



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INFLUENCIA DEL PROCESADO EN LA DIGESTIBILIDAD DE LAS GRASAS Y PROTEINAS DEL HUEVO MEDIANTE UN SISTEMA DE DIGESTIÓN IN VITRO

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

ALUMNO/A: Andrea Asensio Grau

TUTOR/A ACADEMICO: Ana María Andrés Grau
COTUTOR/A : Ana Belén Heredia Gutiérrez
DIRECTOR EXPERIMENTAL: Irene Peinado Pardo

Curso Académico: 2015/ 2016

VALENCIA, 1 de JULIO DEL 2016

INFLUENCIA DEL PROCESADO EN LA DIGESTIBILIDAD DE LAS GRASAS Y PROTEÍNAS DEL HUEVO MEDIANTE UN SISTEMA DE DIGESTIÓN *IN VITRO*

Asensio, A., Peinado, I.¹, Heredia, A.¹ y Andrés, A.¹

RESUMEN

La insuficiencia pancreática es una manifestación clínica que se caracteriza por la incapacidad del páncreas de liberar suficiente enzima pancreática al intestino delgado produciéndose una malabsorción de los macronutrientes, y en especial de las grasas. El tratamiento actual consiste en la ingesta de un suplemento enzimático de pancreatina (kreon®) por vía oral, en función del peso del individuo. Sin embargo existen una serie de factores relativos al alimento (matriz, tipo de grasa, etc), así como extrínsecos al mismo (pH intestinal, concentración biliar, tipo de procesado, etc) que pueden influir en la digestibilidad de las grasas.

En el presente trabajo se ha utilizado un modelo *in vitro* de digestión gastrointestinal para analizar la eficacia de distintas dosis de kreon® (0-4000 UL/ g grasa) sobre la extensión de la lipólisis y proteólisis en muestras de huevo procesado (escalfado, cocido y en tortilla) y condiciones fisiológicas variables de la etapa duodenal (pH 6/7; [bilis] 1/10 mM).

Los resultados mostraron que la hidrólisis de lípidos y proteínas aumentó conforme lo hizo la dosis de kreon® alcanzándose valores del 100 %, para la mayor concentración de kreon® en el huevo escalfado y condiciones duodenales de pH 6 y [bilis] 1 mM. En cambio, los macronutrientes del huevo cocido y de la tortilla, resultaron ser menos digeribles con unos porcentajes máximos de proteólisis del 60 % en ambos casos, y del 42 % y 62 % de lipólisis en tortilla y huevo cocido, respectivamente. Finalmente, el aumento del pH y concentración biliar para una concentración de kreon® de 2000 UL / g grasa, mejoró la actividad enzimática del kreon® en la digestibilidad de las grasas de la tortilla y del huevo cocido, obteniéndose valores de lipólisis mayores (75-100 %) a pH 7 y concentración biliar 10 mM respectivamente.

PALABRAS CLAVE: digestión *in vitro*, insuficiencia pancreática, lipólisis, proteólisis, procesado, huevo.

ABSTRACT

Pancreatic insufficiency is a clinical manifestation characterized by the inability of the pancreas to release enough pancreatic enzyme into the small intestine, producing malabsorption of macronutrients and especially of fats. Current treatment involves the oral intake of an enzymic supplement of pancreatin (kreon®), which dosage depends on the weight of the individual. However, there are a number of factors related to food (matrix, type of fat, etc) as well as extrinsic to it (intestinal pH, bile concentration, type of processing, etc.) that can influence the digestibility of fats. In this study, an *in vitro* model of gastrointestinal digestion has been used to analyze the effectiveness of different doses of kreon® (0-4000 UL / g fat) on the extent of lipolysis and proteolysis in samples of processed egg (poached, boiled and omelet) and variable physiological

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

conditions of the duodenal phase (pH 6/7; [bile] 1/10 mM). The results showed that the hydrolysis of lipids and proteins increased as the kreon® dose did, reaching values of 100 % in the poached egg for the highest concentration of kreon® and duodenal conditions pH 6, [bile] 1 mM. Instead, the macronutrients in boiled egg and omelet, resulted to be less digestible reaching a maximum proteolysis percentage of 60 % in both cases, and 42 % and 62 % of lipolysis in omelet and boiled egg, respectively. Finally, an increase of pH and bile concentration with a constant concentration of 2000 kreon® UL / g fat, improved the kreon® enzymic activity on fat digestibility for omelet and boiled egg, reaching higher values of lipolysis (75 -100 %) at pH 7 and 10 mM bile, respectively.

KEY WORDS: *in vitro* digestion, pancreatic insufficiency, lipolysis, proteolysis, processed egg.

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, produint-se una malabsorció dels macronutrients, i especialment dels greixos. El tractament actual consisteix en la ingesta d'un suplement enzimàtic de Pancreatina (kreon®) per via oral, en funció del pes de l'individu. No obstant això, existeixen una sèrie de factors relatius a l'aliment (matriu, tipus de greix, etc), així com extrínsecs al mateix (pH intestinal, concentració biliar, tipus de processat, etc.) que poden influir en la digestibilitat dels greixos. En el present treball s'ha utilitzat un model *in vitro* de digestió gastrointestinal per analitzar l'eficàcia de diferents dosis de kreon® (0-4000 UL / g greix) sobre l'extensió de la lipòlisi i proteòlisi en mostres d'ou processat (escalfat, cuit i en truita) i condicions fisiològiques variables de l'etapa duodenal (pH 6/7; [bilis] 1/10 mm). Els resultats van mostrar que la hidròlisi de lípids i proteïnes va augmentar segons el va fer la dosi de kreon®, aconseguint-valors del 100 %, per a la major concentració de kreon® en l'ou escalfat i condicions duodenals de pH 6 i [bilis] 1 mM. En canvi, els macronutrients de l'ou cuit i de la truita, van resultar ser menys digeribles amb uns percentatges màxims de proteòlisi del 60 % en els dos casos, i el 42 % i el 62 % de lipòlisi en truita i ou cuit, respectivament. Finalment, l'augment del pH i concentració biliar per a una concentració de kreon® de 2000 UL / g greix, va millorar l'activitat enzimàtica del kreon® en la digestibilitat dels greixos de la truita i l'ou cuit, obtenint-se valors de lipòlisi majors (75 -100 %) a pH 7 i concentració biliar 10 mM respectivament

PARAULES CLAU: digestió *in vitro*, fibrosi quística, insuficiència pancreàtica, greixos, proteïnes, processat, ou.

1. INTRODUCCIÓN

La insuficiencia pancreática exocrina es un trastorno fisiológico asociado clínicamente a varias enfermedades como la pancreatitis crónica, la fibrosis quística (FQ) o el cáncer de páncreas, aunque también puede aparecer como resultado de una intervención quirúrgica (resección pancreática) o incluso en personas de avanzada edad. Puede deberse a diversas causas metabólicas como una pérdida de parénquima funcional (atrofia), bloqueo del ducto pancreático o asincronía postprandial (Sikkens, Cahen, Kuipers y Bruno, 2010). Esto, da lugar a un déficit de enzimas pancreáticas (proteasas, amilasas y lipasas) en el duodeno provocando una maldigestión y malabsorción de ciertos macro y micronutrientes de la dieta. La digestión más comprometida es la de las grasas pues ocurre mayoritariamente en esta región del intestino delgado. Así, y una vez finalizada la etapa gástrica, las sales biliares, producidas por el hígado a partir de los ácidos biliares conjugados con glicina o taurina y secretadas por la vesícula biliar, contribuyen a la emulsión de los lípidos favoreciendo la formación de micelas gracias a la acción detergente de la lecitina presente en la bilis (Griffiths, 2014). La emulsificación reduce la tensión superficial de los glóbulos grasos favoreciendo la actuación de las lipasas, y facilitando así su absorción en forma micelar. Las sales biliares se combinan con fosfolípidos en esta acción, asociando su lado hidrofóbico con los lípidos y su lado hidrofílico con el agua. La maldigestión y malabsorción de las grasas puede, a su vez, ir acompañada de un déficit en la absorción de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) (Griffiths, 2014).

La terapia de sustitución enzimática, consistente en la suplementación oral de pancreatina encapsulada gastroresistente, es una práctica clínica habitual para el tratamiento de esa sintomatología. Actualmente, la dosificación se establece en función del peso del paciente resultando este criterio insuficiente por no observarse una mejora sustancial en el estado nutricional de estos sujetos. Así, factores intrínsecos al alimento, tales como el contenido y origen de la grasa, perfil lipídico o la estructura matricial, podrían afectar la accesibilidad por parte de la lipasa pancreática a la grasa, no siendo siempre necesaria la misma cantidad de suplemento enzimático para dos alimentos con el mismo contenido graso. Igualmente, las condiciones del entorno duodenal, como el pH o la concentración biliar, en el que ha de actuar el suplemento también pueden afectar a la lipólisis.

El huevo es un ingrediente de la práctica culinaria de todas las culturas, admitiendo numerosos métodos de cocinado que dan como resultado un producto muy variado en cuanto a textura y sabor. Estos cambios físico-químicos consecuencia del cocinado, podrían condicionar también la digestibilidad de los macronutrientes y bioaccesibilidad de compuestos bioactivos. El huevo está formado por la yema (31 %) rodeada por el albumen o clara (58 %), y todo ello envuelto por una cáscara externa (11 %). La grasa, aproximadamente un 11 %, se encuentra exclusivamente en la yema, estando distribuida en un 66 % por triglicéridos, un 28 % por fosfolípidos y un 5 % colesterol. Las vitaminas liposolubles y los carotenoides forman parte de un 1 % de los lípidos de la yema. En cuanto al valor proteico, un huevo aporta 6 g de proteína a la dieta, encontrándose fundamentalmente en la clara. El albumen consiste en una disolución acuosa (88 %) y proteica (11 %). De las numerosas proteínas presentes en la clara, destacan la ovoalbúmina (54 %) y ovomucina (11 %) responsables de la consistencia del albumen, y la lisozima (3,4 %) por sus propiedades antibacterianas. El resto de las proteínas del huevo se encuentran en la yema (16 % de la yema), que consiste en una emulsión de agua (49 %) y lipoproteínas. La composición proteica del huevo se considera de alto valor biológico, ya que contiene todos los aminoácidos esenciales. Por ello, se utiliza como

patrón de referencia para la evaluación de la calidad proteica de los alimentos (Barroeta, 2008).

En este contexto, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar la eficacia del suplemento enzimático de pancreatina kreon® para llevar a cabo la digestión intestinal de los lípidos y proteínas de diferentes tipos de huevo procesado: huevo cocido, escalfado y en tortilla, utilizando para ello un modelo de digestión *in vitro*. Asimismo, se ha analizado la influencia de las condiciones de la etapa intestinal, pH y concentración biliar, en la efectividad del suplemento. Adicionalmente, se determinó la degradación de la matriz y se realizaron observaciones microscópicas con el fin ayudar a comprender y a justificar los resultados de proteólisis y lipólisis.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

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

Para la preparación de los stocks y fluidos digestivos simulados se emplearon los siguientes reactivos: KCl, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , NaCl, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ y CaCl_2 (0,3 M). Todos ellos se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Para las determinaciones analíticas, se utilizó Triton X-100, éter de petróleo, ácido tricloroacético (TCA), ácido palmítico y albúmina sérica bovina (BSA) obtenidos de Sigma-Aldrich, además de urea cristalina para análisis (ACS) adquirida de *AppliChem Panreac*.

2.2. Preparación de la muestra

Los huevos frescos se dividieron en tres lotes que fueron sometidos a un tipo distinto de cocinado. Los tipos de cocinado que se realizaron fueron hervido, escalfado y tortilla. El tipo de cocinado huevo cocido (HC), consistió en hervir los huevos durante 10 minutos a 100 °C, tras los cuales se eliminó la cáscara (Nimalaratne et al., 2015). El huevo escalfado (HE), consistió en romper los huevos en bolsitas de parafilm que fueron sumergidas en un baño de agua a una temperatura de 100 °C durante 4 minutos. Posteriormente, en ambos tratamientos se pesó por separado la yema y la clara. La tortilla (HT) se batió durante 1 minuto y se cocinó en un microondas durante 80 segundos (modelo de microondas) (750 W, 2450 MHz) (Nimalaratne, Lopes-Lutz, Schieber y Wu, 2012). Una vez finalizados los tratamientos, las muestras se sometieron a una digestión *in vitro* gastrointestinal.

2.3. Modelo estático de digestión *in vitro*

La simulación de la digestión gastrointestinal se llevó a cabo utilizando un modelo estático *in vitro* y comprendió tres etapas: oral, gástrica y duodenal. La simulación se realizó en base al protocolo consensuado a nivel europeo por la ACTIONCOST INFOGEST y publicado por (Minekus et al., 2014), si bien se ampliaron las condiciones de la etapa duodenal para analizar la influencia del pH, concentración enzimática y de sales biliares sobre la extensión de la lipólisis y proteólisis de los

diferentes tipos de huevo procesado en estudio. Para llevar a cabo la simulación, se prepararon los fluidos simulados (tabla 2.5), gástrico (SGF) e intestinal (SIF) a partir de las disoluciones stocks cuya composición se detalla en las tablas 2.2 y 2.3, y se procedió a la misma tal y como se describe a continuación. Para la etapa oral, se estimó la cantidad de alimento necesaria para digerir aproximadamente 0,35 g grasa.

La cantidad estimada para las distintas muestras (HC, HE, HT), se introdujo en tubos falcon de 50 mL a los que seguidamente se añadieron 5 mL de SSS. La masticación se simuló batiendo la muestra durante 3 minutos para asegurar su correcta homogenización. A continuación, para la etapa gástrica, se añadieron 10 mL de SGF, y la cantidad de kreon® correspondiente a cada muestra según el diseño experimental desde la condición 0 (sin kreon®), 1000, 2000, 3000 y 4000 UL/ g grasa (tabla 2.1 y tabla 2.4). Las dosis de kreon® fueron establecidas en base a las recomendaciones generales para pacientes con insuficiencia pancreática (Aseeri et al., 2012; Gelfond, Ma, Semler y Borowitz, 2013). La equivalencia en actividad lipasa y proteasa según la dosis de kreon® queda reflejada en la tabla 2.4. Seguidamente se ajustó el pH a 3 con ácido clorhídrico (HCl 1N) y ayuda del pH-metro (SevenCompact™ S210, Mettler Toledo). Las muestras se introdujeron en una cámara termostataada a 37 °C (SELECTA modelo Boxcult 3000957) y se mantuvieron en agitación circular (arriba-abajo) a 55 rpm (agitador modelo Intelli – Mixer RM-2) durante 2 horas. Una vez finalizada la etapa gástrica, la etapa intestinal se simuló en las diferentes combinaciones de pH-concentración de kreon® (UL/ g grasa)-concentración de sales biliares (mM) detalladas en el diseño experimental recogido en la tabla 2.1. Para las cinco dosis de kreon® comentadas anteriormente (0 – 4000 UL /g grasa) la concentración biliar y el pH de la fase gastrointestinal se mantuvieron en 1 mM y pH 6 dichas condiciones.

Con el fin de evaluar la influencia del pH y la concentración de bilis en la fase gastrointestinal, se ensayaron además tres condiciones extra para una dosis de kreon® fija de 2000 UL/ g grasa y se combinaron las condiciones de pH y molaridad de la bilis de la siguiente manera: pH 6/ 10 mM, pH 7/ 1 mM y pH 7/ 10 mM, correspondiendo estas últimas con las de un adulto sano (Minekus et al., 2014).

La simulación de la etapa intestinal consistió en añadir al digerido gástrico 20 mL de SIF a la molaridad biliar correspondiente al diseño, y ajustar el conjunto a pH 6 ó 7 con hidróxido sódico (NaOH 1N) y ayuda del pH-metro (SevenCompact™ S220, Mettler Toledo). Seguidamente, las muestras se introdujeron nuevamente en la cámara termostataada a 37 °C y se mantuvieron en agitación circular (arriba-abajo) a 55 rpm durante 2 horas más. Transcurrido el tiempo de digestión, las muestras fueron incubadas en hielo durante 10 minutos y el pH ajustado a 9 para asegurar la inactivación enzimática.

TABLA 2.1. Condiciones de pH, concentración de kreon® (UL/ g grasa) y biliar (mM) de la etapa intestinal y nomenclatura asignada a cada experimento.

Nomenclatura	kreon® (mg/ mL)	UL (UL/ g grasa)	pH	Molaridad biliar (mM)
0	0	0	6	1
1000	0,24	1000	6	1
2000	0,48	2000	6	1
3000	0,71	3000	6	1
4000	0,95	4000	6	1
6/10	0,48	2000	6	10
7/1	0,48	2000	7	1
7/10	0,48	2000	7	10

TABLA 2.2. Composición recomendada para un litro de las disoluciones Stocks.

Constituyente	SSS (mL)	SGS (mL)	SIS (mL)
KCl	30,2	13,8	13,6
KH ₂ PO ₄	7,4	1,8	1,6
NaCl	6,8	23,6	18,3
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	1	0,8	2,2
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,12	1	-
NaHCO ₃	-	25	95
H ₂ O	954,48	934	869,3

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

TABLA 2.3. Concentraciones de electrolitos recomendadas para la realización de los stocks simulados.

Constituyente	SSS (mmol·L ⁻¹)	SGS (mmol·L ⁻¹)	SIS (mmol·L ⁻¹)
K ⁺	18,8	7,8	7,6
Na ⁺	13,6	72,2	123,4
Cl ⁻	19,5	70,2	55,5
H ₂ PO ₄ ⁻	3,7	0,9	0,8
HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	13,7	25,5	85
Mg ²⁺	0,15	0,1	0,33
NH ₄ ⁺	0,12	1	-
Ca ²⁺	1,5	0,15	0,6

TABLA 2.4. Dosis de kreon® y su equivalencia según su actividad proteasa y lipasa.

kreon® (mg/ mL)	uni		Proteasa	
	UL/ g grasa	UL/ mL	UP/ g proteína	UP/ mL
0,24	1000	9,32	53,28	0,56
0,48	2000	18,64	106,56	1,12
0,71	3000	27,97	159,84	1,68
0,95	4000	37,29	213,12	2,24

TABLA 2.5. Composición de los fluidos simulados.

Constituyente	SGF	SIF
SGS (mL)	375	-
SIS (mL)	-	452,08
CaCl ₂ (mL)	0,25	0,83
Pepsina (mg)	41,86	-
Bilis (mg)	-	439,83
Volumen final (mL)	500	500

SGF: Fluido Gástrico Simulado; SIF: Fluido Intestinal Simulado.

* El pH se ajustó a 3, 6 ó 7 dependiendo de la etapa (gástrica o intestinal) y la condición con HCl (1N) y NaOH (1N) y se enrasó con agua a 500 mL.** La masa de bilis es para 1 mM.

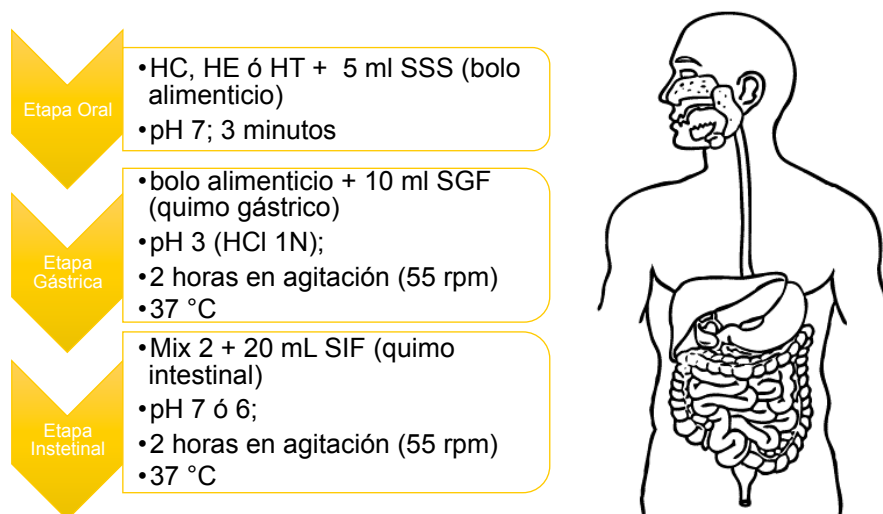


FIGURA 2.1. Diagrama esquemático de las distintas etapas del proceso de digestión *in vitro*.

2.4. Determinaciones analíticas

ANÁLISIS DE GRASA Y HUMEDAD

La humedad se determinó gravimétricamente en estufa a vacío a 63 °C hasta peso constante. El contenido en grasa se estimó también por gravimetría tras extracción con éter de petróleo (40:60) mediante soxlet. Ambas determinaciones según los métodos oficiales de la AOAC (AOAC, 2000).

DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ

La degradación de la matriz se calculó como la proporción de sólidos dispersados durante la digestión de las muestras según el método propuesto por Lamothe, Corbeil, Turgeon, Britten (2012). Una vez terminada la digestión y tras haber llevado el pH a 9, las muestras fueron centrifugadas a 1200 rfc durante 15 minutos, y filtradas mediante un tamiz (1 mm de diámetro) para separar la fase micelar (FM), en la cual se encuentran los ácidos grasos libres, de la fase sólida (FS). La FM se utilizó para la observación por microscopía óptica, la determinación de ácidos grasos libres y proteína digerida. Las FS se utilizó para estimar la disgregación de la matriz. Para ello, las FS de las distintas muestras se introdujeron en unos recipientes de aluminio previamente pesados y se mantuvieron en una estufa a vacío (63 °C, P) durante 48 horas hasta alcanzar peso constante. El índice de degradación de la matriz (IDM) se calculó con la siguiente ecuación:

$$IDM(\%) = \frac{CS_0 - CS_t}{CS_0} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde CS_0 es el contenido inicial de sólidos antes de la digestión y CS_t es el contenido final de sólidos una vez finalizada la digestión.

MICROSCOPIA ÓPTICA

La FM obtenida después de la digestión se mezcló con una disolución de Red Oil (5 % en isopropanol) en una proporción 4:1 (v/v), se vorteo durante 10 segundos y se

incubó durante 10 minutos a 37 °C. Seguidamente, se tomó una gota de la mezcla y se colocó en un portaobjetos, para su observación en microscopio óptico Leica DM 5000 B. Las imágenes se adquirieron con una cámara (Leica, DFC550) mediante el software de adquisición de imágenes LAS (Leica Application Suite).

ANÁLISIS DE PROTEÍNA: PROTEÓLISIS

La extensión de la proteólisis durante la digestión, se determinó midiendo la fracción de proteínas solubles en ácido tricloroacético (TCA) (Lamothe et al., 2014). El TCA se añadió a las muestras con el fin de obtener una concentración final de 12 % (p/p). Seguidamente, la mezcla se agitó en el vortex, se incubó durante 15 minutos y se filtró utilizando un embudo Buchman y filtros Whatman del 40. La fracción soluble en el 12 % de TCA se compone de péptidos y residuos de aminoácidos. Una vez filtrada la muestra, el filtrado se diluyó en una disolución tampón (50 mM EDTA y 8 M urea, pH 10). La extensión de la proteólisis se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm. Se llevaron a cabo digestiones sin enzimas (pepsina en fase gástrica y kreon® en fase intestinal) a modo de controles. Los resultados se expresaron como g equivalentes de BSA tras la digestión respecto a la proteína inicial. Albumina sérica bovina (BSA) se utilizó para la recta de calibrado.

ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES: LIPÓLISIS

La extensión de la lipólisis al final de la digestión gastrointestinal se estimó espectrofotométricamente utilizando un kit enzimático (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) (Lamothe et al., 2012). Para ello, 100 µL de la FM se diluyeron en 10 ml de una disolución acuosa (5,6 % de Triton X- 100; 6 % etanol). Dicha disolución se utilizó para solubilizar los ácidos grasos libres y evitar la actividad de la lipasa. Para la determinación de los ácidos grasos libres, se midió la absorbancia de las muestras diluidas a una longitud de onda de 564 nm.

Los valores de absorbancia de las muestras se compararon a los de la recta de calibrado obtenida con ácido palmítico. La extensión de la lipólisis se expresó como porcentaje de ácidos grasos libres tras la digestión respecto a la grasa inicial, teniendo en cuenta que por cada molécula de triglicéridos se liberan dos ácidos grasos, y teniendo en cuenta el peso molecular del ácido graso mayoritario en el huevo (ácido palmítico: 861 g·mol⁻¹).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis se realizaron por triplicado y se evaluaron mediante un análisis de la varianza multifactorial (ANOVA multifactor) con el programa Statgraphics Centurion con un nivel de confianza del 95 % (*p*-valor ≤ 0,05). Para la realización del ANOVA multifactor se comprobó que los datos seguían una distribución normal.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de las matrices alimento antes de la digestión

La tabla 3.1 muestra los contenidos en agua y grasa respecto a 100 g de producto (%) de los distintos tipos de huevo procesado: huevo cocido (HC), huevo escalfado (HE) y tortilla (HT).

TABLA 3.1. Porcentaje de agua y grasa (%) (media y desviación estándar) de los distintos tipos de huevo procesado: huevo cocido (HC), huevo escalfado (HE) y tortilla (HT) (n=3).

Huevo procesado	Contenido en agua (%)	Contenido en grasa (%)
Huevo cocido (HC)	71,2 (0,5) ^b	7,0 (0,3) ^a
Huevo escalfado (HE)	72,0 (1,0) ^b	7,0 (0,3) ^a
Tortilla (HT)	40,3 (1,0) ^a	22,0 (2,2) ^b

a-b: Superíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$)

Tal y como puede ver en la tabla 3.1 tanto el huevo cocido como el escalfado presentaron porcentajes similares de agua y grasa. La tortilla, en cambio, experimentó una elevada pérdida de agua (44,8 %) debido al tratamiento por microondas y en consecuencia un mayor contenido en grasa.

En cuanto a la estructura matricial se refiere, la figura 3.1 muestra las micrografías correspondientes a la fase líquida de cada uno de los tipos de huevo procesado (cocido, escalfado y tortilla), mezclados con el SSS. Pueden apreciarse las diferencias entre los tres tipos de muestra como consecuencia del procesado.

Así, en el caso del huevo cocido es posible observar un mayor número de glóbulos grasos y más agregados que en el huevo escalfado, en el que son de menor tamaño y aparecen más dispersos y emulsionados. Esto podría deberse a la acción emulsificante de los fosfolípidos presentes en la yema (Guilmineau y Kulozik, 2006), ya que en el caso concreto del escalfado, el tratamiento térmico fue menos severo sin llegar a producirse la solidificación de la misma. Además la presencia de ovoalbúmina podría incrementar la estabilidad de la emulsión (Sponton Perez, Carrara y Santiago 2015 a; 2015 b). En el caso de la tortilla, los glóbulos grasos presentan un tamaño muy inferior al resto de los casos.

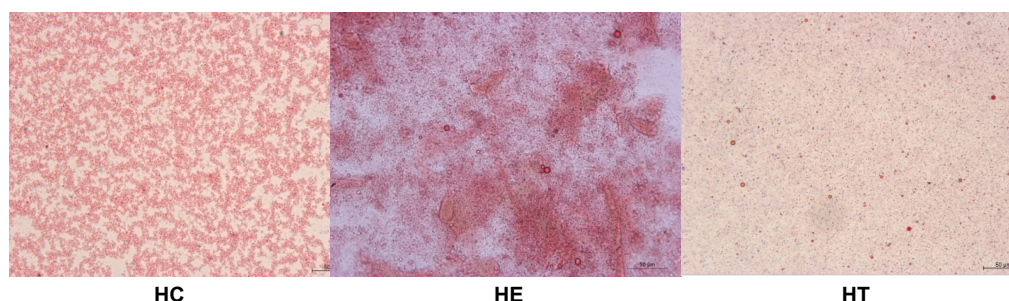


FIGURA 3.1. Micrografías de microscopía óptica de los tres tipos de huevo, cocido (HC), escalfado (HE) y tortilla (HT) tras el cocinado y antes de la digestión *in vitro* (x20). Los glóbulos grasos aparecen teñidos con red oil.

3.2. Degradación de la matriz durante la digestión gastrointestinal. Influencia de las condiciones de simulación de la fase intestinal.

El análisis estadístico puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas debidas a la interacción entre el método de preparación (cocido, escalfado y tortilla) y la concentración de kreon®, tal y como muestran la tabla de interacción (tabla 3.2).

Durante la digestión gastrointestinal tiene lugar una degradación gradual de la matriz alimento que ayuda a la liberación de los macro y micronutrientes. Este fenómeno resulta de especial relevancia en matrices semisólidas o sólidas como es el caso del huevo cocinado. La figura 3.2 presenta el índice de degradación de la matriz (IDM) (%) de los distintos tipos de huevo (cocido, escalfado y tortilla) al final de

la digestión *in vitro* para las cuatro concentraciones de kreon® ensayadas (mg kreon®/ mL) y unas condiciones de insuficiencia pancreática (pH intestinal 6 y [bilis] 1 mM). Se puede observar un aumento del IDM (%) en todos los tipos de huevo conforme aumentó la concentración de enzimas presentes en la fase intestinal. Al comparar las muestras entre sí, los resultados indican un mayor IDM del huevo escalfado para una misma concentración de pancreatina en comparación al huevo cocido y tortilla ($p < 0,05$). Esto no ocurre para la máxima concentración de kreon® (0,95 mg/ mL), para la que el huevo cocido alcanza un IDM similar al escalfado.

Puede apreciarse, que la tortilla presentó una menor degradación que las otras dos matrices a cualquier concentración de enzima.

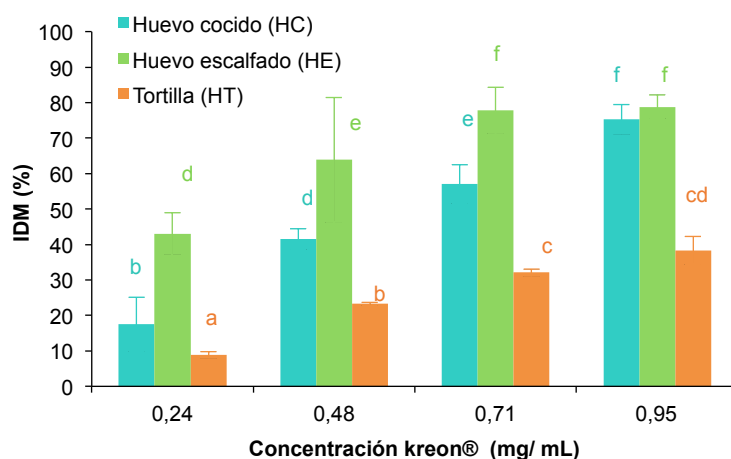


FIGURA 3.2. Índice de degradación de la matriz (IDM) (%) del huevo cocido (HC), huevo escalfado (HE) y tortilla (HT) a distintas concentraciones de kreon® (mg/ mL), pH intestinal 6 y concentración biliar 1 mM. a-f: letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos homogéneos para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

TABLA 3.2. Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ($p < 0,05$) para el tipo de muestra (HC, HE y HT) y la concentración de kreon® (mg/ mL) para la variable respuesta índice de degradación de la matriz (IDM (%)). Estos resultados corresponden a una digestión *in vitro* llevada a cabo a pH 6 y concentración biliar de 1 mM.

EFFECTOS PRINCIPALES	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: mg kreon®/ mL	8590,1	3	2863,37	129,48	0,0000
B: Muestra	9760,75	2	4880,37	220,69	0,0000
INTERACCIONES					
AB	787,464	6	131,244	5,93	0,0007

En la figura 3.3 puede observarse que, para una misma concentración de kreon® (0,48 mg/ mL), la influencia del pH y [bilis] dependió del tipo de procesado. El análisis estadístico confirmó la significación estadística ($p < 0,05$) de la interacción tipo de muestra-concentración biliar (tabla 3.3). De forma que, los valores de IDM (%) obtenidos en el caso del huevo escalfado se situaron alrededor al 70% con independencia del pH intestinal y concentración biliar. Sin embargo, en el caso de la tortilla y el huevo cocido se observó un aumento de la degradación de la matriz para los valores más altos de pH y concentración biliar, siendo este efecto más acusado en el caso del huevo cocido.

En el caso del huevo cocido, la cocción durante 10 min y 100 °C provocó la desnaturalización de las proteínas presentes en la clara y en la yema, y su completa solidificación. La desnaturalización de las proteínas depende de la temperatura y del

tiempo de tratamiento térmico al que son sometidas (Matsudomi, Takahashi y Miyata 2001). La ovoalbúmina, proteína mayoritaria en la clara, se desnaturaliza a una temperatura de 80 °C. En cambio, las proteínas mayoritarias de la yema, proteínas plasmáticas como la livetina y LDL (Light Density Lipoprotein), son muy sensibles al calor y juegan un papel importante en la gelificación de la yema. La lecitina también presente en la yema presenta a su vez capacidad emulsificante. De hecho, a temperaturas superiores a 64 °C empieza a aumentar la viscosidad y a producirse la desnaturalización proteica de las mismas. Esta desnaturalización ocurre también en la tortilla, y unida a la homogeneización por batido previa a su cocción, podría explicar que la estructura generada sea más compleja (mayor interacción entre proteínas y otros macronutrientes que en el huevo cocido), y por tanto más difícil de degradar que en el caso del huevo cocido. En este último caso, la muestra no fue sometida a ninguna homogeneización previa de modo que fue más accesible durante la digestión, hecho que se vio acentuado tanto para un mayor pH como para una mayor concentración biliar. Sin embargo, y tal y como se ha comentado anteriormente, el escalfado, tratamiento térmico menos severo (4 min, 100°C), y por tanto causante de una estructura de gel débil emulsionada en comparación con el cocido o la tortilla es degradado con facilidad durante el proceso digestivo, con independencia del pH intestinal y concentración biliar, si bien el kreon® favorece este fenómeno.

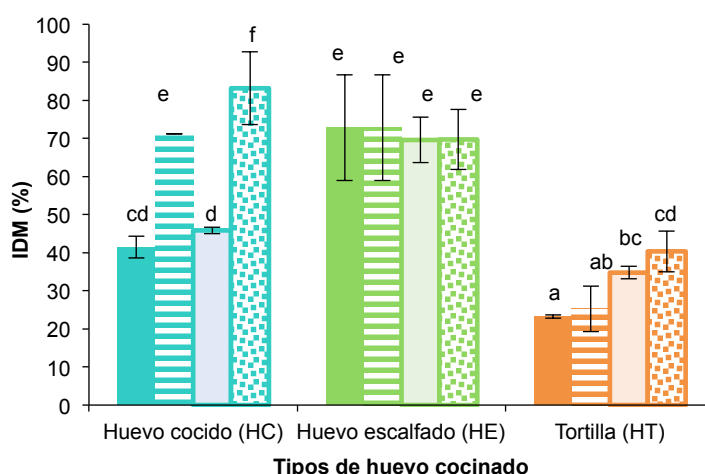


FIGURA 3.3. Índice de degradación de la matriz (IDM) (%) del huevo cocido (HC), huevo escalfado (HE) y tortilla (HT) a distintas concentraciones de sales biliares (1 ó 10 mM) y pH (6 ó 7), concentración de kreon® de 0,48 mg/ mL. a-f: letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos homogéneos para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$). Barras sólidas se corresponden con pH 6 – 1 mM; barras ralladas pH 6 – 10 mM; barras con borde sólido pH 7 – 1 mM; barras con puntos pH 7 – 10 mM.

TABLA 3.3. Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ($p < 0,05$) para el tipo de muestra (HC, HE y HT), el pH y la concentración biliar (mM) para la variable respuesta índice de degradación de la matriz (IDM (%)). Estos resultados corresponden a una digestión in vitro llevada a cabo con una concentración de kreon® de 0,48 mg/ mL.

EFECTOS PRINCIPALES	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Muestra	9594,87	2	4797,44	149,76	0,0000
B: pH	522,434	1	522,434	16,31	0,0005
C: Bilis (mM)	1757,0	1	1757,0	54,85	0,0000
INTERACCIONES					
AC	1725,34	2	862,67	26,93	0,0000

3.3. Influencia de las condiciones de simulación de la fase intestinal sobre la extensión de la proteólisis.

La digestión de las proteínas comienza en el estómago para luego continuar en la parte ileal del intestino delgado. La pepsina, enzima encargada de iniciar el proceso de hidrólisis proteica, está activa gracias al HCl segregado en el estómago. La pepsina hidroliza aproximadamente el 15 % de las proteínas de la dieta en aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular. Una vez en el intestino delgado, las enzimas pancreáticas encargadas de la proteólisis (tripsina, quimiotripsina y carbopeptidasa) continúan el proceso de hidrólisis (Griffiths, 2014). No todas las proteínas son absorbidas como aminoácidos libres, de hecho los dipéptidos y los tripéptidos tienen un mecanismo de absorción más rápido que éstos (Griffiths, 2014).

La figura 3.4 muestra la extensión de la proteólisis tras las fases gástrica e intestinal en función de la concentración de kreon® (mg/mL) y a pH intestinal de 6 y concentración biliar de 1mM. Como cabía de esperar, e independientemente del tipo de huevo, una pequeña parte de la proteólisis ocurrió durante la fase gástrica (alrededor de 14% para el huevo escalfado, 9% para el huevo cocido y un 25% para la tortilla). Al final de la digestión (finalizada la etapa intestinal) en cambio, la proteólisis alcanzada osciló entre un mínimo y máximo del 40 y 90 % aprox., en función del tipo de procesado y de la concentración de pancreatina (tabla 3.4).

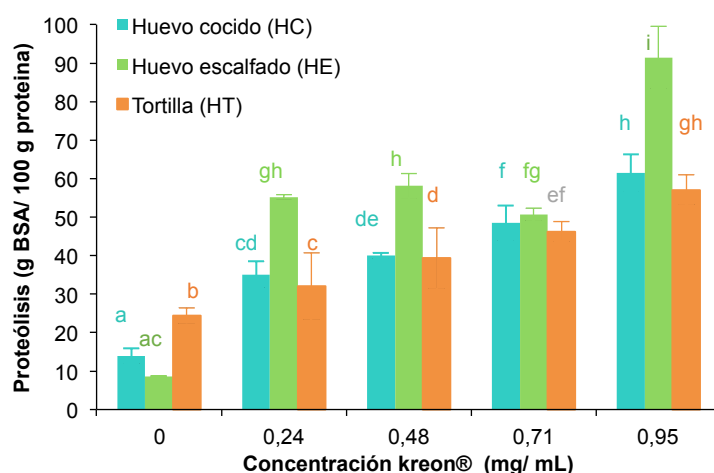


FIGURA 3.4. Extensión de la proteólisis (g BSA/ 100 g proteína) del huevo cocido (HC), huevo escalfado (HE) y tortilla (HT) tras las etapas gástrica (0) e intestinal a distintas concentraciones de kreon® (mg/ mL), pH intestinal de 6 y concentración de sales biliares de 1 mM. a-i: letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos homogéneos para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

TABLA 3.4. Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ($p < 0,05$) para el tipo de muestra (HC, HE y HT) y la concentración de kreon® (mg/ mL) para la variable respuesta extensión de la proteólisis (g BSA/ 100 g proteína). Estos resultados corresponden a una digestión *in vitro* llevada a cabo a pH 6 y concentración biliar de 1 mM.

EFECTOS PRINCIPALES	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Muestra	2913,73	2	1456,86	81,00	0,0000
B: mg kreon®/ mL	4483,05	3	1494,35	83,08	0,0000
INTERACCIONES					
AB	863,782	6	143,964	8,00	0,0001

El tipo de procesado, y por tanto la estructura generada debida al mismo, así como los cambios químicos generados en las proteínas, afectaron significativamente a la cantidad de proteína digerida durante la etapa gástrica ($p < 0,05$), siendo la estructura de la tortilla la que favorecería una mayor proteólisis. Al final de la digestión, sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en la proteólisis alcanzada entre la tortilla y el huevo cocido, pero si entre éstos y el huevo escalfado ($p < 0,05$) a una misma concentración pancreática. Es importante destacar que una mayor concentración de kreon® aumentó la proteólisis en todos los casos, y en especial en el huevo escalfado a la concentración de 0,95 mg/ mL. En este caso, el tratamiento más suave tuvo como consecuencia una menor desnaturalización y gelificación de las proteínas que en los otros dos tipos de procesado. El mayor aumento de temperatura durante el cocinado del huevo cocido y la tortilla pudo conllevar a una menor solubilización de las mismas y a un aumento de la viscosidad, así como a la formación de agregados y a una posterior gelificación debida a las interacciones hidrofóbicas y la formación de enlaces disulfido (Guilmineau y Kulozik, 2006; Kiosseoglou y Paraskevopoulou, 2005). Los resultados obtenidos indican que una menor desnaturalización y gelificación proteica le confiere a la matriz una mayor facilidad para ser digerida durante la etapa intestinal.

La figura 3.5 muestra la extensión de la proteólisis para una misma concentración de kreon® (0,48 mg/ mL) a diferentes condiciones de pH intestinal (6 y 7) y concentración biliar (1 y 10 mM). Se observa un ligero incremento de la hidrólisis proteica al aumentar el pH de 6 a 7 en el caso del huevo escalfado y en tortilla, así como al aumentar la concentración biliar en el huevo cocido. Si se comparan únicamente los resultados a pH 6-1 mM bilis (insuficiencia pancreática) con pH 7-10 mM de bilis (sujeto sano), la digestibilidad de las proteínas parece estar condicionada en insuficientes pancreáticos únicamente en el caso del huevo cocido, recomendándose sin embargo, el consumo de huevo escalfado frente a cocido y en tortilla por presentar el mayor nivel de digestibilidad en condiciones de pH 6 y 1 mM de bilis (tabla 3.5).

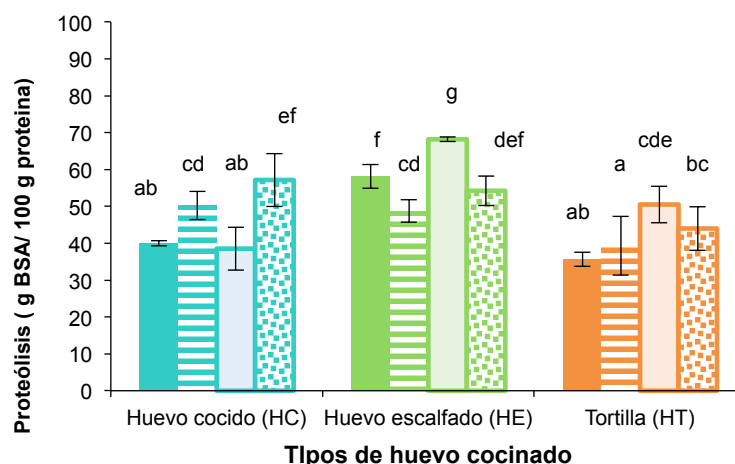


FIGURA 3.5. Extensión de la proteólisis (g BSA/ 100 g proteína) de los distintos tipos de huevo, cocido (HC), escalfado (HE) y tortilla (HT) a distintas concentraciones de sales biliares (1 ó 10 mM) y pH (6 ó 7), concentración de kreon® de 0,48 mg/ mL. a-g: letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos homogéneos para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$). Barras sólidas se corresponden con pH 6 – 1 mM; barras ralladas pH 6 – 10 mM; barras con borde sólido pH 7 – 1 mM; barras con puntos pH 7 – 10 mM.

TABLA 3.5. Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ($p < 0,05$) para el tipo de muestra (HC, HE y HT), el pH y la concentración biliar (mM) para la variable respuesta extensión de la proteólisis (g BSA/ 100 g proteína). Estos resultados corresponden a una digestión in vitro llevada a cabo con una concentración de kreon® de 0,48 mg/ mL.

EFFECTOS PRINCIPALES	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Muestra	1446,6	2	723,298	45,65	0,0000
B: pH	431,582	1	431,582	27,24	0,0000
C: Bilis (mM)	3,66249	1	3,66249	0,23	0,6350
INTERACCIONES					
AC	1143,82	2	571,912	36,09	0,0000

3.4. Influencia de las condiciones de simulación de la fase intestinal sobre la extensión de la lipólisis .

La lipólisis es el proceso de degradación enzimática que experimentan las grasas del alimento para poder ser absorbidas en el intestino delgado. La grasa en los alimentos se encuentran mayoritariamente en forma de triglicéridos (TTG) que son un complejo glicerol y tres ácidos grasos (AG) (Griffiths, 2014). Los TTG se encuentran almacenados en forma de gotitas (micelas) sobre las que actuará la lipasa. Esta enzima se encarga de hidrolizar los enlaces éster en C1 ó C3, liberando un AG y dejando un diacilglicerol (DAG) unido a los otros dos AG. A continuación, la diacilglicerol lipasa libera al segundo AG, dejando un monoglicerido (MAG) unido a otro AG, que finalmente será liberado por la monoglicerol lipasa (Vanbergen, 2013).

La extensión de la lipólisis a las diferentes concentraciones de kreon® ensayadas (mg kreon®/ mL), pH intestinal de 6 y concentración biliar de 1mM se ha representado en la figura 3.6 para cada uno de los tipos de huevo digeridos. Tal y como ocurre con la proteólisis, la mayor digestibilidad, en este caso de la grasas, tuvo lugar para el huevo escalfado, aumentando conforme lo hizo la concentración de kreon®, obteniéndose valores de lipólisis del 100 % a una concentración de kreon® del 0,71 mg/mL. Una vez más, pudo comprobarse como el menor nivel de desnaturalización y gelificación de la matriz proteica en el huevo escalfado, facilitó el acceso al sustrato, en este caso grasa, por parte de la lipasa pancreática. Así mismo, también se observó un efecto significativo de la concentración del suplemento enzimático en el caso del huevo cocido si bien en la tortilla no se produjo un aumento significativo de la lipólisis al aumentar la concentración de kreon® (tabla 3.6).

Claramente la solidificación de la matriz en estos casos, y el batido inicial con la rotura del glóbulo graso, estarían dificultando la digestión de las grasas. La desestructuración seguida de un tratamiento térmico podría haber generado una red proteica donde se intercala los glóbulos lipídicos quedando encerrados en el interior de la misma dificultando la bioaccesibilidad de los lípidos.

Para una mayor superficie específica, y por tanto una mayor digestión lipídica es necesario que las proteínas puedan colocarse en la interfase estabilizando así la emulsión. En teoría, la desnaturalización proteica conlleva a una mayor flexibilidad de las proteínas que su vez les permite ser absorbida en la interfase, (Croguennec et al., 2007; Perez, Andermatten, Rubiolo y Santiago, 2014; Sponton et al., 2015 a; 2015 b). Sin embargo, en un estudio sobre emulsiones de yema de huevo se vio que a medida que el grado de desnaturalización aumentaba, se incrementaba el tamaño de gota y su viscosidad (Dixon y Cotterill, 1981; Denmat, Anton y Gandemer, 1999; Guilmineau y Kulozik, 2006). Esto justifica el hecho de que para el huevo cocido y en tortilla, se generara una menor lipólisis.

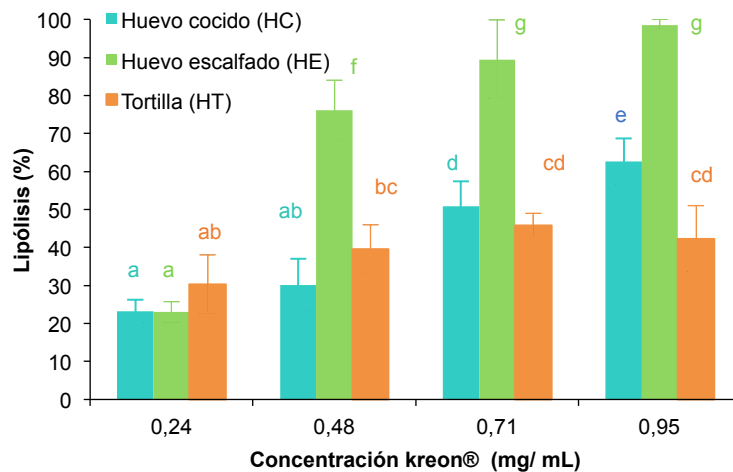


FIGURA 3.6. Extensión de la lipólisis (%) para los distintos tipos de procesado: huevo cocido (HC), huevo escalfado (HE) y tortilla (HT) tras las etapas gástrica e intestinal a distintas concentraciones de kreon® (mg/ mL), pH intestinal de 6 y concentración de sales biliares de 1 mM. a-f: letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos homogéneos para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

TABLA 3.6. Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ($p < 0,05$) para el tipo de muestra (HC, HE y HT) y la concentración de kreon® (mg/ mL) para la variable respuesta extensión de la lipólisis (%). Estos resultados corresponden a una digestión *in vitro* llevada a cabo a pH 6 y concentración biliar de 1 mM.

EFFECTOS PRINCIPALES	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: mg kreon®/ mL	9521,37	3	3173,79	75,58	0,0000
B: Muestra	7821,82	2	3910,91	93,14	0,0000
INTERACCIONES					
AB	4126,97	6	687,829	16,38	0,0000

La influencia del pH intestinal (6 y 7) y concentración biliar (1 y 10 mM), a una concentración fija de kreon® de 0,48 mg/ mL, sobre la extensión de la lipólisis en huevo cocinado se puede observar en la figura 3.7. El papel de las sales biliares fue esencial en la emulsificación de la matriz ayudando a que las lipasas accediesen a la superficie interfacial de los lípidos y por ende, aumentando de forma importante la hidrólisis de las grasas, en los dos tipos de huevo en los que el acceso al sustrato por parte de la lipasa está más comprometido, cocido y tortilla. En el caso del huevo escalfado, la extensión de la lipólisis se situó entre un 60-80 % con independencia de la concentración biliar pero sí ligeramente del pH. Esto podría deberse al hecho de que la solidificación de la yema evita la acción emulsificante propia de la lecitina, de modo que le afecta en mayor medida la presencia de un agente emulsificante externo. La tabla 3.7 muestra la interacción entre el tipo de muestra y la concentración biliar obtenida del análisis estadístico, no siendo significativa la interacción matriz alimento-pH intestinal.

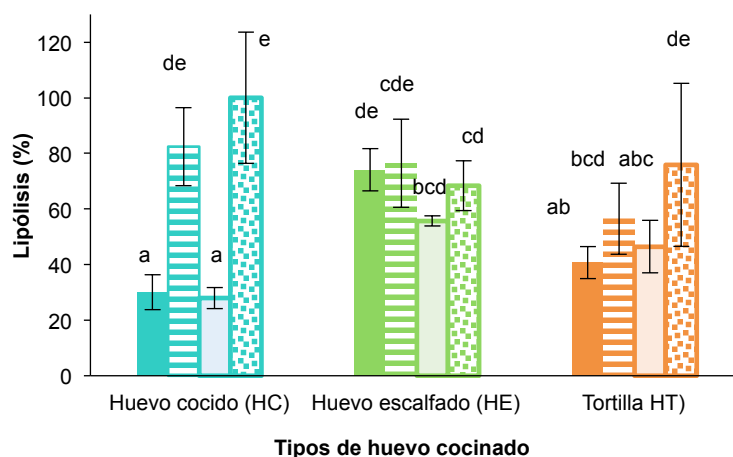


FIGURA 3.7. Extensión de la lipólisis (%) de los distintos tipos de huevo, cocido (HC), escalfado (HE) y tortilla (HT) a distintas concentraciones de sales biliares (1 ó 10 mM) y pH (6 ó 7), concentración de kreon® de 0,48 mg/ mL. a-e: letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos homogéneos para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$). Barras sólidas se corresponden con pH 6 – 1 mM; barras ralladas pH 6 – 10 mM; barras con borde sólido pH 7 – 1 mM; barras con puntos pH 7 – 10 mM.

TABLA 3.7. Tabla resumen obtenida en el ANOVA multifactorial ($p < 0,05$) para el tipo de muestra (HC, HE y HT), el pH y la concentración biliar (mM) para la variable respuesta extensión de la lipólisis (%). Estos resultados corresponden a una digestión in vitro llevada a cabo con una concentración de kreon® de 0,48 mg/ mL.

EFECTOS PRINCIPALES	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Muestra	1065,52	2	532,761	2,58	0,0967
B: pH	30,514	1	30,514	0,15	0,7041
C: Bilis (mM)	6991,74	1	6991,74	33,85	0,0000
INTERACCIONES					
AC	4244,45	2	2122,23	10,27	0,0006

Las micrografías recogidas en la figura 3.8 permiten comparar el nivel de grasa digerida al final de la digestión gastrointestinal en las diferentes condiciones ensayadas. Es claramente apreciable la influencia de la concentración kreon® sobre el fenómeno de lipólisis al observarse un incremento de la presencia de grasa digerida en las micrografías de huevo cocido y escalfado, aunque en este último caso la grasa ya estaría emulsionada antes de la digestión por el papel emulsificante que ejerce la lecitina de la yema del huevo. En el caso de la tortilla, al haber sido sometida a un batido previo al cocinado, los glóbulos de grasa presentan un menor tamaño que en las otras muestras y encontrándose ya emulsionados y poco accesibles para la enzima debido al tratamiento térmico posterior. Por ello, se observa una menor proporción de grasa digerida que para los otros dos tipos de huevo, hecho que justifica los resultados comentados anteriormente.

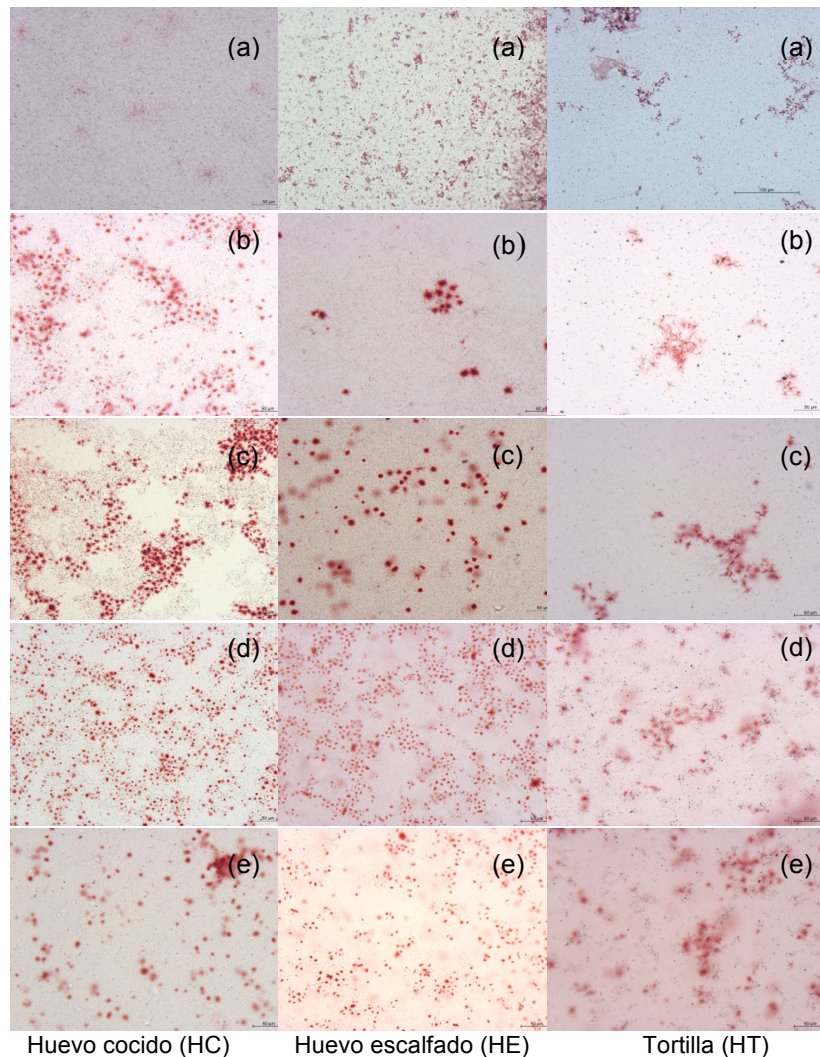


FIGURA 3.8. Micrografías de microscopía óptica de los tres tipos de huevo cocido (HC), escalfado (HE) y tortilla (HT) tras el cocinado y la digestión *in vitro* con distintas concentraciones de kreon® (mg/ mL), pH intestinal de 6 y concentración de sales biliares de 1 mM (20x). Los glóbulos grasos aparecen teñidos con red oil. Letras entre paréntesis indican la concentración de kreon® (mg/ mL). (a): 0; (b): 0,24; (c): 0,48; (d): 0,71; (e): 0,95.

4. CONCLUSIONES

En el presente estudio se utilizó un modelo de digestión *in vitro* gastrointestinal con el fin de evaluar la eficacia de distintas dosis de suplemento enzimático Kreon® sobre la extensión de la lipólisis y proteólisis en muestras de huevo procesado (escalfado, cocido y en tortilla) y condiciones fisiológicas variables de la etapa duodenal (pH 6/7; [bilis] 1/10 mM). Los resultados obtenidos muestran que el tipo de cocinado, influye significativamente en la degradación de la matriz, estando ésta determinada tanto por el grado de proteólisis como por el de lipólisis.

La extensión de la proteólisis aumentó al aumentar la dosis de kreon® alcanzándose el 100 % de la misma, para la mayor concentración de la enzima, en el caso del huevo escalfado y condiciones duodenales de pH 6 y [bilis] 1 mM. En cambio, las proteínas del huevo cocido y de la tortilla, resultaron ser menos digeribles con unos porcentajes máximos del 60 %.

Del mismo modo, en condiciones duodenales de pH 6 y [bilis] 1 mM, la hidrólisis lipídica en el huevo escalfado aumentó según lo hizo la dosis de kreon® hasta un 100 % a la mayor concentración del suplemento. Sin embargo, en el huevo cocido y en la tortilla, la lipólisis resultó menor (42 % y 62 % respectivamente). Además, en estos dos productos, el aumento de pH y de concentración biliar durante la etapa intestinal (7/10 respectivamente), se tradujo en un mayor rendimiento del kreon®, con valores de lipólisis entre 75-100 %, para una concentración constante de kreon® (2000 UL / g grasa).

Así pues, de los tres tipos de huevo procesado estudiados en el presente trabajo, el huevo escalfado sería el más recomendable para personas que cursan con insuficiencia pancreática, puesto que presenta la mayor digestibilidad de grasa y proteína. Sería interesante el estudio adicional de la accesibilidad y biodisponibilidad de compuestos bioactivos del huevo, como por ejemplo los carotenoides, dada su naturaleza liposoluble.

5. BIBLIOGRAFÍA

- AOAC, 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th Edition.
- Aseeri, A.; Brodlie, M.; Lordan, J.; Corris, P.; Pearson, J.; Ward, C.; 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.
- Barroeta, A.C. 2008. El huevo y sus componentes como alimento funcional. Instituto de Estudios del Huevo. <http://www.institutodelhuevo.com> (último acceso: 30/05/2016).
- Borowitz, D.; Gelfond, D.; Maguiness, K.; Heubi, J. E.; 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.
- Croguennec, T.; Renault, A.; Beaufiles, S.; Dubois, J. J.; Pezennec, S. 2007. Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. *Journal of colloid and interface science*, 315(2), 627-636.
- Denmat, M.; Anton, M.; Gandemer, G. 1999. Protein denaturation and emulsifying properties of plasma and granules of egg yolk as related to heat treatment. *Journal of Food Science*, 64(2), 194-197.
- Dixon, D. K.; Cotterill, O. J. 1981. Electrophoretic and chromatographic changes in egg yolk proteins due to heat. *Journal of Food Science*, 46(4), 981-983.
- Gelfond, D.; Ma, C.; Semler, J.; Borowitz, D. 2013. Intestinal pH and gastrointestinal transit profiles in cystic fibrosis patients measured by wireless motility capsule. *Digestive diseases and sciences*, 58(8), 2275-2281.
- Guilmineau, F.; Kulozik, U. 2006. Impact of a thermal treatment on the emulsifying properties of egg yolk. Part 1: Effect of the heating time. *Food Hydrocolloids*, 20(8), 1105-1113.
- Gtiffiths, M. 2014. Lo esencial en aparato digestivo. Elsevier. 4ª edición.
- Kiosseoglou, V.; Paraskevopoulou, A. 2005. Molecular interactions in gels prepared with egg yolk and its fractions. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 527-532.
- Lamothe, S.; Corbeil, M. M.; Turgeon, S. L.; Britten, M. 2012. Influence of cheese matrix on lipid digestion in a simulated gastro-intestinal environment. *Food & function*, 3(7), 724-731.
- Lamothe, S.; Azimy, N.; Bazinet, L.; Couillard, C.; Britten, M. 2014. Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food & function*, 5(10), 2621-2631.
- Matsudomi, N.; Takahashi, H.; Miyata, T. 2001. Some structural properties of ovalbumin heated at 80 C in the dry state. *Food Research International*, 34(2), 229-235.
- Minekus, M.; Alminger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Dufour, C. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124.
- Moelants, K. R.; Lemmens, L.; Vandebroek, M.; Van Buggenhout, S.; Van Loey, A. M.; Hendrickx, M. E. 2012. Relation between particle size and carotenoid bioaccessibility

- in carrot-and tomato-derived suspensions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(48), 11995-12003.
- Nimalaratne, C.; Lopes-Lutz, D.; Schieber, A.; Wu, J. 2012. Effect of domestic cooking methods on egg yolk xanthophylls. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(51), 12547-12552.
- Nimalaratne, C.; Savard, P.; Gauthier, S. F.; Schieber, A.; Wu, J. 2015. Bioaccessibility and digestive stability of carotenoids in cooked eggs studied using a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(11), 2956-2962.
- 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.
- Sponton, O. E.; Perez, A. A.; Carrara, C. R.; Santiago, L. G. 2015a. Impact of environment conditions on physicochemical characteristics of ovalbumin heat-induced nanoparticles and on their ability to bind PUFAs. *Food Hydrocolloids*, 48, 165-173.
- Sponton, O. E.; Perez, A. A.; Carrara, C. R.; Santiago, L. G. 2015b. Linoleic acid binding properties of ovalbumin nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 219-226.
- Perez, A. A.; Andermatten, R. B.; Rubiolo, A. C.; Santiago, L. G. 2014. β -Lactoglobulin heat-induced aggregates as carriers of polyunsaturated fatty acids. *Food chemistry*, 158, 66-72.
- Vanbergen, A. 2013. Lo esencial en metabolismo y nutrición. Elsevier. 4ª edición.