

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INFLUENCIA DEL PROCESADO EN LA DIGESTIBILIDAD DE LÍPIDOS EN MATRICES CÁRNICAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE ALIMENTOS

ALUMNO/A: Carmen Toledo Cabeza

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

Curso Académico: 2015/2016

VALENCIA, 14 de SEPTIEMBRE de 2016

INFLUENCIA DEL PROCESADO EN LA DIGESTIBILIDAD DE LÍPIDOS EN MATRICES CÁRNICAS

Toledo, C., Peinado, I.¹, Andrés, A.¹ y Heredia, A.¹

RESUMEN

La insuficiencia pancreática exocrina es una afección grave asociada a diversas enfermedades que se traduce en una incapacidad del páncreas para secretar la cantidad suficiente de enzimas en el intestino delgado, ocasionándose una maldigestión y malabsorción de nutrientes, especialmente de lípidos. Actualmente, el tratamiento consiste en la administración oral de un suplemento enzimático de pancreatina (Kreon®), cuya dosificación se establece en función de la edad y el peso del paciente, y de la ingesta diaria de grasa. No obstante, no se tienen en cuenta factores intrínsecos al alimento (perfil lipídico, estructura matricial, etc.) y extrínsecos (tipo de procesado, pH intestinal, concentración biliar, etc.) que pueden afectar a la digestibilidad de las grasas.

En el presente estudio se ha empleado un modelo de digestión *in vitro* para evaluar la eficacia de distintas dosis del suplemento enzimático Kreon® (0-4000 UL/g grasa) en la digestión de lípidos y proteínas de diferentes productos cárnicos (hamburguesa, chopped, salchicha, paté), así como, la influencia de distintas condiciones fisiológicas durante la etapa intestinal (pH 6/7; [bilis] 1/10 mM).

Los resultados mostraron que el aumento de la dosis de Kreon® se tradujo en un aumento significativo de la solubilidad proteica, así como de la digestibilidad de las grasas en todos los productos, excepto en el chopped y en el paté, respectivamente. En cuanto a la solubilidad proteica, tanto el pH como la concentración biliar tuvieron un efecto significativo, siendo pH 7/ [bilis] 10 mM la condición que proporcionó mayores valores en la hamburguesa y en la salchicha. En cambio, en cuanto al grado de lipólisis, el pH y la concentración biliar únicamente influyeron de forma significativa en la hamburguesa y el chopped. Por tanto, los resultados obtenidos reflejan que el tipo de alimento, su procesado previo y su estructura matricial, afectan en la digestibilidad de sus macronutrientes, de modo que, se resalta la importancia de la realización de estudios similares sobre distintos alimentos, con la finalidad de adecuar lo máximo posible la dosis de suplemento enzimático en función de la ingesta del paciente.

PALABRAS CLAVE: digestión *in vitro*, insuficiencia pancreática, lipólisis, productos cárnicos.

ABSTRACT

Pancreatic exocrine insufficiency is a severe condition associated to various diseases resulting in the inability for the pancreas to secrete enough enzymes into the small intestine, this causing maldigestion and malabsorption of nutrients, especially of lipids. Nowadays, treatment involves oral administration of an enzyme supplement pancreatin (Kreon®), whose dosage is established depending on the age and weight of the patient, and the daily fat intake. However, intrinsic food factors (lipid profile, matrix structure, etc.) and extrinsic factors (type of processing, intestinal pH,

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

bile concentration, etc.) are not yet taken into account, which may affect the digestibility of fats.

In the present study an *in vitro* digestion model has been employed to evaluate the efficiency of different doses of enzyme supplement, Kreon® (0-4000 LU / g fat), in the lipid and protein digestion of different meat products (hamburger, chopped, sausage, pate) and the influence of various physiological conditions during the intestinal phase (pH 7/6; [bile] 1/10 mM).

Results showed that an increase in Kreon® dose resulted in a significant increase in protein solubility as well as in fat digestibility, for all the products, except for the chopped and pate, respectively. Regarding protein solubility, both, pH and bile concentration, had a significant effect, being pH 7 / [bile] 10 mM the condition which provided higher values for hamburger and sausage. However, concerning lipolysis, pH and bile concentration, influenced significantly only in the lipolysis values for hamburger and chopped. Therefore, results reveal that the type of food, its pre-processing and matrix structure, affect the digestibility of its macronutrients, so the importance of conducting similar studies on different food products is highlighted, in order to adjust the enzyme supplement dose as much as possible according to the patient's food intake.

KEYWORDS: *in vitro* digestion, pancreatic insufficiency, lipolysis, meat products.

RESUM

La insuficiència pancreàtica exocrina és una afecció greu associada a diverses malalties que es tradueix en una incapacitat del pàncrees per secretar la quantitat suficient d'enzims a l'intestí prim, ocasionant maldigestió i malabsorció de nutrients, especialment de lípids. Actualment, el tractament consisteix en l'administració oral d'un suplement enzimàtic de pancreatina (Kreon®), la dosificació de la qual s'estableix en funció de l'edat i el pes del pacient, i de la ingesta diària de greix. No obstant això, no es tenen en compte factors intrínsecs a l'aliment (perfil lipídic, estructura matricial, etc.) i extrínsecs (tipus de processat, pH intestinal, concentració biliar, etc.) que poden afectar la digestibilitat dels greixos.

En el present estudi s'ha utilitzat un model de digestió *in vitro* per avaluar l'eficàcia de diferents dosis del suplement enzimàtic Kreon® (0-4000 UL / g greix) en la digestió de lípids i proteïnes de diferents productes càrnics (hamburguesa, chopped, salsitxa, paté), així com, la influència de diferents condicions fisiològiques durant l'etapa intestinal (pH 6/7; [bilis] 1/10 mM).

Els resultats van mostrar que l'augment de la dosi de Kreon® es va traduir en un augment significatiu de la solubilitat proteica, així com de la digestibilitat dels greixos en tots els productes, excepte en el chopped i el paté, respectivament. Quant a la solubilitat proteica, tant el pH com la concentració biliar van tenir un efecte significatiu, sent pH 7 / [bilis] 10 mM la condició que va proporcionar majors valors a l'hamburguesa i la salsitxa. En canvi, pel que fa al grau de lipòlisi, el pH i la concentració biliar únicament van influir de manera significativa en l'hamburguesa i el chopped. Per tant, els resultats obtinguts reflecteixen que el tipus d'aliment, el seu processat previ i la seua estructura matricial, afecten en la digestibilitat dels seus macronutrients, de manera que, es ressalta la importància de la realització d'estudis similars sobre diferents aliments, amb la finalitat d'adequar el màxim possible la dosi de suplement enzimàtic en funció de la ingesta del pacient.

PARAULES CLAU: digestió *in vitro*, insuficiència pancreàtica, lipòlisi, productes càrnics.

1. INTRODUCCIÓN

La insuficiencia pancreática exocrina es una afección grave que puede estar causada por una pérdida de parénquima funcional (atrofia), obstrucción del conducto pancreático o asincronía postprandial. Está asociada a diversas enfermedades como la pancreatitis crónica, la fibrosis quística o el cáncer de páncreas, aunque también puede aparecer como resultado de una cirugía de páncreas (resección pancreática). La aparición de este trastorno fisiológico, se traduce en una incapacidad del páncreas para secretar la cantidad suficiente de enzimas en el intestino delgado, necesarias para digerir los nutrientes intraluminales aportados por la dieta. La falta o ausencia de enzimas pancreáticas (lipasas, proteasas y amilasas) conduce a una mala digestión y, por tanto, a una malabsorción de lípidos, proteínas e hidratos de carbono, causando esteatorrea y creatorrea que se traduce en malestar abdominal, pérdida de peso y deficiencias nutricionales (Sikkens et al., 2010). La digestión de los lípidos es la que se ve más afectada, puesto que ocurre principalmente en el duodeno, donde tras la etapa gástrica las sales biliares, producidas por el hígado, emulsionan los lípidos en pequeñas gotas promoviendo la actividad de la lipasa pancreática y facilitando su posterior absorción en forma de micelas (Guerra et al., 2012). Además, en individuos con insuficiencia pancreática, se ha observado una disminución en la secreción de bicarbonato por parte del páncreas, influyendo en el pH intestinal y afectando negativamente a la actividad lipasa y a la solubilidad de las sales biliares (Gelfond et al., 2013; Sikkens et al., 2010). La maldigestión y malabsorción de grasas está asociada a su vez con deficiencias en vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y ácidos grasos esenciales (Turck et al., 2016).

Actualmente, el tratamiento para la insuficiencia pancreática consiste en la administración oral de un suplemento de pancreatina en forma de microesferas cubiertas con una cápsula gastrorresistente. La dosificación se establece en función de la edad y el peso del paciente, y de la ingesta diaria de grasa (Turck et al., 2016), criterios que pueden resultar insuficientes al no observarse una mejora sustancial en el estado nutricional de estos pacientes. De hecho, a la hora de administrar este tratamiento, no se están teniendo en cuenta factores intrínsecos al alimento, como el tipo de grasa y su contenido, el perfil lipídico o la estructura matricial, que podrían afectar a la accesibilidad de la grasa por parte de la lipasa pancreática, no resultando necesaria la misma cantidad de suplemento enzimático para alimentos con el mismo contenido graso. A su vez, las condiciones del entorno duodenal donde se libera el suplemento y realiza su acción pueden afectar al grado de lipólisis y proteólisis (Gelfond et al., 2013).

La carne es un alimento de alto valor biológico dentro de la dieta, ya que aporta proteínas y lípidos, y constituye una importante fuente de aminoácidos esenciales, micronutrientes (minerales y vitaminas) y, en menor medida, ácidos grasos esenciales. Concretamente, en España, el consumo medio aproximado de carne en 2015 se situó en 50,14 kg por persona y año. De esta cantidad el 74% se correspondía con carne fresca, seguida de la carne transformada con un 23,4% sobre el total (MAGRAMA, 2016). Tanto la carne fresca, como la transformada se encuentra comúnmente en el mercado con múltiples formatos, haciéndose cada vez más accesibles para el consumidor. Las carnes transformadas son productos elaborados a partir de diferentes piezas de carne, troceadas o picadas, que son procesadas en crudo o en forma de emulsiones cárnicas cocidas y listas para su consumo, y que por su facilidad de preparación y/o consumo cuentan con una gran aceptación, sobre todo entre la población infantil.

En este contexto, el objetivo de este estudio consiste en evaluar la eficacia del suplemento enzimático de pancreatina, denominado Kreon®, en la digestión de

lípidos y proteínas de diferentes productos cárnicos, empleando un modelo de digestión *in vitro*. Así mismo, se ha analizado la influencia de las condiciones de la etapa intestinal (pH y concentración biliar) en la efectividad del suplemento. Además, se han realizado otras determinaciones, como la degradación de la matriz y observaciones microscópicas, con la finalidad de comprender en mayor medida los resultados obtenidos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Los productos cárnicos estudiados fueron: hamburguesa de carne de vacuno y cerdo, chopped pork en lonchas, salchicha tipo *Frankfurt* y paté de hígado de cerdo; adquiridos en supermercados locales de Valencia, España. En la **Tabla 2.1**, se recogen los contenidos en grasa y proteína por 100 g de producto, indicados en las etiquetas de los productos adquiridos.

TABLA 2.1. Contenido en grasa y proteína por 100 g de producto, indicado en el etiquetado nutricional de los productos cárnicos en estudio.

PRODUCTO	Grasa (%)	Proteína (%)
Hamburguesa	19	15
Chopped	13,2	12,6
Salchicha	14,9	13,3
Paté	24	11

Los reactivos empleados para la preparación de stocks y fluidos digestivos simulados fueron los siguientes: CaCl_2 , KCl , KH_2PO_4 , NaCl , NaHCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ y $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, obtenidos de Sigma-Aldrich. Para la realización de la simulación *in vitro* gastrointestinal se empleó pepsina procedente de mucosa gástrica porcina (P6887, Sigma-Aldrich), bilis bovina (B3883, Sigma-Aldrich) y pancreatina porcina comercial de uso hospitalario (Kreon® Abbott) disponible en cápsulas. Cada cápsula contiene 150 mg de pancreatina porcina en forma de microesferas gastrorresistentes equivalentes a: 10000 unidades lipasa (UL), 8000 unidades amilasa (UA) y 600 unidades proteasa (UP). También se utilizó NaOH y HCl 1 N (AppliChem Panreac) para los ajustes de pH. En cuanto a las determinaciones analíticas posteriores al proceso de digestión *in vitro*, se emplearon los siguientes reactivos: Triton X-100, éter de petróleo, ácido tricloroacético (TCA), ácido palmítico y albúmina sérica bovina (BSA) adquiridos de Sigma-Aldrich, además de, urea cristalina para análisis (AppliChem Panreac) y etanol al 96 % (Labkem).

2.2. Preparación de la muestra

Previamente al proceso de digestión, la hamburguesa fresca fue partida en cuartos y se cocinó en un horno microondas durante 4 minutos (600 W) hasta su completa cocción. El resto de matrices cárnicas no fueron sometidas a ningún tipo de tratamiento térmico previo puesto que ya eran aptas para su consumo cuando se adquirieron.

2.3. Digestión *in vitro* gastrointestinal

En la simulación de la digestión gastrointestinal se empleó un modelo de digestión *in vitro* estático que constaba de tres etapas: oral, gástrica e intestinal. La simulación se realizó en base al protocolo consensuado a nivel europeo por la ACTIONCOST INFOGEST publicado por *Minekus et al.* (2014). Para llevarla a cabo se prepararon las disoluciones stock simuladas necesarias en cada etapa (**Tabla 2.2**), a partir de las cuales se prepararon los fluidos gástrico e intestinal simulados (FGS y FIS) adicionando los componentes fisiológicos necesarios en cada caso (**Tabla 2.3**). Por otra parte, durante la etapa intestinal se ensayaron diferentes condiciones fisiológicas con la finalidad de analizar tanto la influencia de la concentración de pancreatina (Kreon®), como la influencia del pH y de la concentración de sales biliares sobre la lipólisis y proteólisis de los productos cárnicos en estudio. Para ello se diseñó un plan experimental (**Tabla 2.4**), con un total de 8 ensayos, que fue aplicado en la digestión de cada muestra. En primer lugar, para estudiar cómo afectaba la dosis de Kreon® se varió la concentración de la enzima (0, 1000, 2000, 3000 y 4000 UL/g grasa), teniendo en cuenta las recomendaciones generales para pacientes con insuficiencia pancreática (Turck et al., 2016), manteniendo constantes el pH (6) y la concentración de sales biliares (1 mM), considerando que son las condiciones fisiológicas presentes en un individuo con insuficiencia pancreática (Aseeri et al., 2012; Gelfond et al., 2012). En segundo lugar, se varió el pH (6 ó 7) y la concentración biliar (1 ó 10 mM) manteniendo constante la dosis de Kreon® (2000 UL/g grasa), siendo pH 7 y 10 mM las condiciones fisiológicas correspondientes a un adulto sano (Minekus et al., 2014). Además, con la finalidad de mantener aproximadamente constante el ratio enzima/sustrato durante el proceso digestivo (Lamothe et al., 2014), se estimó la cantidad necesaria de cada alimento en función de su composición para que hubiera presente 0,35 g grasa en cada ensayo, puesto que el Kreon® presenta la función lipasa como principal actividad enzimática. Por tanto, como se recoge en las **Tablas 2.4 y 2.5**, la actividad lipasa (expresada como UL/g grasa) se mantuvo constante en todas las matrices, mientras que, la actividad proteasa (expresada como UP/g proteína) fue diferente para cada una de las mismas. A su vez, en la **Tabla 2.6** se ha expresado la concentración de Kreon® empleada en cada ensayo en función de la cantidad de producto cárnico sometido a digestión.

En la **etapa oral**, la cantidad estimada para cada tipo de matriz se homogeneizó con 5 mL de la disolución stock simulada (SSS), batiendo la muestra con una batidora doméstica (Ufesa, Vario Mixer, 600 W) durante 3 minutos (Minekus et al., 2014) para simular la masticación, y se introdujo en tubos falcon de 50 mL.

En la **etapa gástrica**, se añadieron 10 mL del fluido gástrico simulado (FGS) y la cantidad de Kreon® correspondiente según el ensayo (**Tabla 2.4**). Seguidamente, se ajustó el pH a 3 con la ayuda de un pH-metro (Seven Compact™ S210, Mettler Toledo) mediante la adición de HCL (1 N). A continuación, se introdujeron los tubos en una cámara termostataada (SELECTA modelo Boxcult 3000957) a 37 °C en agitación circular (arriba-abajo) constante a 55 rpm durante 120 minutos.

En la **etapa intestinal**, se añadieron 20 mL de fluido intestinal simulado (FIS) con una concentración biliar calculada, para que la concentración de fluidos en el intestino fuera de 1 ó 10 mM según el diseño experimental; en base al cual también se ajustó el pH a 6 ó 7 (**Tabla 2.4**) con NaOH (1 N) y la ayuda del pH-metro. Posteriormente, se volvieron a introducir los tubos en la cámara termostataada a 37 °C en agitación circular constante a 55 rpm durante 120 minutos, controlando el pH cada 30 minutos y reajustándolo en caso de que fuese necesario con el fin de mantenerlo constante. Una vez finalizado el tiempo de digestión, las muestras se incubaron en agua con hielo durante 10 minutos y, a continuación, se ajustó el pH a 9 con NaOH (1 N) para la inactivación enzimática.

TABLA 2.2. Composición, volumen y concentración de los solutos requeridos en la preparación de las disoluciones stock simuladas (1 L).

Constituyente	SSS		SGS		SIS	
	Volumen (mL)	Concentración (nmol/ L)	Volumen (mL)	Concentración (nmol/ L)	Volumen (mL)	Concentración (nmol/ L)
KCl	30,2	15,1	13,8	6,9	13,6	6,8
KH ₂ PO ₄	7,4	3,7	1,8	0,9	1,6	0,8
NaHCO ₃	-	-	25	25	95	85
NaCl	6,8	13,6	23,6	47,2	18,3	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	1	0,15	0,8	0,1	2,2	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,12	0,06	1	0,5	-	-
Agua destilada	947,68		934		869,3	
Volumen total	1000		1000		1000	

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

TABLA 2.3. Composición de los fluidos gástrico e intestinal simulados (FGS y FIS) utilizados durante la simulación de la digestión.

Constituyente	FGS *	FIS *
SGS	375 mL	-
SIS	-	452,083 mL
Pepsina porcina	41,86 mg	-
CaCl₂ (0,3 M)	0,25 mL	0,833 mL
Bilis	-	439,833 mg **
Volumen final	500 mL	500 mL

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

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

TABLA 2.4. Nomenclatura y condiciones de concentración de Kreon®, con su equivalencia en unidades lipasa (UL), pH y concentración biliar de la etapa intestinal en cada ensayo y matriz alimentaria.

Nomenclatura	[Kreon®] (mg/ mL) *	UL/ g grasa	UL/ mL	pH	[Bilis] (mM)
0	0	0	0		
1000	0,24	1000	9,32		
2000	0,48	2000	18,64	6	1
3000	0,71	3000	27,97		
4000	0,95	4000	37,29		
6/10	0,48	2000	18,64	6	10
7/1	0,48	2000	18,64	7	1
7/10	0,48	2000	18,64	7	10

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

TABLA 2.5. Concentración de Kreon® y su equivalencia en unidades proteasa (UP) en la digestión de cada uno de los productos cárnicos por separado.

[Kreon®] (mg/ mL)	Hamburguesa		Chopped		Salchicha		Paté	
	UP/ g proteína	UP/ mL	UP/ g proteína	UP/ mL	UP/ g proteína	UP/ mL	UP/ g proteína	UP/ mL
0,24	76	2,02	63	1,67	67	1,79	131	3,49
0,48	152	4,05	126	3,35	134	3,58	262	6,97
0,71	228	6,07	188	5,02	201	5,37	392	10,46
0,95	304	8,10	251	6,70	269	7,16	523	13,95

TABLA 2.6. Concentración de Kreon® en cada ensayo y su equivalencia en mg Kreon®/ g de producto en la digestión de cada una de las matrices cárnicas.

[Kreon®] (mg/mL)	Hamburguesa mg Kreon®/ g producto	Chopped mg Kreon®/ g producto	Salchicha mg Kreon®/ g producto	Paté mg Kreon®/ g producto
0,24	6,5	3,4	3,8	6,1
0,48	13,1	6,7	7,6	12,2
0,71	19,6	10,1	11,4	18,4
0,95	26,1	13,5	15,2	24,5

2.4. Determinaciones analíticas

El contenido en humedad y en grasa de las diferentes matrices cárnicas previas a su digestión fue determinado según los métodos oficiales de la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2000). El contenido en humedad se determinó teniendo en cuenta la variación de masa experimentada por la muestra antes y después del proceso de secado en estufa. Para llevarlo a cabo, se depositó aproximadamente 1 g de muestra en un recipiente adecuado, se disgregó con ayuda de una varilla de vidrio y arena de mar, y se introdujo en estufa de vacío a 60 °C hasta alcanzar peso constante. Para la determinación del contenido en grasa se sometió a las muestras previamente liofilizadas (2 g, -45 °C, 1·10⁻² bar, modelo Telstar Lyoalfa-6) a una extracción con éter de petróleo (40:60) mediante un equipo Soxhlet.

DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ

El grado de degradación de la matriz fue determinado a partir de la proporción de sólidos que se encontraba dispersa en los jugos digestivos al final de la digestión, empleando el método descrito por *Lamothe et al.* (2012). Los tubos resultantes tras cada proceso digestivo se centrifugaron (3000 rcf, 15 minutos) y su contenido se filtró a través de un tamiz metálico (1,5 mm x 1,5 mm de malla) para separar las partículas grandes. La fracción líquida drenada o fase micelar (FM) se recogió y se almacenó en congelación (-20 °C) hasta su posterior uso en observaciones microscópicas y determinaciones de ácidos grasos libres (AGL) y solubilidad proteica. La fracción sólida o fase sólida (FS) retenida en el tamiz fue recogida en un recipiente de aluminio con la ayuda de pequeños volúmenes de agua destilada, así como, las partículas adheridas a las paredes y el fondo de los tubos. Los recipientes con FS fueron llevados a estufa de vacío a 60 °C durante 48 h. El índice de degradación de la matriz (IDM) fue calculado empleando la **ecuación 1**:

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

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

MEDIDA DE LA SOLUBILIDAD PROTEICA

La determinación de la solubilidad proteica se llevó a cabo midiendo la fracción proteica soluble en ácido tricloroacético (TCA), compuesta por péptidos pequeños y residuos de aminoácidos, siguiendo el método establecido por *Lamothe et al.* (2014).

Para ello, el TCA se añadió a las muestras digeridas para obtener una concentración final del 12 % (p/p). Seguidamente, la mezcla fue agitada en vórtex, incubada durante 15 minutos y filtrada usando un embudo Büchner, conectado a un kitasatos y a una bomba de vacío, con papel de filtro Whatman no. 40. Una vez obtenido el filtrado, éste se diluyó mediante un tampón (50 mM EDTA, 8 M urea, pH 10). La proteína soluble se determinó mediante espectrofotometría (Beckman Coulter UV-VIS Spectrophotometer), midiéndose la absorbancia a 280 nm frente a un blanco preparado con tampón y los fluidos digestivos apropiados. Para realizar los cálculos se empleó una curva de calibrado elaborada a partir de una disolución patrón de albúmina sérica bovina (BSA). Los resultados se expresaron como g equivalentes de BSA solubles en TCA por g de muestra.

MEDIDA DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES: EXTENSIÓN DE LA LIPÓLISIS

Para la determinación de los AGL se diluyeron 100 µl de FM de las muestras digeridas en una disolución acuosa (5,6 % Triton X-100 y 6 % etanol), necesaria para solubilizar los AGL y asegurar la inhibición de la actividad lipasa (Lamothe et al., 2012). Posteriormente, se empleó un kit enzimático (Roche Diagnostics) y se midieron los AGL midiendo la absorbancia de las diluciones a 546 nm mediante espectrofotometría. Los valores de absorbancia obtenidos se compararon con los valores obtenidos en una curva de calibrado realizada con un patrón de ácido palmítico. Los resultados se expresaron como extensión de la lipólisis (g de triglicérido/ 100 g grasa inicial), teniendo en cuenta el peso molecular del ácido palmítico y que por cada molécula de triglicérido se liberan dos ácidos grasos.

MICROSCOPIA ÓPTICA

Las observaciones por microscopía óptica se realizaron a partir de FM recogidas antes y después de la digestión de las muestras. Se mezclaron con una disolución de Red Oil (5 % en isopropanol) en una proporción 4:1 (v/v), se agitaron en vórtex durante 10 segundos y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C. A continuación, se tomó una gota de la mezcla y se colocó en un portaobjetos, para su observación en microscopio óptico Leica DM 5000 B. Se adquirieron imágenes de las muestras con una cámara (Leica, DFC550) mediante el software de adquisición de imágenes LAS (Leica Application Suite).

2.5. Análisis estadístico

Las digestiones *in vitro* se realizaron por triplicado para cada tipo de matriz y los resultados se expresaron como la media y la desviación estándar. El análisis de varianza (ANOVA) se llevó a cabo empleando el software Statgraphics Centurion XVI con un nivel de confianza del 95 %, considerando las diferencias estadísticamente significativas cuando $P_{\text{value}} \leq 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de las matrices alimentarias antes de la digestión

La **Tabla 3.1** recoge el contenido en humedad y grasa respecto a 100 g de producto de las matrices alimentarias sin digerir. Los productos estudiados presentaron un contenido de humedad entre el 60-70 %, excepto la hamburguesa,

cuyo contenido fue inferior (50,7 %) debido a las pérdidas sufridas durante el proceso de cocinado; estas pérdidas de agua modifican así mismo la concentración de grasa del producto cocinado, que pasa del 19% en el producto crudo al 23,8% en el producto cocinado.

TABLA 3.1. Contenido de humedad y grasa (%) de cada una de las matrices cárnicas antes de la digestión (media \pm desviación estándar, n=3).

Matriz cárnica	Humedad (%)	Grasa (%)
Hamburguesa *	50,7 \pm 3,0	23,8 \pm 4,1
Chopped	65,3 \pm 0,2	12,0 \pm 0,6
Salchicha	68,3 \pm 0,2	10,7 \pm 0,3
Paté	60,6 \pm 0,4	30,3 \pm 8,5

*Determinaciones analíticas realizadas tras su cocinado.

Las diferencias en cuanto al contenido y distribución de la grasa de las distintas matrices se pueden observar en las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica recogidas en la **Figura 3.1**.

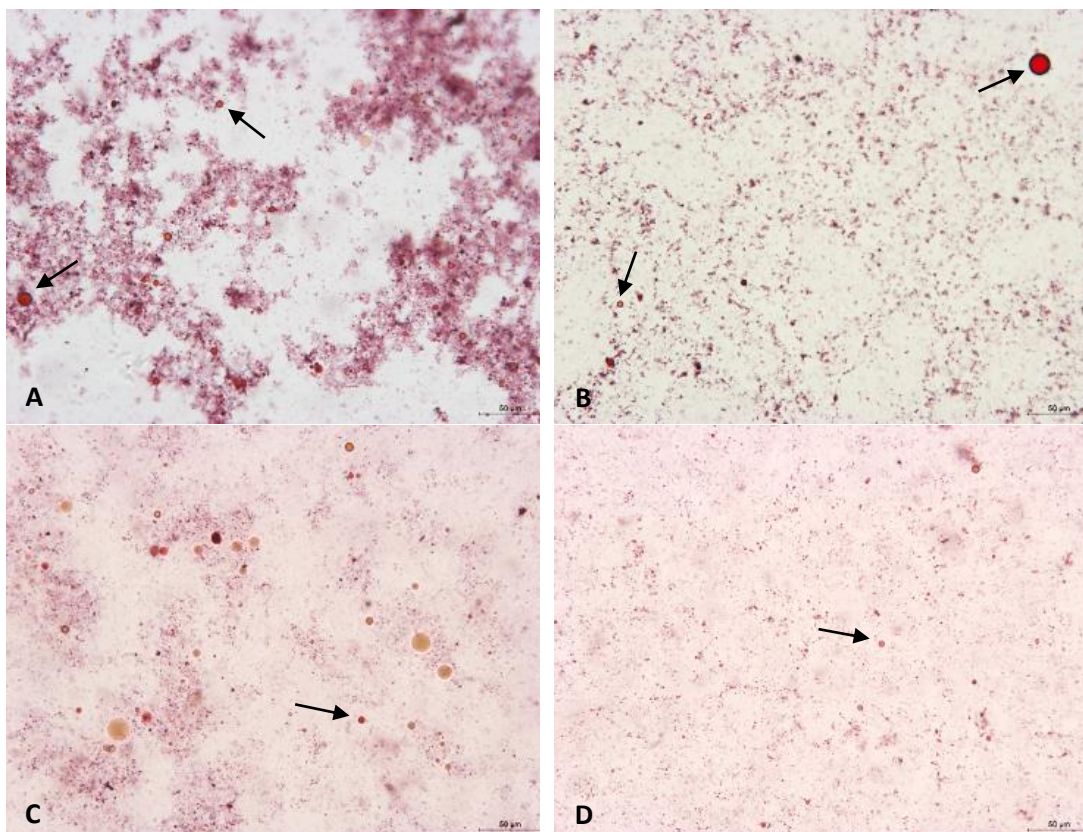


FIGURA 3.1. Micrografías ópticas representativas de los glóbulos de grasa (en rojo) en las distintas matrices cárnicas: hamburguesa (A), chopped (B), salchicha (C) y paté (D). Se han obtenido previamente al proceso de digestión a una magnificación de 20x. La distancia entre las barras horizontales es de 50 μ m.

La micrografía de la hamburguesa muestra glóbulos grasos de tamaño heterogéneo (A) en comparación con el resto de matrices cárnicas, ya que el picado de la carne durante su elaboración es menos intenso que en el resto de productos, lo que conlleva a una menor uniformidad en el tamaño de las partículas grasas (Andersson et al., 2000). El chopped presenta glóbulos grasos muy dispersos y de

distinto tamaño (B). En cuanto a la salchicha, se puede observar una menor cantidad de glóbulos de tamaño relativamente homogéneo (C). En el caso del paté se observa una mayor cantidad de glóbulos grasos, de menor tamaño y uniformemente distribuidos (D), probablemente debido a su proceso de elaboración en el que se consigue una emulsión donde las partículas de grasa están finamente distribuidas en la matriz proteica (Steen et al., 2014).

3.2. Influencia de las condiciones de simulación de la etapa intestinal sobre la degradación de la matriz

Durante la digestión gastrointestinal tienen lugar procesos mecánicos, químicos y enzimáticos que conducen a la degradación gradual de las matrices alimentarias facilitando la liberación de los macro y micronutrientes. Este fenómeno resulta de especial relevancia en matrices sólidas o semisólidas, como es el caso de los alimentos analizados en este trabajo. El índice de degradación de la matriz (IDM) puede considerarse como un indicador de digestibilidad que engloba el efecto de mecánico de las etapas gástrica e intestinal, el efecto de la hidrólisis ácida como consecuencia del pH gástrico y el efecto enzimático tanto de la pepsina gástrica como de la actividad lipasa, proteasa y amilasa de la pancreatina (Kreon®).

En la **Figura 3.2**, se han representado los valores obtenidos del IDM (%) acumulado al final del proceso de digestión *in vitro* (pH 6 y concentración biliar 1 mM) en función de la dosis de Kreon® para cada una de las matrices estudiadas. En todos los casos, se observaron diferencias significativas entre el IDM obtenido en ausencia y presencia de pancreatina, aunque el empleo de distintas dosis no se reflejó en valores distintos de este parámetro. En cuanto a las diferencias entre matrices, el IDM del chopped, la salchicha y el paté fue mayor que el observado en la hamburguesa, reflejando de forma coherente el papel de la estructura en el proceso de digestión. La hamburguesa está compuesta por fibras musculares más o menos intactas que son más difíciles de degradar, así como, fracciones de grasa sólida estructuralmente más resistente a las fuerzas biomecánicas simuladas durante la digestión y, por lo tanto, con un área superficial menor que retarda su degradación enzimática (Andersson et al., 2000; Golding & Wooster, 2010). Por otro lado, se observó que el IDM del paté en ausencia de Kreon® fue mayor en comparación con el resto de matrices, posiblemente debido a que se trata de un producto untado con una estructura menos estable y más fácilmente degradable.

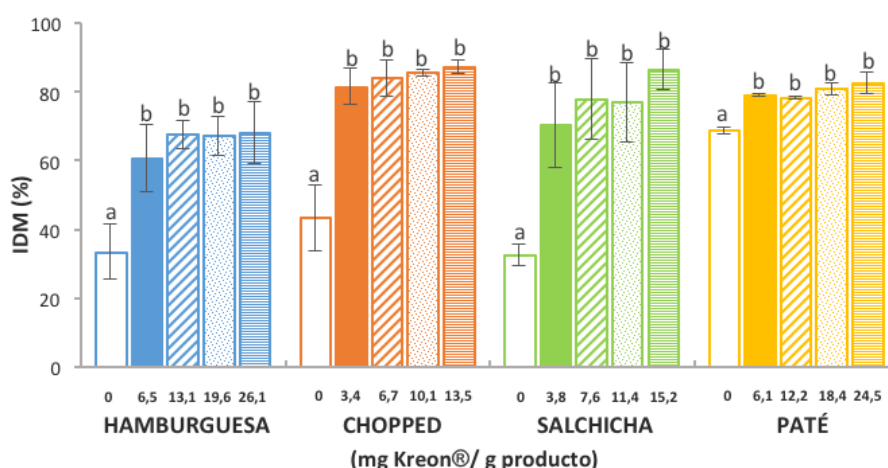


FIGURA 3.2. Influencia de la dosis de Kreon® (mg/ g producto) en el índice de degradación de la matriz (IDM (%)) después de la etapa intestinal, para los distintos tipos de muestra. Las dosis de Kreon® se muestra bajo las barras (Tabla 2.6). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre grupos homogéneos, de cada alimento por separado, con un nivel de significación del 95 % ($p < 0,05$). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar ($n=3$).

En la **Figura 3.3**, se muestra la influencia del pH intestinal (6 y 7) y la concentración biliar (1 y 10 mM) sobre el IDM (%) para una dosis fija de Kreon® (0,48 mg/ mL). La **Tabla 3.2** recoge los resultados del análisis estadístico el cuál reveló mayor influencia significativa del pH en el IDM de la hamburguesa y de la salchicha, mientras que, no afectó al IDM del chopped al que tampoco afectó la concentración biliar. Sin embargo, se puede observar que en la degradación de la matriz del paté influyeron ambos factores, si bien la concentración biliar lo hizo en mayor medida. Este hecho podría deberse a que la mayor presencia de bilis facilita el acceso de la enzima a los glóbulos grasos, traduciéndose en una mayor degradación de la matriz (Wilde & Chu, 2011).

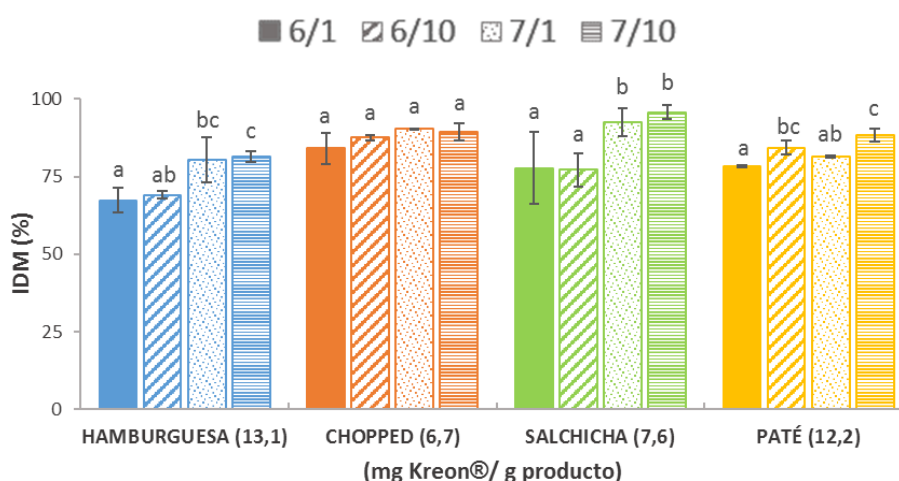


FIGURA 3.2. Influencia del pH y de la concentración biliar (mM) en el índice de degradación de la matriz (IDM (%)) de los alimentos digeridos. La dosis de Kreon® (mg/ g producto), marcada entre paréntesis en el eje X, se mantuvo constante en cada producto (Tabla 2.6) siendo equivalente a 0,48 mg/ mL. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre grupos homogéneos, de cada alimento por separado, con un nivel de significación del 95 % ($p < 0,05$). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar ($n=3$). Código de la leyenda: pH/[bilis].

TABLA 3.2. Resumen del ANOVA multifactorial ($p < 0,05$) en función del tipo de muestra, pH y concentración biliar (mM) para la variable dependiente IDM (%). La dosis de Kreon® (mg/ g producto) se mantuvo constante en cada muestra siendo equivalente a 2000 UL/ g grasa (0,48 mg Kreon®/ mL).

PRODUCTOS	EFEKTOS PRINCIPALES	Grados de libertad	Razón-F	Valor-P
Hamburguesa	A: pH	1	18,23	0,013*
	B: [Bilis] (mM)	1	0,22	0,6661
	INTERACCIONES			
	AB	1	0,01	0,9251
Chopped	A: pH	1	3,8	0,123
	B: [Bilis] (mM)	1	0,3	0,6125
	INTERACCIONES			
	AB	1	1,2	0,3356
Salchicha	A: pH	1	11,93	0,026*
	B: [Bilis] (mM)	1	0,07	0,7998
	INTERACCIONES			
	AB	1	0,16	0,7117
Paté	A: pH	1	10,51	0,0316*
	B: [Bilis] (mM)	1	34,47	0,0042*
	INTERACCIONES			
	AB	1	0,12	0,7457

3.3. Influencia de las condiciones de simulación de la etapa intestinal sobre la solubilidad de las proteínas

La digestión de las proteínas se inicia en el estómago mediante la acción de la pepsina, que se activa gracias al HCl segregado en el estómago, hidrolizando aproximadamente el 15 % de las proteínas de la dieta en aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular. Una vez en el intestino delgado, las enzimas pancreáticas encargadas de la proteólisis (tripsina, quimiotripsina y carbopeptidasa) continúan el proceso de hidrólisis (Griffiths, 2014). Como consecuencia de esta compleja degradación a lo largo del tracto gastrointestinal, la proteólisis puede resultar en una variedad de productos con diferentes destinos como: aminoácidos y péptidos pequeños, que son absorbidos en el duodeno y el yeyuno; y proteínas no digeridas y péptidos de tamaño medio y grande, que pueden ser utilizados por las bacterias intestinales o excretados directamente (Guerra et al., 2012; Wen et al., 2015). Así pues, la determinación de la proteína soluble es una medida indirecta de la proteólisis, ya que dicha fracción soluble se corresponde con péptidos pequeños y residuos de aminoácidos, productos resultantes de la degradación proteica.

La **Figura 3.4** muestra la concentración de proteína soluble en TCA alcanzada después de la digestión gastrointestinal de cada una de las matrices estudiadas, en función de la dosis de Kreon® empleada (expresada en UP/ g proteína) y simulando un pH intestinal de 6 y concentración biliar 1 mM. En general, se observó un aumento de la solubilidad proteica conforme aumentó la dosis de Kreon®, aunque no resultó significativo para el caso del chopped, y fue más acusado en la hamburguesa que en la salchicha y el paté. Durante la etapa gástrica, el aumento en la solubilidad proteica se debe principalmente al efecto del pH ácido sobre la conformación de las proteínas, ya que se aproximan a su punto isoeléctrico, y a la acción proteolítica de la pepsina (Golding & Wooster, 2010). En la etapa duodenal, la solubilidad de las proteínas está condicionada por la acción proteolítica del Kreon® tal y como se deduce de los resultados obtenidos en ausencia de Kreon® (dosis 0), cuyos valores no son

significativamente diferentes a los obtenidos al final de la etapa gástrica (grupos homogéneos según el ANOVA).

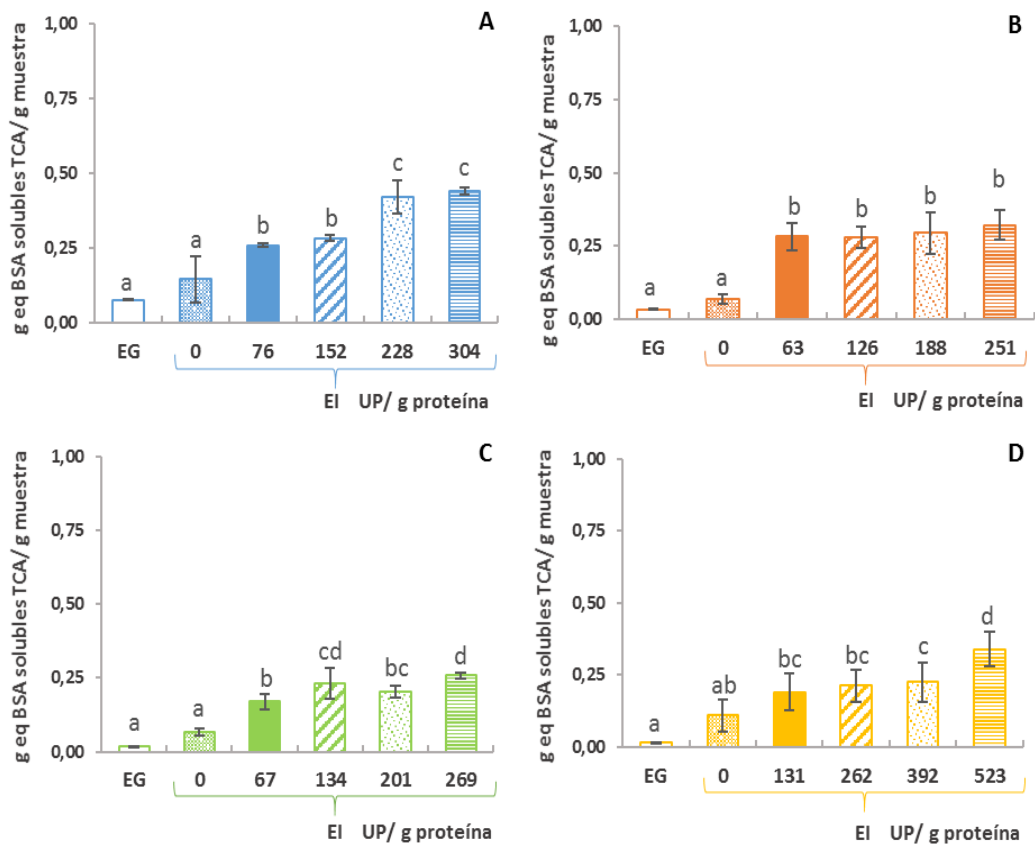


FIGURA 3.4. Influencia de la dosis de Kreon® (UP/ g proteína) en la solubilidad proteica, expresada como g equivalentes de BSA solubles en TCA/ g muestra, en las muestras: hamburguesa (A), chopped (B), salchicha (C) y paté (D). Código barras= EG: etapa gástrica; EI: etapa intestinal, con las dosis de Kreon® correspondientes (**Tabla 2.5**). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre grupos homogéneos, con un nivel de significación del 95 % ($p < 0,05$). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar ($n=3$).

Por otro lado, en la **Figura 3.5**, se muestra la influencia del pH intestinal (6 y 7) y la concentración biliar (1 y 10 mM) sobre la solubilidad de las proteínas, para una dosis fija de Kreon® (0,48 mg/ mL). En general, se observó que para todos los productos la combinación pH 7/ [bilis] 10 mM (condiciones que simulan un adulto sano) resultó en mayores valores de solubilidad proteica comparada con la combinación pH 6/ [bilis] 1mM (correspondiente con un paciente con insuficiencia pancreática). Como se puede observar en el resumen del análisis estadístico (**Tabla 3.3**), el pH afectó significativamente en todas las matrices excepto en el paté, mientras que, la concentración biliar influyó en todos menos en el chopped. El incremento de la actividad proteolítica de la proteasa pancreática como consecuencia del incremento de pH permite explicar los resultados obtenidos; así mismo, el papel de la bilis en la emulsificación y digestión de la grasa, también parece mejorar la digestión proteica que tiene lugar de forma simultánea, en especial en aquellos productos con elevado contenido en grasa (paté) o con partículas grasas de gran tamaño (hamburguesa).

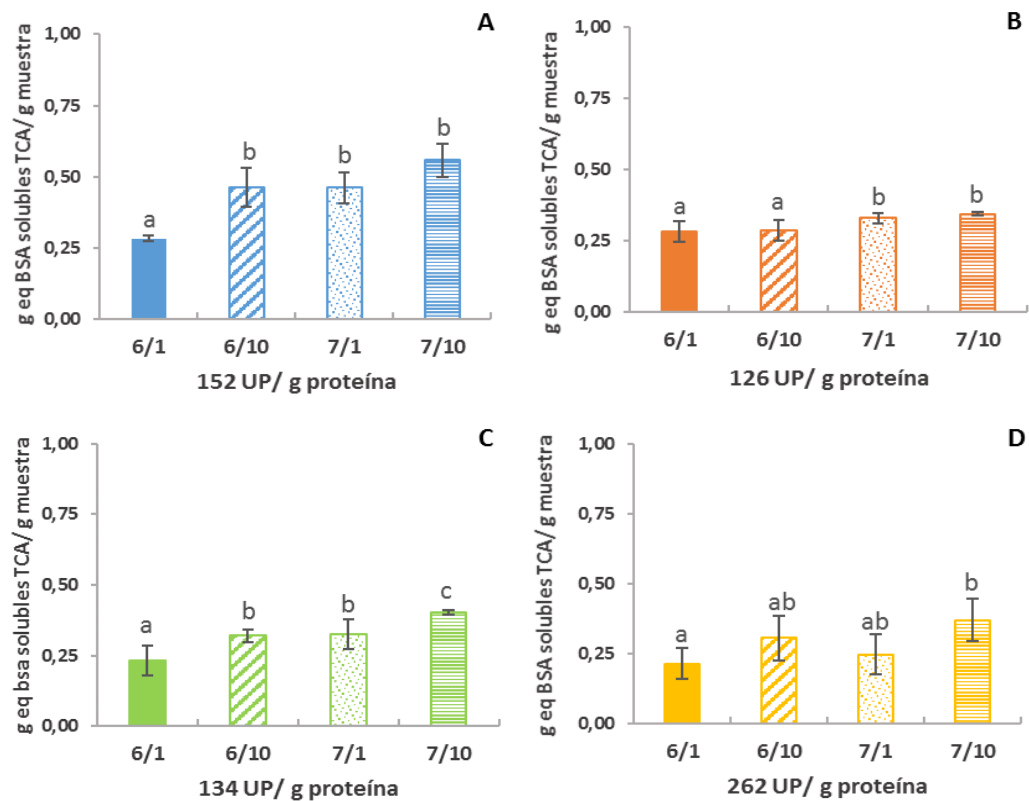


FIGURA 3.5. Influencia del pH y la concentración biliar (mM) en la solubilidad proteica, expresada como g equivalentes de BSA solubles en TCA/ g muestra, en las muestras: hamburguesa (A), chopped (B), salchicha (C) y paté (D). La dosis de Kreon® se mantuvo constante en cada producto (**Tabla 2.5**) siendo equivalente a 0,48 mg/ mL. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre grupos homogéneos, con un nivel de significación del 95 % ($p < 0,05$). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar ($n=3$).

TABLA 3.3. Resumen del ANOVA multifactorial ($p < 0,05$) en función del tipo de muestra, pH y concentración biliar (mM) para la variable dependiente g equivalentes de BSA solubles en TCA/ g muestra. La dosis de Kreon®, referida a su actividad proteasa, se mantiene constante en cada muestra, siendo equivalente a 2000 UL/ g grasa (0,48 mg Kreon®/ mL).

PRODUCTOS	EFFECTOS PRINCIPALES	Grados de libertad	Razón-F	Valor-P
Hamburguesa	A: pH	1	15,18	0,0059*
	B: [Bilis] (mM)	1	16,75	0,0046*
	INTERACCIONES			
	AB	1	1,56	0,2515
Chopped	A: pH	1	7,66	0,0325*
	B: [Bilis] (mM)	1	0,31	0,5999
	INTERACCIONES			
	AB	1	0,05	0,8385
Salchicha	A: pH	1	15,36	0,0044*
	B: [Bilis] (mM)	1	13,09	0,0068*
	INTERACCIONES			
	AB	1	0,09	0,7707
Paté	A: pH	1	1,57	0,2452
	B: [Bilis] (mM)	1	6,5	0,0342*
	INTERACCIONES			
	AB	1	0,13	0,7252

Aunque los resultados obtenidos no permiten profundizar en la digestión de las proteínas de los distintos alimentos, merece la pena revisar qué factores, como la estructura y el procesado previo de los distintos productos, implican cambios importantes de la naturaleza proteica y, por tanto, en su posterior digestibilidad. Así, por ejemplo, la estructura de la hamburguesa se compone principalmente de haces de fibras y fibras musculares más o menos intactas, mientras que en el resto de productos la mayor parte de la estructura la compone una red proteica formada a partir de proteínas disueltas de la carne, siendo más fina y homogénea (Andersson et al., 2000). Por otra parte, según *Bax et al.* (2012) las temperaturas elevadas aplicadas durante el procesado favorecen la desnaturalización de las proteínas, haciendo que cambie su conformación y facilitando el acceso de la pepsina en la etapa gástrica y de la pancreatina en la etapa duodenal. Sin embargo, también se ha visto que al aumentar tanto la temperatura como el tiempo de calentamiento en emulsiones cárnicas, como en el caso del chopped, la salchicha y el paté, se ve afectada la capacidad de hidrólisis de la pepsina (Sun et al., 2011). Estos productos pasan por procesos de picado intenso con la finalidad de obtener una pasta fina que después se moldea o enlata y se somete a temperaturas de pasteurización (80 °C), en el chopped y la salchicha, o de esterilización (> 100 °C) en el paté, durante tiempos más prolongados que los aplicados en la hamburguesa para poder venderse listos para su consumo (Estévez & Cava, 2004; Estévez et al., 2007). Este procesado ocasiona una mayor rotura de las fibras musculares y una mejor dispersión de las partículas grasas, favoreciendo la formación de una emulsión. Así pues, las proteínas se desnaturalizan por efecto del calor, e interactúan con los glóbulos grasos, formando una capa a su alrededor, a la vez que se agregan entre sí y/o se disuelven en la fase continua formando un gel (Andersson et al., 2000; Steen et al., 2014). Además, en las emulsiones cárnicas, los fenómenos de oxidación proteica, y posterior agregación proteica, pueden verse favorecidos por la presencia de lípidos que actúan como pro-oxidantes, limitando así la capacidad proteolítica de la pepsina (Santé-Lhoutellier et al., 2008; Sun et al., 2011). La diversidad de factores y mecanismos, así como, la complejidad que se deriva de las interacciones entre los distintos macronutrientes hacen que sea difícil extraer conclusiones relativas al grado de proteólisis mediante ensayos sencillos como el utilizado en este trabajo. El estudio del grado de proteólisis exige por tanto un estudio en profundidad utilizando métodos analíticos más específicos como los empleados en estudios de proteómica: electroforesis en gel (SDS-PAGE), cromatografía líquida y espectrometría de masas (Wen et al., 2015)

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

La lipólisis es el proceso de hidrólisis enzimática que experimentan las grasas alimentarias para poder ser absorbidas en el intestino delgado. Aunque hay tres lipasas importantes implicadas en la digestión de lípidos en los seres humanos (lingual, gástrica y pancreática), es la lipasa pancreática la responsable de la mayoría de la hidrólisis lipídica. Las grasas ingeridas en la dieta se encuentran mayoritariamente en forma de triglicéridos (TG). La lipasa pancreática se encarga de hidrolizar los enlaces éster de los TG en las posiciones C1 y C3 liberando un ácido graso (AG) y un diglicérido (DG) o dos AG y un monoglicérido (MG) (Wilde & Chu, 2011).

La **Figura 3.6** muestra los valores de extensión de la lipólisis (%) una vez finalizada la etapa intestinal, en función de la dosis de Kreon® (mg/ mL) y en condiciones duodenales de pH 6 y concentración biliar 1 mM. La hamburguesa fue

el producto que menor extensión de la lipólisis experimentó probablemente porque se trata de una matriz menos desestructurada que el resto de productos estudiados. El procesado previo del paté, el chopped y la salchicha implica una compresión de los adipocitos de modo que la grasa que contienen pasa al exterior celular, emulsionándose en forma de pequeñas gotas y/o pequeñas agrupaciones de grasa. En la hamburguesa, en cambio, la grasa se encuentra mayoritariamente en forma de adipocitos separados o formando agregados de mayor tamaño de modo que resulta más difícil su emulsificación por sales biliares y, por tanto, menos accesibles a la acción lipolítica de la pancreatina (Andersson et al., 2000; Guerra et al., 2012).

Según el análisis estadístico, el aumento de la dosis de Kreon® tiene influencia significativa en todos los productos a excepción del paté, si bien en el caso de la hamburguesa y el chopped concentraciones Kreon® por encima de 0,48 mg/ mL no implica mayor grado de lipólisis. El paté fue además el producto que menor extensión de la lipólisis experimentó, sin diferencias significativas entre las concentraciones de Kreon® empleadas. Esto podría estar relacionado con la mayor cantidad de grasa del paté y el menor tamaño de sus glóbulos grasos ya que, si bien la actividad lipolítica inicial en este producto puede verse favorecida por estas condiciones, la acumulación de productos de la lipólisis (MG, DG y AG) en la interfase podría inhibir rápidamente la reacción enzimática (Golding & Wooster, 2010; Nieva-Echevarría et al., 2016; Wilde & Chu, 2011).

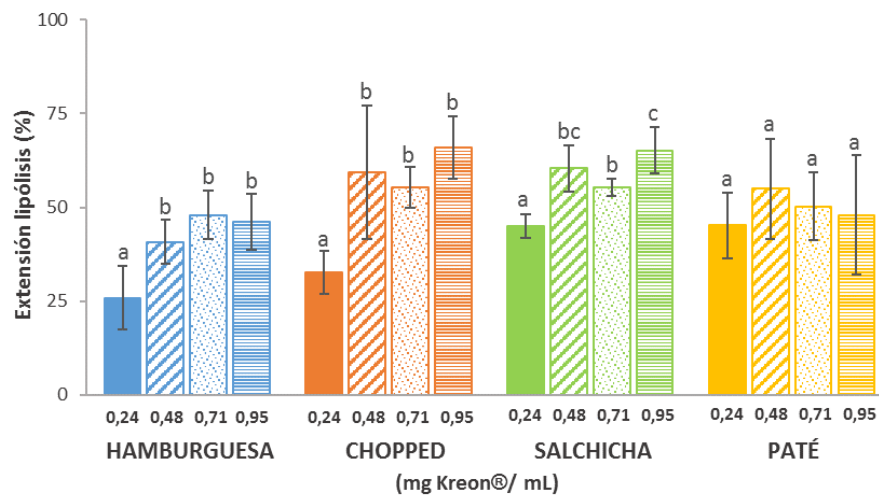


FIGURA 3.6. Influencia de la concentración de Kreon® (mg/ mL) en la extensión de la lipólisis (%) después de la etapa intestinal. Las dosis de Kreon® se muestran bajo las barras (Tabla 2.4). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre grupos homogéneos, de cada alimento por separado, con un nivel de significación del 95 % ($p < 0,05$). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar ($n=3$).

En la **Figura 3.7**, se muestran los resultados de extensión de la lipólisis obtenidos en distintas condiciones de pH intestinal (6 y 7) y distintas concentraciones biliares (1 y 10 mM) manteniendo fija la concentración de Kreon® (0,48 mg/ mL). El incremento de la lipólisis como consecuencia del incremento de pH resulta lógico dado que el pH óptimo de la lipasa pancreática se encuentra entorno a pH 8; así mismo, un incremento de la concentración biliar mejora la emulsificación de las grasas incrementando el área superficial para la actividad lipasa (Minekus et al., 2014; Wilde & Chu, 2011). En este sentido, los resultados de la ANOVA (Tabla 3.4) indican que tanto el pH como la concentración biliar únicamente influyen en el grado de lipólisis de la hamburguesa y el chopped, alcanzándose el máximo de lipólisis en las condiciones fisiológicas standard (pH 7 y [bilis] 10 mM). Sin embargo, los

resultados del ANOVA no permiten afirmar lo mismo para la lipólisis de la salchicha y el paté. La magnitud de las desviaciones standard obtenidas especialmente en los ensayos con estos productos, reflejan claramente la variabilidad del fenómeno de lipólisis en estas matrices como consecuencia, probablemente, de los mecanismos de inhibición comentados anteriormente, por lo que deberán establecerse metodologías experimentales adecuadas que permitan una mejor simulación de la digestión intestinal de las grasas alimentarias.

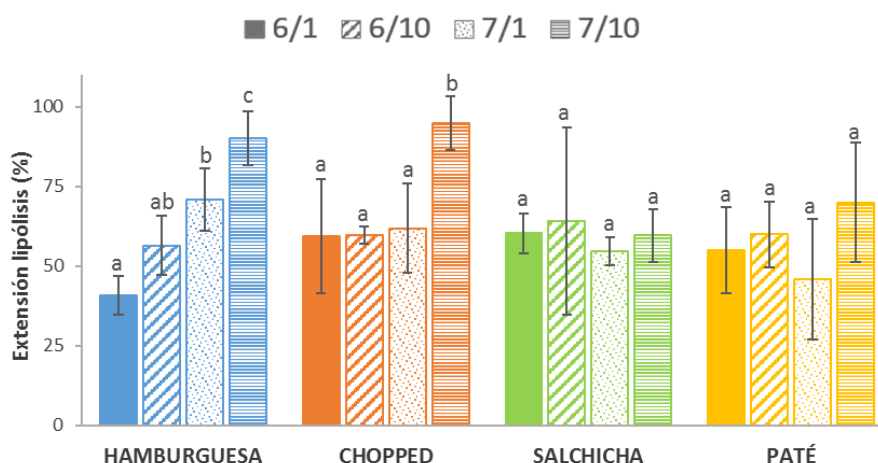


FIGURA 3.7. Influencia del pH y la concentración biliar (mM) en la extensión de la lipólisis (%). La dosis de Kreon® se mantuvo constante en todas las condiciones duodenales (0,48 mg/ mL). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre grupos homogéneos, de cada alimento por separado, con un nivel de significación del 95 % ($p < 0,05$). Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar ($n=3$). Código de la leyenda: pH/[bilis].

TABLA 3.4. Resumen del ANOVA multifactorial ($p < 0,05$) en función del tipo de muestra, pH y concentración biliar (mM) para la variable dependiente extensión de la lipólisis (%). La concentración de Kreon® se mantuvo constante (0,48 mg/ mL).

PRODUCTOS	EFFECTOS PRINCIPALES	Grados de libertad	Razón-F	Valor-P
Hamburguesa	A: pH	1	42,18	0,0002*
	B: [Bilis] (mM)	1	12,67	0,0074*
	INTERACCIONES			
	AB	1	0,14	0,7202
Chopped	A: pH	1	7,19	0,0278*
	B: [Bilis] (mM)	1	5,62	0,0452*
	INTERACCIONES			
	AB	1	5,43	0,0482*
Salchicha	A: pH	1	0,26	0,6285
	B: [Bilis] (mM)	1	0,19	0,6772
	INTERACCIONES			
	AB	1	0	0,9542
Paté	A: pH	1	0,00	0,9464
	B: [Bilis] (mM)	1	3,37	0,6038
	INTERACCIONES			
	AB	1	1,47	0,3741

En la **Figura 3.8**, se muestran micrografías de los digeridos de los distintos productos utilizando distintas dosis de Kreon®. En todas las matrices se aprecia la presencia de glóbulos grasos sin digerir cuando se emplearon concentraciones de 0 y 0,24 mg Kreon®/ mL, en cambio, cuando se usaron concentraciones superiores a los 0,48 mg/ mL la ausencia de glóbulos grasos en las micrografías sugiere que la totalidad de la grasa se encontraría digerida.

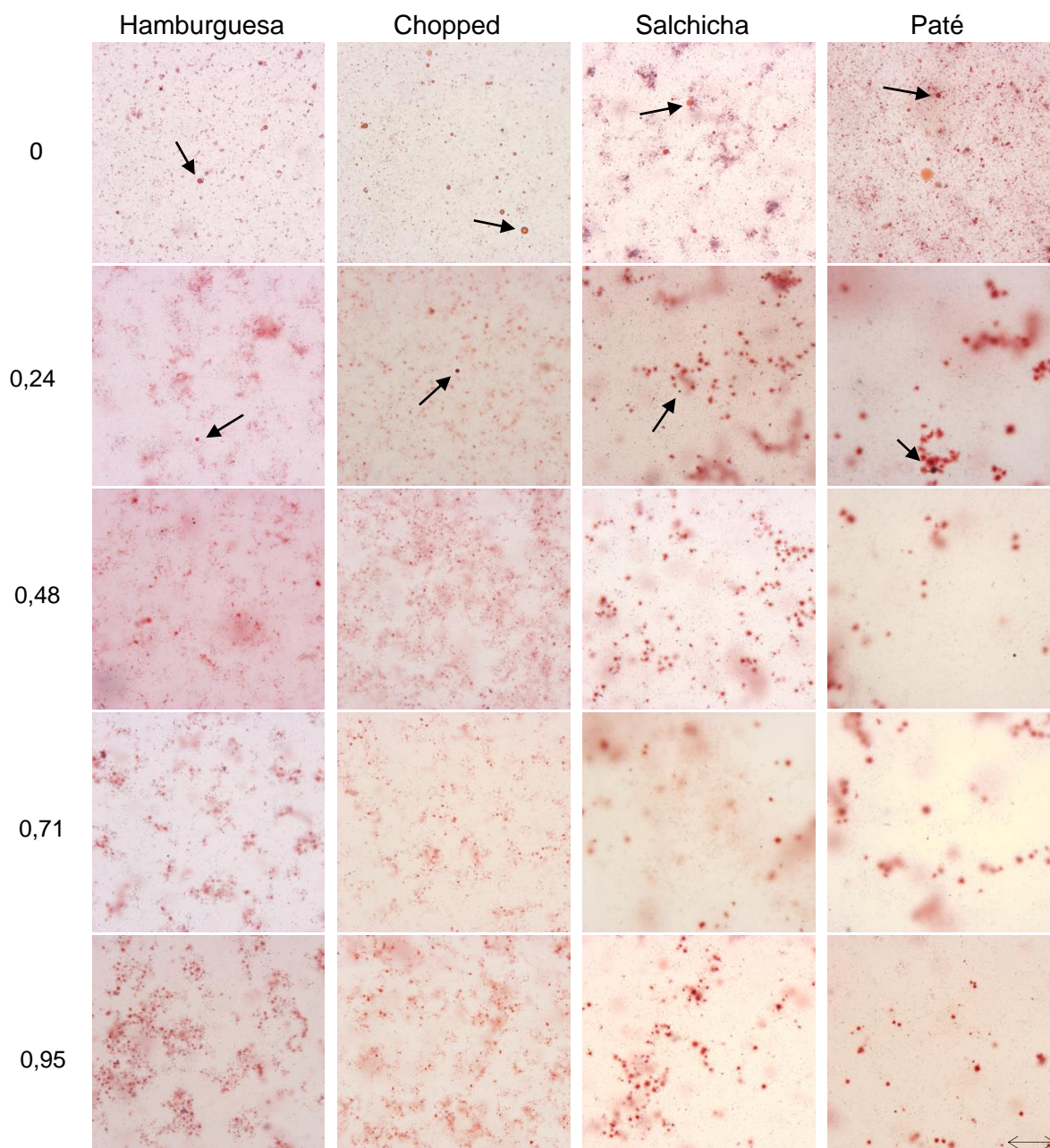


FIGURA 3.8. Influencia de la concentración de Kreon® en las microestructuras de las emulsiones observadas a 20x en cada una de las matrices para unas condiciones duodenales constantes (pH 6 y concentración biliar 1 mM). Leyenda margen izquierdo: dosis de Kreon® (mg/ mL). La distancia entre la barra horizontal es de 50 µm.

4. CONCLUSIONES

En el presente estudio se empleó un modelo de digestión *in vitro* gastrointestinal con la finalidad de evaluar tanto la eficacia de distintas dosis del suplemento enzimático Kreon®, como la influencia de distintas condiciones fisiológicas, durante la etapa duodenal (pH 6/7; [bilis] 1/10 mM), sobre la extensión de la lipólisis y la solubilidad proteica en muestras de diferentes productos cárnicos (hamburguesa, chopped, salchicha, paté).

Los resultados obtenidos mostraron que el procesado previo de los productos y, en consecuencia, su estructura matricial, influyeron en el índice de degradación de la matriz, que puede considerarse como un indicador de digestibilidad.

Respecto a la solubilidad proteica, se observó un aumento conforme aumentó la dosis de Kreon®, aunque no resultó significativo para el caso del chopped, y fue más acusado en la hamburguesa que en la salchicha y el paté. El pH afectó significativamente en todas las matrices excepto en el paté, mientras que, la concentración biliar influyó en todos menos en el chopped. En general, para todos los productos la combinación pH 7/ [bilis] 10 mM (condiciones fisiológicas de un adulto sano) resultó en mayores valores de solubilidad proteica.

En cuanto a la extensión de la lipólisis, se observaron diferencias significativas entre las distintas dosis de Kreon® en todos los productos excepto el paté, si bien en el caso de la hamburguesa y el chopped concentraciones Kreon® por encima de 0,48 mg/ mL no implicaron un mayor grado de lipólisis. El pH y la concentración biliar únicamente influyeron en el grado de lipólisis de la hamburguesa y el chopped, alcanzándose el máximo de lipólisis a pH 7/ [bilis] 10 mM.

Por último, las observaciones extraídas del presente estudio permiten constatar que, en función del alimento ingerido, factores como su procesado previo y su estructura matricial, así como la concentración de suplemento enzimático, el pH gastrointestinal y la concentración biliar, influyen de forma significativamente diferente en la digestibilidad de sus macronutrientes. Por tanto, se resalta la importancia de la realización de estudios similares sobre distintos alimentos, con la finalidad de adecuar lo máximo posible la dosis de suplemento enzimático en función de la ingesta del paciente.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Andersson, A., Andersson, K., & Tornberg, E. (2000). A comparison of fat-holding between beefburgers and emulsion sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5), 555-560.
- AOAC International. (2000). *Official methods of analysis of AOAC international* (17th ed.). Gaithersburg Maryland: AOAC International.
- Aseeri, A., Brodli, 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.
- Bax, M. L., Aubry, L., Ferreira, C., Daudin, J. D., Gatellier, P., Rémond, D., & Santé-Lhoutellier, V. (2012). Cooking temperature is a key determinant of in vitro meat protein digestion rate: Investigation of underlying mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2569-2576.
- Estévez, M., & Cava, R. (2004). Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pâté. *Meat Science*, 68(4), 551-558.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2007). Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic contents. *Food Chemistry*, 100(1), 55-63.

- 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.
- Golding, M., & Wooster, T. J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(1-2), 90-101.
- Griffiths, M. (2014). *Lo esencial en aparato digestivo*. (Elsevier, Ed.) (4th ed.). Madrid.
- 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.
- Lamothe, S., Corbeil, M.-M., Turgeon, S. L., & Britten, M. (2012). Influence of cheese matrix on lipid digestion in a simulated gastro-intestinal environment. *Food & Function*, 3(7), 724.
- Lamothe, S., Azimy, N., Bazinet, L., Couillard, C., & Britten, M. (2014). Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food & Function*, 5(10), 2621-2631.
- MAGRAMA, 2016. Informe del consumo de alimentación en España 2015. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Dirección URL: <<http://www.magrama.gob.es>>. [Consulta: 02 Sep. 2016].
- Minekus, M., Alming, 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., & Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6): 1113-1124.
- Nieva-Echevarría, B., Goicoechea, E., Manzanos, M. J., & Guillén, M. D. (2016). A study by ¹H NMR on the influence of some factors affecting lipid in vitro digestion. *Food Chemistry*, 211, 17-26.
- Santé-Lhoutellier, V., Astruc, T., Marinova, P., Greve, E., & Gatellier, P. (2008). Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1488-1494.
- Sikkens, E. C. M., Cahen, D. L., Kuipers, E. J., & Bruno, M. J. (2010). Pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 24(3), 337-347.
- Steen, L., Fraeye, I., Goemaere, O., Sifre, L., Goderis, B., Paelinck, H., & Foubert, I. (2014). Effect of Salt and Liver/Fat Ratio on Microstructure, Emulsion Stability, Texture and Sensory Mouth Feel of Liver Paste. *Food and Bioprocess Technology*, 7(10), 2855-2864.
- Sun, W., Cui, C., Zhao, M., Zhao, Q., & Yang, B. (2011). Effects of composition and oxidation of proteins on their solubility, aggregation and proteolytic susceptibility during processing of Cantonese sausage. *Food Chemistry*, 124(1), 336-341.
- Turck, D., Braegger, C.P., Colombo, C., Declercq, D., Morton, A., Pancheva, R., Robberecht, E., Stern, M., Strandvik, B., Wolfe, S., Schneider, S. M., & Wilschanski, M. (2016). ESPEN-ESPGHAN-ECFS guidelines on nutrition care for infants, children, and adults with cystic fibrosis. *Clinical Nutrition* 3, 557-577.
- Wen, S., Zhou, G., Song, S., Xu, X., Voglmeir, J., Liu, L., Zhao, F., Li, M., Li, L., Yu, X., Bai, Y., & Li, C. (2015). Discrimination of in vitro and in vivo digestion products of meat proteins from pork, beef, chicken, and fish. *Proteomics*, 15(21), 3688-3698.
- Wilde, P. J., & Chu, B. S. (2011). Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 14-22.