilis ensayadas (1 y 10 mM) (figura 4.9). En este caso, para pH 6/1 mM y pH 6/10 mM se puede observar grandes glóbulos de grasa fácilmente visible, indicativo de una cinética de reacción lenta que ha permitido que transcurrido los 30 minutos de fase intestinal todavía queden grandes cantidades de grasa en forma de triglicéridos (TG) no digeridos. En cambio, para pH 8/1 mM y pH 8/10 mM, no se detectan grandes glóbulos de grasa en la muestra a los 30 minutos, indicativo de que la reacción transcurre mucho más rápido, permitiendo una mayor hidrólisis de TG y, por consiguiente, una menor cantidad de TG en la muestra final a los 30 minutos de fase intestinal. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente, ya que, para pH 6/1 mM y pH 6/10 mM obtenemos los parámetros cinéticos menores.

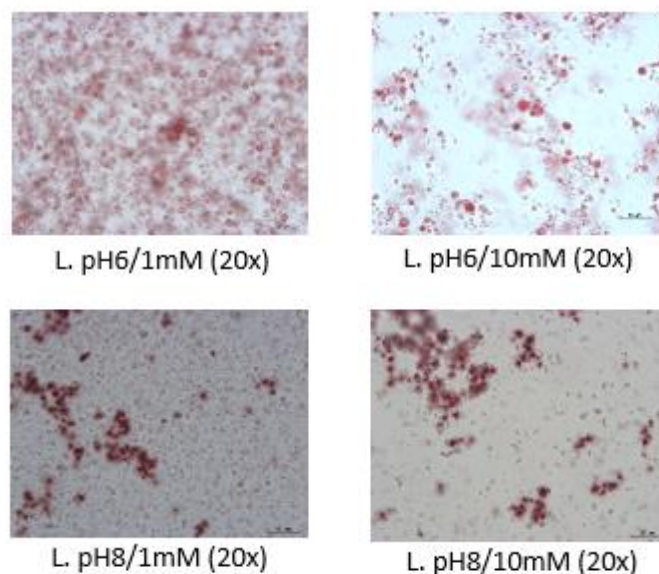


Figura 4.9. Micrografías (20X) obtenidas mediante microscopía óptica tras los 30 minutos de la fase intestinal en la cámara termostataada. Para su obtención se extrajeron alícuotas de la fase intestinal de la digestión de leche a diferentes condiciones intestinales simuladas (pH 6/1mM, pH 6/10mM, pH 8/1 mM y pH 8/10 mM) y posteriormente se procedió a su tinción con Red Oil (5% isopropanol).

Una vez obtenidas la k_m y r_m se procedió a calcular la constante catalítica (k_{cat}) y la constante de especificidad (k_{cat}/k_m) de la enzima, para cada una de las condiciones experimentales ensayadas, teniendo en cuenta para ello la concentración de SEP (PM: 43.000-50.000 Da) utilizada en los ensayos (tabla 4.4.). Estas constantes son características del enzima y del sustrato e independientes de la concentración de enzima.

Tabla 4.4. Constante catalítica (K_{cat} ; seg^{-1}) y constante de especificidad (k_{cat}/k_m ; $\text{M}^{-1}\cdot\text{seg}^{-1}$) a las diferentes condiciones experimentales de pH y molaridad de la bilis.

Condición	K_{cat} (seg^{-1})	k_{cat}/k_m ($\text{M}^{-1}\cdot\text{seg}^{-1}$)
pH 6/ 1 mM	$0,391 \pm 0,001$	$0,037 \pm 0,000$
pH 6/ 10 mM	$1,030 \pm 0,073$	$0,204 \pm 0,009$
pH 7/ 1 mM	$0,819 \pm 0,022$	$0,230 \pm 0,005$
pH 7/ 5 mM	$3,223 \pm 0,082$	$1,257 \pm 0,057$
pH 7/ 10 mM	$3,515 \pm 0,045$	$2,424 \pm 0,425$
pH 8/ 1 mM	$2,785 \pm 0,007$	$1,057 \pm 0,030$
pH 8/ 10 mM	$3,612 \pm 0,009$	$2,338 \pm 0,186$

La figura 4.10. muestra la interacción entre pH y concentración biliar según el ANOVA multifactorial aplicado a los resultados obtenidos para la K_{cat} . El valor de esta constante, directamente relacionada con la velocidad de reacción se ve significativamente afectada por ambos factores, si bien la influencia de la concentración biliar es más acusada a pH 7, y similar a pH 6 y 8.

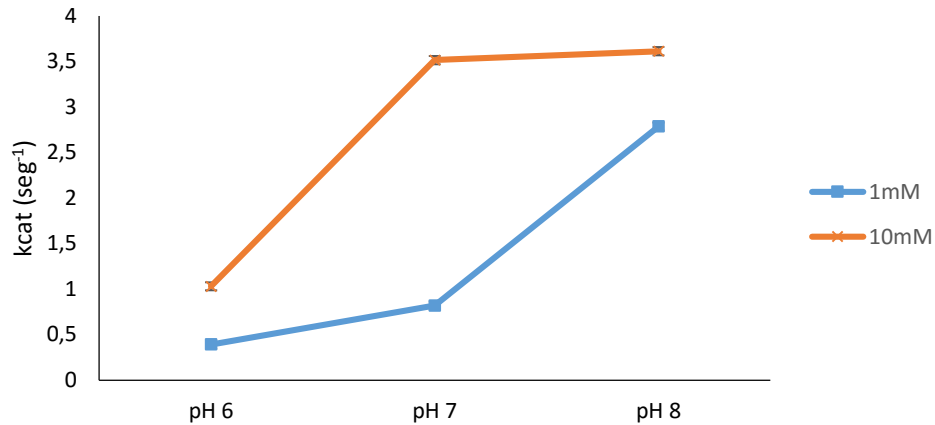


Figura 4.10. Gráfico de interacciones entre pH y molaridad de la bilis resultado del análisis estadístico (ANOVA multifactorial) de los datos de k_{cat} (seg^{-1}) a diferentes valores de pH (6, 7 y 8) y diferentes concentraciones biliarias (1 y 10 mM).

Por otro lado, la constante de especificidad está relacionada con la afinidad al sustrato ya que es función de k_m . Del mismo modo que para la k_{cat} , al aumentar la molaridad aumenta la constante de especificidad de forma significativa a excepción de pH 6, donde la diferencia no es significativa (Figura 4.11). Igualmente, al aumentar el pH de 6 a 8 se produce un incremento en la constante de especificidad, exceptuando el paso de pH 7 a pH 8 (a 10 mM) donde la constante de especificidad no aumenta. Por tanto, el incremento del pH y la molaridad de la bilis parece tener un efecto aumentando la especificidad de la enzima por el sustrato.

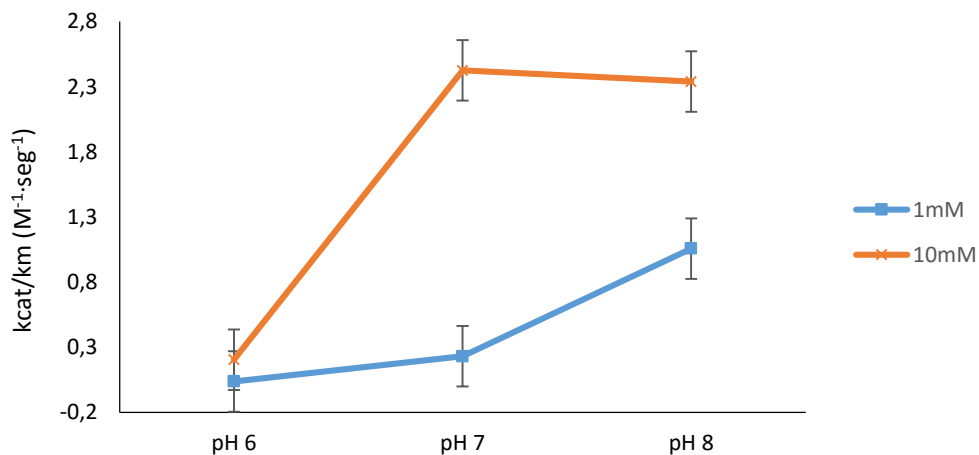


Figura 4.11. Gráfico de interacciones entre pH y concentración biliar según el ANOVA multifactorial de los resultados de k_{cat}/k_m ($\text{M}^{-1}\cdot\text{seg}^{-1}$) a diferentes pH (6, 7 y 8) y diferentes concentraciones biliarias (1 y 10 mM).

Las constantes estimadas a partir de la modelización de los resultados experimentales pueden utilizarse para estimar la concentración de sustrato que satura el enzima en unas determinadas condiciones de pH y concentración biliar, o lo que es lo mismo, la cantidad de SEP que maximiza la velocidad de digestión de la grasa de la leche. A modo de ejercicio de aplicación del modelo obtenido, se procedió a calcular la relación Enzima: Sustrato para el desarrollo de una velocidad de reacción del 95% de la velocidad máxima. (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Relación enzima: sustrato (E/S; g/g) a la que se alcanza el 95% de la velocidad máxima (rm; $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$) para cada una de las condiciones de pH y molaridad de la bilis ensayadas.

Condición	95% rm ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$)	E/S (g/g)
pH 6/ 1 mM	0,1007 \pm 0,0002	0,0013 \pm 0,0000
pH 6/ 10 mM	0,2652 \pm 0,0189	0,0027 \pm 0,0000
pH 7/ 1 mM	0,2108 \pm 0,0057	0,0038 \pm 0,0002
pH 7/ 5 mM	0,8296 \pm 0,0210	0,0053 \pm 0,0001
pH 7/ 10 mM	0,9049 \pm 0,0116	0,0093 \pm 0,0017
pH 8/ 1 mM	0,7169 \pm 0,0019	0,0051 \pm 0,0002
pH 8/ 10 mM	0,9297 \pm 0,0023	0,0087 \pm 0,0007

Como se puede observar en la tabla 4.5, los valores más altos de la relación E/S son los correspondientes a las condiciones de pH 7/10 mM y pH 8/10 mM. Ello es indicativo de que, en estas condiciones, se requiere menos sustrato para alcanzar el 95% de la rm ya que la enzima trabaja mejor y, por tanto, se alcanza la velocidad máxima a valores más bajos de concentración de sustrato. En cambio, a pH 6/1 mM se obtiene el valor más bajo de la relación E/S, indicativo de que a estas condiciones se requiere mayores cantidades de sustrato para alcanzar el 95% de la velocidad máxima, ya que la enzima trabaja peor y cuesta más alcanzar la velocidad máxima.

5. CONCLUSIONES

- ✓ El estudio de la actividad de las disoluciones de SEP, pancreatina y lipasa puso de manifiesto que el filtrado afecta a la actividad enzimática de las disoluciones de pancreatina, por lo que la medida de la actividad se realizó en disoluciones sin filtrar.
- ✓ Además, se pudo comprobar que las disoluciones perdieron actividad después de su preparación hasta estabilizarse transcurrido un tiempo. El tiempo de estabilización se estableció en unos 60 minutos, tras los cuales la actividad se mantuvo constante.
- ✓ Las actividades enzimáticas del SEP, pancreatina y la mezcla lipasa: colipasa aumentaron al pasar de una concentración biliar de 1 a 10 mM en todos los casos, y disminuyeron debido al fenómeno de inhibición por sales biliares al aumentar la concentración biliar a 20 mM. Además, la actividad específica también aumentó al incrementar el pH de 6 a 8, excepto en el caso particular de la lipasa donde las diferencias de actividad entre pH 7 y 8 no fueron significativas, probablemente debido a que el pH óptimo de la lipasa se encuentra entre 7 y 8.
- ✓ Por otro lado, la comparación de los resultados de lipólisis obtenidos mediante el pH-stat y el kit enzimático puso de manifiesto la existencia de una correlación entre ambos métodos, lo que indica que las variaciones de pH registradas en el pH-stat son debidas a la generación de ácidos grasos libres como consecuencia de la lipólisis de la grasa láctea y que por tanto, el pH-stat es un método económico que permite medir con precisión la extensión de la lipólisis durante la digestión gastrointestinal.
- ✓ Las curvas obtenidas mediante la valoración de los ácidos grasos libres generados durante la etapa intestinal permitieron obtener la velocidad de reacción y así caracterizar la cinética de la reacción a las diferentes condiciones experimentales ensayadas de pH y concentración biliar. Los resultados obtenidos mostraron que, a mayores valores de pH y concentración biliar (pH 7/10 mM y pH 8/10 mM), se alcanzaban los valores máximos de velocidad (r_m) y los menores valores de la constante de Michaelis-Menten (k_m). Por lo que el aumento del pH y concentración biliar tiende a aumentar la velocidad de reacción (r_m) así como la afinidad de la enzima por el sustrato (disminuye k_m).
- ✓ Finalmente, se logró obtener la relación E/S que satura el enzima, y que corresponde a la mayor eficiencia enzimática puesto que se alcanza la velocidad máxima (r_m). Mayores valores de pH y concentración biliar (pH 7/10 mM y pH 8/10 mM), dieron lugar a mayores valores de la relación E/S. Este hecho indica que la enzima es capaz de alcanzar valores máximos de velocidad con bajas cantidades de sustrato en condiciones duodenales favorables. De esta forma, dada una concentración conocida de grasa en el alimento y conociendo las condiciones de pH y concentración biliar, será posible calcular que cantidad de enzima necesaria para lograr la máxima extensión de la lipólisis.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- ALOULO, A., RODRIGUEZ, J. A., FERNANDEZ, S., VAN OOSTERHOUT, D., PUCCINELLI, D., Y CARRIERE, F. (2006). Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(9): 995-1013.
- BAUER, E., JAKOB, S., Y MOSENTHIN, R. (2005). Principles of physiology of lipid digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(2): 282-295.
- BOROWITZ, D., GELFOND, D., MAGUINESS, K., HEUBI, J. E., Y RAMSEY, B. (2013). Maximal daily dose of pancreatic enzyme replacement therapy in infants with cystic fibrosis: a reconsideration. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(6): 784-785.
- BRZOSOWSKI, A. M., DEREWENDA, U., DEREWENDA, Z. S., DODSON, G. G., LAWSON, D. M., TURKENBURG, J. P., BJORKLING, F., HUGE-JENSEN, B., PATKAR, S. A. Y THIM, L. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, 351(6326): 491-494.
- CARRIÈRE, F., RENO, C., LOPEZ, V., DE CARO, J., FERRATO, F., LENGSELD, H., DE CARO, A., LAUGIER, R. Y VERGER, R. (2000). The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals. *Gastroenterology*, 119(4): 949-960.
- CHARMAN, W. N., Y STELLA, V. J. (1992). *Lymphatic transport of drugs*. CRC Press. 317 pp.
- DOBRILLA, G. (1988). Management of chronic pancreatitis. Focus on enzyme replacement therapy. *International journal of pancreatology*, 5: 17-29.
- FERRONE, M., RAIMONDO, M. Y SCOLAPIO, J. S. (2007). Pancreatic enzyme pharmacotherapy. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 27(6): 910-920.
- FIEKER, A. P., PHILPOTT Y J ARMAND, M. (2011). Enzyme replacement therapy for pancreatic insufficiency: present and future. *Clinical and experimental gastroenterology*, 4(4): 55-73.
- FORESTI, M. L. Y FERREIRA, M. L. (2004). Computational Approach to Solvent-Free Synthesis of Ethyl Oleate Using *Candida rugosa* and *Candida antarctica* B Lipases. I. Interfacial Activation and Substrate (Ethanol, Oleic Acid) Adsorption. *Biomacromolecules*, 5(6): 2366-2375.
- GENTA, I., PERUGINI, P., PAVANETTO, F., MACULOTTI, K., MODENA, T., CASADO, B., LUPI, A., IADAROLA, P. Y CONTI, B. (2001). Enzyme loaded biodegradable microspheres in vitro: ex vivo evaluation. *Journal of controlled release*, 77(3): 287-295.
- GONZÁLEZ-BACERIO, J., HERNÁNDEZ, J. R., Y DEL MONTE MARTÍNEZ, A. (2010). Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1): 124.
- GROCHULSKI, P., LI, Y., SCHRAG, J. D. Y CYGLER, M. (1994). Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Science*, 3(1): 82-91.

- GUERRA, A., ETIENNE-MESMIN, L., LIVRELLI, V., DENIS, S., BLANQUET-DIOT S., & ALRIC, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in biotechnology*, 30(11): 591-600.
- HU, M., LI, Y., DECKER, E. A. Y MCCLEMENTS, 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): 719-725.
- JENSEN, M. Ø., JENSEN, T. R., KJAER, K., BJØRNHOLM, T., MOURITSEN, O. G. Y PETERS, G. H. (2002). Orientation and conformation of a lipase at an interface studied by molecular dynamics simulations. *Biophysical journal*, 83(1): 98-111.
- LAYER, P., Y HOLTSMANN, G. (1994). Pancreatic enzymes in chronic pancreatitis. *International journal of pancreatology*, 15(1): 1-11.
- LAYER, P. Y KELLER, J. (2003). Lipase Supplementation Therapy: Standards, Alternatives, and Perspectives. *Pancreas*, 26(1): 1-7.
- LI, Y., HU, M., Y MCCLEMENTS, D. J. (2011). Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model: proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chemistry*, 126(2): 498-505.
- LIN, M., LU, C., CHENG, Y., LIN, Y., LIN, C. Y LIN, G. (2007). Inhibition or activation of Pseudomonas species lipase by 1, 2-ethylene-di-N-alkylcarbamates in detergents. *Chemistry and physics of lipids*, 146(2): 85-93.
- LOWE, M. E. (2002). The triglyceride lipases of the pancreas. *Journal of lipid research*, 43(12): 2007-2016.
- MACIERZANKA, A., SANCHO, A. I., MILLS, E. N. C., RIGBY, N. M. Y MACKIE, A. R. (2009). Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of β -casein and β -lactoglobulin. *Soft Matter*, 5(3): 538-550.
- 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.
- MCDONALD, J. H. (2009). *Handbook of biological statistics*. Sparky House Publishing. Baltimore, Maryland. 313 pp.
- NAIKWADE, S. R., MESHRAM, R. N., Y BAJAJ, A. N. (2009). Preparation and in vivo efficacy study of pancreatin microparticles as an enzyme replacement therapy for pancreatitis. *Drug development and industrial pharmacy*, 35(4): 417-432.
- PASQUALI, C., FOGAR, P., SPERTI, C., BASSO, D., DE PAOLI, M., PLEBANI, M. Y PEDRAZZOLI, S. (1996). Efficacy of a pancreatic enzyme formulation in the treatment of steatorrhea in patients with chronic pancreatitis. *Current Therapeutic Research*, 57(5): 358-365.
- PATTON, J. S., Y CAREY, M. C. (1981). Inhibition of human pancreatic lipase-colipase activity by mixed bile salt-phospholipid micelles. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 241(4): G328-G336.

- PETERSEN, S. B. (1996). Lipases and esterases: some evolutionary and protein engineering aspects. *NATO ASI Series E Applied Sciences-Advanced Study Institute*, 317: 125-142.
- POUSTIE, V. J., RUSSELL, J. E., WATLING, R. M., ASHBY, D., Y SMYTH, R. L. (2006). Oral protein energy supplements for children with cystic fibrosis: CALICO multicentre randomised controlled trial. *BMJ*, 332(7542): 632-636.
- PRAZERES, D. M. F., LEMOS, F., GARCÍA, F. A. P. Y CABRAL, J. M. S. (1996). Continuous lipolysis in a reversed micellar membrane bioreactor. *Bioprocess Engineering*, 10(1): 21-27.
- REIS, P., HOLMBERG, K., WATZKE, H., LESER, M. Y MILLER, R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Advances in colloid and interface science*, 147-148: 237-250.
- REIS, P., HOLMBERG, K., MILLER, R., LESER, M. E., RAAB, T. Y WATZKE, H. J. (2009). Lipase reaction at interfaces as self-limiting processes. *Comptes Rendus Chimie*, 12(1): 163-170.
- ROBERTS, I. (1989). Enzyme Therapy for Malabsorption in Exocrine Pancreatic Insufficiency. *Pancreas*, 4(4): 496-503.
- ROMÁN, M. G. (2005) Hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsiones O/W. Aplicación a formulaciones detergentes. Tesis doctoral en ingeniería química. Universidad de Granada. 349 pp
- ROVNER, A. J., SCHALL, J. I., MONDICK, J. T., ZHUANG, H. Y MASCARENHAS, M. R. (2013). Delayed Small Bowel Transit in Children With Cystic Fibrosis and Pancreatic Insufficiency. *Journal Of Pediatric Gastroenterology And Nutrition*, 57(1): 81-84.
- RÚA, M. L., DÍAZ-MAURIÑO, T., FERNÁNDEZ, V. M., OTERO, C., Y BALLESTEROS, A. (1993). Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1156(2): 181-189.
- SAX, H. C., WARNER, B. W., TALAMINI, M. A., HAMILTON, F. N., BELL, R. H., FISCHER, J. E. Y BOWER, R. H. (1987). Early total parenteral nutrition in acute pancreatitis: lack of beneficial effects. *The American Journal of Surgery*, 153(1): 117-124.
- SIKKENS, E. C., 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.
- THE NATIONAL PANCREAS FOUNDATION, 2014. *Exocrine pancreatic insufficiency (EPI)*, Bethesda, Maryland, visto el 1 de Julio de 2016. <https://goo.gl/uHHHgY>
- TURCK, D., BRAEGGER, C. P., COLOMBO, C., DECLERCQ, D., MORTON, A., PANCHEVA, R., ROBBERECHT, E., STERN, M., STRANDVIK, B., WOLFE, S., SCHNEIDER, S. M. Y WILSCHANSKI, M. (2016). ESPEN-ESPGHAN-ECFS guidelines on nutrition care for infants, children, and adults with cystic fibrosis. *Clinical Nutrition*, 35(3): 557-577.
- WHITCOMB, D. C., LEHMAN, G. A., VASILEVA, G., MALECKA-PANAS, E., GUBERGRITS, N., SHEN, Y., SANDER-STRUCKMEIER, S. Y CARAS, S. (2010). Pancrelipase Delayed-Release Capsules (CREON) for Exocrine Pancreatic Insufficiency due to Chronic Pancreatitis or Pancreatic Surgery: A Double-Blind Randomized Trial. *Am J Gastroenterol*, 105(10): 2276-2286.