



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DIGESTIBILIDAD DE GRASAS Y GLÚCIDOS EN PRODUCTOS DE BOLLERÍA: INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES INTESTINALES

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

ALUMNO/A: **Inmaculada de Dios Pérez**

TUTOR/A ACADÉMICO: **Ana María Andrés Grau**

COTUTOR/A: **Ana Belén Heredia Gutiérrez**

DIRECTOR/A EXPERIMENTAL: **Irene Peinado Pardo**

Curso Académico: 2016/2017

VALENCIA, 5 de JULIO del 2017

DIGESTIBILIDAD DE GRASAS Y GLÚCIDOS EN PRODUCTOS DE BOLLERÍA: INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES INTESTINALES

De Dios Pérez, I.¹, Peinado, I.¹, Heredia, A.¹ y Andrés, A.¹

RESUMEN

La insuficiencia pancreática exocrina (IPE) es una afección grave asociada a diversas enfermedades caracterizadas por la incapacidad del páncreas para secretar la cantidad suficiente de enzimas, ocasionando una maldigestión y malabsorción de nutrientes, especialmente de los lípidos. El tratamiento consiste en una terapia de suplementación enzimática (TSE), administrando al paciente pancreatina encapsulada (Kreon®). En la actualidad, su dosificación se establece en función de la edad y el peso de cada individuo, además de su ingesta diaria de grasa. Sin embargo, no se tienen en cuenta factores intrínsecos al alimento (origen y tipo de grasa, estructura matricial, etc.) y extrínsecos (pH intestinal y concentración biliar del individuo, etc.) que pueden afectar a la eficiencia del suplemento y por tanto a la digestibilidad de las grasas. En el presente estudio se ha empleado un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* para analizar la eficacia de distintas dosis del suplemento enzimático Kreon® (0-4000 UL/ g grasa), así como la influencia de las condiciones fisiológicas de la etapa intestinal (pH 6 y 7; concentración biliar 1 y 10 mM), en la digestión de lípidos y glúcidos de diferentes productos de bollería industrial (donut, gofre, croissant y magdalena), acompañados o no de leche. Los resultados muestran que el aumento de la dosis de Kreon® aumentó la digestibilidad de las grasas hasta alcanzar un valor máximo a partir del cual un aumento de la dosis no se tradujo en una mayor lipólisis. En cuanto al efecto del pH y la concentración biliar, una mayor concentración de sales biliares favoreció una mayor digestibilidad de las grasas a pH 6 excepto en la magdalena, para la que ninguno de los dos parámetros presentó un efecto significativo. La glucólisis aumentó en presencia de Kreon® no siendo significativa la dosis de enzima (1000-4000), mientras que el pH y la concentración biliar contribuyeron a la glucólisis dependiendo del tipo de producto. En cuanto a la coingesta de magdalena o croissant con leche,

PALABRAS CLAVE: digestión *in vitro*, insuficiencia pancreática, lipólisis, glucólisis, productos de bollería

ABSTRACT

Exocrine pancreatic insufficiency (IPE) is a serious disease associated with different illnesses characterized by the pancreas's inability to secrete enough enzymes, causing maldigestión and malabsorption of nutrients, especially lipids. The treatment is an enzymatic supplementation therapy (TSE), administering pancreatin in the form of capsules (Kreon®) to the patient. At present, dosage is established based on age and weigh of each person, too their daily fat intake.

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



However, food's intrinsic factors (fat's origin and type, matrix structure, etc.) and extrinsic factors (type of processing, intestinal pH and biliary concentration, etc.) that can affect the supplement's efficiency and therefore, fats digestibility. In this study, an in vitro gastrointestinal digestion model was used to analyze the efficacy of different doses of the enzyme supplement (Kreon®) (0-4000UL/g fat), as well as, the influence of different physiological conditions during the intestinal stage (pH 6 or 7, bile concentration 1 or 10 mM) in the digestion of lipids and sugars of different industrial bakery products (donut, waffle, croissant and muffin). Results show that increasing the dose of Kreon® increased the digestibility of the fats until a maximum value from which an increase of the dose did not translate into a greater lipolysis. As for the effect of pH and biliary concentration, a higher concentration of bile salts favored a higher digestibility of fats at pH 6 except in the muffin, for which neither of the two parameters had a significant effect. Glycolysis increased in the presence of Kreon® regardless the dose (1000-4000), whereas pH and biliary concentration contributed to glycolysis depending on the type of product.

KEY WORDS: in vitro digestion, pancreatic insufficiency, lipolysis, glycolysis, bakery products.

RESUM

La insuficiència pancreàtica exocrina (IPE) és una afecció greu associada a diverses malalties caracteritzades per la incapacitat del pàncrees per secretar la quantitat suficient d'enzims, ocasionant una maldigestió i malabsorció de nutrients, especialment de lípids. El tractament consisteix en una teràpia de suplementació enzimàtica (TSE), administrant al pacient pancreatina en forma de càpsules (Kreon®). En l'actualitat, la seva dosificació s'estableix en funció de l'edat i el pes de cada individu, a més de la seva ingesta diària de greix. No obstant això, no es tenen en compte factors intrínsecs a l'aliment (origen i tipus de greix, estructura matricial, etc.) i extrínsecs (pH intestinal i concentració biliar de l'individu, etc.) que poden afectar la digestibilitat dels greixos. En el present estudi s'ha emprat un model de digestió gastrointestinal in vitro per analitzar l'eficàcia de diverses dosis del suplement enzimàtic Kreon® (0-4000 UL / g greix), així com, la influència de diverses condicions fisiològiques durant l'etapa intestinal (pH 6 o 7; concentració biliar a 1 o 10 mm), en la digestió de lípids i glucids de diferents productes de pastisseria industrial (donut, gofre, croissant i magdalena). Els resultats mostren que l'augment de la dosi de Kreon® augmentà la digestibilitat dels greixos fins a assolir un valor màxim a partir del qual un augment de la dosi no es va traduir en una major lipòlisi. Quant a l'efecte del pH i la concentració biliar, una major concentració de sals biliars va afavorir una major digestibilitat dels greixos a pH 6 excepte en la magdalena, per a la qual cap dels dos paràmetres va presentar un efecte significatiu. La glucòlisi va augmentar en presència de Kreon® no sent significativa la dosi (1000-4000), mentre que el pH i la concentració biliar van contribuir a la glucòlisi depenent del tipus de producte.

PARAULES CLAU: digestió in vitro, insuficiència pancreàtica, lipòlisi, glicòlisi, productes de bolleria.



1. INTRODUCCIÓN

Se entiende por productos de bollería aquellos productos alimenticios elaborados básicamente a base de masa de harinas fermentadas y que han sido sometidos a un tratamiento térmico adecuado, siendo éste frecuentemente un horneado o una fritura. Magdalenas, donuts, croissant, gofre, bizcochos, brioche, ensaimadas, hojaldres, buñuelos o churros son algunos de los productos clasificados como tales. La bollería industrializada incorpora en la formulación de estos productos hidratos de carbono complejos y simples (harinas y azúcares), grasa, levadura, sal, leche y huevo, así como un variado número de aditivos alimentarios con función emulgente, estabilizante, colorante o aromática. El elevado aporte calórico, el tipo y cantidad de grasa y azúcares utilizados en su formulación, han favorecido el que su consumo no esté bien considerado por las consecuencias que éste conlleva para la salud humana, y en especial sobre la de la población infantil. A pesar de su “mala reputación”, la tendencia de consumo de bollería, pastelería, galleta y cereales en España, fue en aumento hasta el 2011, cuando alcanzó un máximo, para luego reducirse ligeramente hasta estabilizarse situándose en 14 kg/persona/año (MAPAMA, 2017). El mayor consumo de bollería corresponde al desayuno, si bien entre la población infantil también se extiende a la merienda. Actualmente existe una tendencia creciente hacia la reducción del contenido en grasa y azúcares de alto índice glicémico en alimentos procesados (Camarero-Gómez, 2015), y/o sustitución de estos, por otros ingredientes más saludables. No obstante, eliminar por completo las grasas de la dieta no resulta adecuado ni saludable puesto que son esenciales para el organismo. De hecho, en la mayoría de dietas personalizadas orientadas a perder peso, se sugiere ingerir, al menos, la mínima cantidad requerida (Latham, 2002). La grasa dietética contribuye al metabolismo energético, suministra los ácidos grasos esenciales al organismo y favorece la biodisponibilidad de micronutrientes liposolubles como ciertas vitaminas, entre otras funciones (Lamothe et al., 2012).

Por otro lado, la recomendación de reducir la ingesta de grasa no es extensiva a todos los escenarios nutricionales. Este es el caso por ejemplo de aquellos pacientes de Fibrosis Quística, que presentan insuficiencia pancreática exocrina (IPE), a los que se les recomienda una ingesta elevada de lípidos a través de la dieta. La IPE es una afección grave asociada a diversas enfermedades como pancreatitis crónica, la fibrosis quística o el cáncer de páncreas, también puede deberse a una intervención quirúrgica (resección pancreática) o el envejecimiento. Esta alteración digestiva se caracteriza por la incapacidad del páncreas para secretar la cantidad suficiente de enzimas digestivas al duodeno, y puede ir acompañada de unas condiciones duodenales subóptimas con valores de pH intestinal y concentración biliar menores a los de un individuo sano (bilis 10 mM, pH 7) (Gelfond, et al., 2012, Sikkens et al., 2010). La repercusión principal es una maldigestión y malabsorción de nutrientes, y principalmente de los lípidos por ser mayoritariamente digeridos en este tramo digestivo. Los pacientes que cursan IPE suelen presentar además un déficit de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y ácidos grasos esenciales (Sikkens et al., 2010; Turcket al., 2016).



La IPE se trata clínicamente mediante terapia de suplementación enzimática (TSE), administrando al paciente pancreatina porcina gastrorresistente mediante encapsulación (Kreon®). En la actualidad, su dosificación se establece en función de la edad y el peso de cada individuo, además de en base a la ingesta diaria de grasa (Turck et al., 2016). Sin embargo, a la hora dosificar el suplemento no se tienen en cuenta las características físico-químicas de las grasas y del alimento (origen y tipo de grasa, estructura matricial o interacción con otros macronutrientes entre otros), ni las condiciones duodenales (pH, concentración biliar, tiempo de tránsito duodenal, etc.) bajo las que han de trabajar las enzimas pancreáticas y que pueden afectar su digestibilidad. De hecho, se ha demostrado que, a pesar de que dos alimentos tengan la misma cantidad de grasa no siempre alcanzan el mismo grado de lipólisis (Butterworth, Warren & Ellis, 2011).

En este contexto, el objetivo principal de este estudio fue evaluar la influencia de la dosis de suplemento enzimático (Kreon®) sobre la hidrólisis de lípidos y glúcidos en diferentes productos de bollería industrial (donut, gofre, croissant y magdalena), mediante un modelo *in vitro* de digestión gastrointestinal. Concretamente, se simularon las condiciones duodenales más desfavorables (pH 6, concentración biliar 1 mM) y se moduló la dosificación del suplemento (0, 1000, 2000, 3000 y 4000 Unidades Lipasa (UL)/ g grasa del alimento). Así mismo, se analizó la influencia de las condiciones de la etapa intestinal, pH (6 y 7) y concentración biliar (1 y 10 Mm), sobre la actividad del Kreon® a una dosis fija de 2000 UL/g grasa. Además de la extensión de la lipólisis y glucólisis en todas las condiciones ensayadas, también se determinó el índice de degradación de la matriz antes y después de la etapa intestinal. Por último y con el fin de evaluar las posibles interacciones entre alimentos, y su repercusión sobre la digestibilidad de los nutrientes evaluados, se digirieron conjuntamente magdalenas y croissants con leche.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Matrices alimentarias en estudio y reactivos utilizados

Los productos de bollería, así como la leche entera utilizados fueron adquiridos en supermercados locales de Valencia, y están descritos en la Tabla 2.1, junto con sus ingredientes. Además, en la Tabla 2.2, se encuentra la información nutricional por 100 g de cada producto, indicado en el etiquetado.

Para la simulación *in vitro* del proceso digestivo, se utilizaron fluidos gastrointestinales simulados. Para el gástrico se utilizó pepsina procedente de mucosa gástrica porcina (P6887, Sigma-Aldrich), y para el intestinal, bilis bovina (B3883, Sigma-Aldrich) y pancreatina porcina comercial (Kreon® Abbott). El Kreon® contiene 150 mg de pancreatina porcina en forma de microesferas gastrorresistentes, equivalentes a: 10000 unidades (U.) lipasa, 8000 U. amilasa y 600 U. proteasa. Además, se emplearon los siguientes reactivos: NaOH 1N y HCl 1N, ambos de AppliChem Panreac, KCl, KH₂PO₄,

NaHCO₃, NaCl, MgCl₂(H₂O)₆, (NH₄)₂CO₃ y CaCl₂ (0,3 M), todos ellos se Sigma-Aldrich, y etanol al 96 % de Labkem.

TABLA 2.1. Ingredientes de los distintos productos de bollería según el etiquetado

Alimento	Tipo grasa	Harina	Azúcar	Aditivos*	Otros
Leche entera (Pascual)	Animal				
Donut (Carrefour)	Vegetal (palma, coco y girasol)	Trigo y gluten de trigo	Azúcar, dextrosa y jarabe de glucosa y fructosa	E-202 E-270 E-282 E-300 E-322 E-330 E-412 E-420 E-422 E-466 E-471 E-481 E-472d	Con huevo Celulosa
Gofre (Global Food)	Vegetal (palma, soja y girasol)	Trigo	Azúcar	E-200 E-322	Con huevo, levadura y leche desnatada en polvo Aroma de vainilla
Croissant (hacendado)	Vegetal (palma, soja, girasol, refinado de girasol)	Trigo, gluten y fibra de trigo	Azúcar y Azúcar Invertido	E-200 E-202 E-282 E-304 E-307 E-322 E-330 E-415 E-420 E-466 E-471 E-481 E-472c E-472e	Con huevo y levadura Aromas, enzimas (α-amilasas, xilanasas), colorante (betacaroteno), proteínas leche
Magdalena (hacendado)	Vegetal	Trigo	Azúcar	E-200 E-330 E-415 E-420i E-450i E-471 E-470a E-477 E-500ii E-1520	Con huevo Colorante (betacaroteno), aromas

*Aditivos: E-1xx = colorantes, E-2xx = conservantes, E-3xx = antioxidantes y reguladores de la acidez, E-4xx = estabilizantes, E-5xx = reguladores del pH y agente antigrumos, E-6xx = potenciadores del sabor, E-9xx = varios, E-1xxx = otros productos químicos
La denominación de estos aditivos se puede encontrar en la siguiente web:
<https://goo.gl/TmUS75>

TABLA 2.2. Información nutricional en base al etiquetado, de los distintos productos utilizados (información por 100g de producto).

	Donut	Gofre	Croissant	Magdalena	Leche
Valor energético (kcal)	419,0	429,0	169,0	428,0	64,0
Grasas	22,0	23,1	31,0	24,0	3,6
.....Grasas saturadas	11,0	8,5	13,0	3,0	2,5
Hidratos de carbono	48,0	49,0	39,0	48,0	4,8
.....Azúcares	24,0	20,0	8,6	32,0	4,8
Proteínas	5,5	5,6	8,2	4,6	3,0
Sal	0,7	0,8	0,9	0,6	0,1
Fibra alimentaria	3,9	1,3	2,7	0,5	0

En el caso de las determinaciones analíticas, se utilizó un kit enzimático de Roche y reactivos obtenidos de Sigma-Aldrich: Tritón X-100, éter de petróleo (60:40), ácido tricloroacético (TCA), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), invertasa de levadura de cerveza (Grado VII > 300 U/ mg ss) y amiloglucosidasa (Megazyme).

2.2. Simulación in vitro del proceso digestivo

La simulación del proceso digestivo se realizó en base al protocolo consensuado a nivel europeo por la red ACTIONCOST Infogest (Dupont et al. 2011), publicado por Minekus et al. (2014) y que comprende tres etapas: oral, gástrica e intestinal. Sin embargo, en el presente trabajo, se realizaron algunas modificaciones en las condiciones de la etapa duodenal con el objetivo de analizar la influencia del pH, concentración de pancreatina (dosis de Kreon®) y de sales biliares sobre la extensión de la lipólisis y glucólisis de los diferentes tipos de productos de bollería con y sin coingesta de leche, así como sobre el índice de degradación de la matriz (IDM).

Para realizarla simulación, se prepararon los fluidos simulados (Tabla 2.4), gástrico (SGF) e intestinal (SIF) a partir de las disoluciones stocks (Tabla 2.3) y se procedió a la misma, tal y como se describe a continuación.

TABLA 2.3. Composición recomendada para un litro de las disoluciones Stock

Constituyente (mL)	SSS	SGS	SIS
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 2.4. 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 o 4398,3
Volumen final (mL)	500	500

SGF: Fluido Gástrico Simulado; SIF: Fluido Intestinal Simulado
 *El pH se ajustó a 3, 6 o 7 dependiendo de la etapa (gástrica o intestinal) y la condición con HCl (1N) y NaOH (1N) y se enrasó con agua a 500mL.
 **La cantidad de bilis es para 1 o 10 mM.

La Tabla 2.5 recoge las condiciones ensayadas, un total de 8, en sus diferentes combinaciones de: pH intestinal (6 o 7), concentración biliar (1 o 10 mM) y de suplemento enzimático de pancreatina Kreon® (0 –4000 Unidades Lipasa/ g grasa). Por un lado, se analizó la influencia del pH y concentración biliar sobre la eficacia del suplemento enzimático, modulando estas dos condiciones y fijando la suplementación en 2000 UL/g grasa. De esta forma, se ensayaron las combinaciones pH/concentración biliar (mM) de 6/1, 6/10, 7/1 y 7/10, considerándose esta última condición la de un adulto estándar (Minekus et al., 2014) y la condición pH 6 / 1 mM, siendo esta la más desfavorable en individuos con IPE que presentan a su vez insuficiencia biliar (Sikkens et al., 2010). Por otro lado, se evaluó el efecto de la dosificación del Kreon® en las

condiciones más desfavorables para la digestión intestinal, manteniendo constantes las condiciones de pH intestinal en 6 y de concentración biliar en 1mM, y variando la dosificación del suplemento entre 0-4000 UL/g grasa.

TABLA 2.5. *Combinaciones experimentales ensayadas modulando las condiciones de pH, concentración de Kreon® (Unidades lipasa/g grasa) y biliar (mM) de la etapa intestinal, y nomenclatura asignada a cada experimento.*

Nomenclatura	Kreon® (mg/mL)	UL (UL/g grasa)	uni (UL/mL)	pH	Molaridad biliar (mM)
0	0	0	0	6	1
1000	0,24	1000	9,32	6	1
2000	0,48	2000	18,64	6	1
3000	0,71	3000	27,97	6	1
4000	0,95	4000	37,29	6	1
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

Etapa oral: Las muestras (3 – 5 g) se introdujeron en tubos falcón de 50 mL a los que se añadió 5 mL de SSS, previamente atemperado a 37 °C. Seguidamente se homogeneizó la muestra durante 2 minutos para simular la masticación oral.

Etapa gástrica: A continuación, se añadió SGF en una proporción (1:1 v/w). Dicho fluido contiene la concentración de electrolitos que se dan a nivel gástrico, y una concentración de pepsina equivalente a 2000 U/mL en el quimo gástrico. Se añadió también, la cantidad de Kreon® correspondientes a las 5 dosis comentadas anteriormente (de 0 a 4000 UL/g grasa). Seguidamente, se ajustó el pH a 3 utilizando ácido clorhídrico (HCl 1N) con ayuda del pH – metro (SevenCompact™ S210, Mettler Toledo). Acto seguido, las muestras se introdujeron en una cámara termostática 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.

Etapa intestinal: Una vez finalizada la etapa gástrica, se añadió SIF a las muestras, en una proporción 1:1 (v/w). Dicho fluido contiene la concentración de electrolitos que se dan a nivel duodenal, así como una concentración de sales biliares equivalente a 1 o 10 mM en la mezcla intestinal (según el diseño experimental). A continuación, se ajustó el pH (6 o 7, en función del diseño). La simulación se llevó a cabo de la misma forma que la etapa gástrica, las muestras se volvieron a introducir en la cámara termostática a 37 °C, manteniéndose en agitación circular (arriba-abajo) a 55 rpm durante 2 horas más. Durante la etapa intestinal, se monitorizó el pH y se reajustó cuando fue necesario ya que un pH por debajo de 5,7 el Kreon® no presenta actividad enzimática (Calvo-Lerma, 2014).

Tras finalizar el tiempo de digestión, las muestras se enfriaron, incubándolas en hielo durante 10 minutos, posteriormente el pH se ajustó entre 9 – 9,5 para asegurar la inactivación enzimática. Los productos de bollería y la leche entera



se digirieron de forma individual o conjunta (magdalena o croissant con leche) por triplicado y en todas las condiciones descritas en la Tabla 2.4.

2.3. Determinaciones analíticas

A. ANÁLISIS DE HUMEDAD, GRASA Y PROTEÍNA

Las determinaciones del contenido en humedad, grasa y proteína se llevaron a cabo 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 a vacío hasta peso constante. Para la determinación del contenido en grasa se sometió a las muestras previamente liofilizadas (2 g, $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, $1 \cdot 10^{-2}$ bar, modelo Telstar Lyoalfa-6) a una extracción con éter de petróleo (40:60) mediante un equipo Soxhlet. Finalmente, la cantidad de proteína total se determinó a partir del contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl (Lamothe et al., 2012).

B. ÍNDICE DE DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ

La degradación de la matriz se calculó como la proporción de sólidos dispersos durante la digestión de las muestras según el método propuesto por Lamothe et al., (2012). Una vez finalizado el proceso de digestión, las muestras se centrifugaron a $1200 \times g$ $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos (centrifuga 5804 eppendorf), y después se filtraron mediante un tamiz (1mm de diámetro) para separar la fase micelar (FM), en la que se encuentran los ácidos grasos libres, de la fase sólida (FS). Las FS se utilizaron para estimar la degradación de la matriz. Para ello 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:

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

Siendo CS_0 el contenido inicial de sólidos de la muestra antes del proceso de digestión y CS_t el contenido total de sólidos de la fase sólida tras el proceso de digestión.

C. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES: EXTENSIÓN DE LA LIPÓLISIS

Para la determinación de ácidos grasos libres se diluyó la FM de las muestras digeridas (100 μl), en una disolución acuosa (5,6 % Tritón X – 100 y 6 % etanol), necesaria para solubilizarlos y asegurar la inhibición de la actividad lipasa (Lamothe et al., 2012). Posteriormente, se empleó un kit enzimático (Roche Diagnostics) y se midió la absorbancia a 546 nm mediante espectrofotometría. Los valores de absorbancia obtenidos se compararon con



los valores obtenidos con 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 una media de dos ácidos grasos y un monoglicérido.

D. ANÁLISIS DE GLÚCIDOS: EXTENSIÓN DE LA GLUCÓLISIS

Los azúcares liberados durante el proceso de digestión se midieron como monosacáridos, mediante el método del ácido dinitrosalicílico (DNS), tras una hidrólisis enzimática en presencia de amiloglucosidasa e invertasa (Mishra, Monro & Hedderley, 2008). Para ello, se tomaron alícuotas (250 μ l) recogidas durante la etapa intestinal (20 y 120 minutos), se les añadió 1 mL de etanol (96 %) y se agitaron con el fin de solubilizar los azúcares. Tras 30 minutos en reposo, los tubos se centrifugaron (1000 x g, 10 min, 20 °C). Para el análisis de azúcares, alícuotas (50 μ l) del extracto etanólico o de una disolución de glucosa (1 mg/ mL, glucosa estándar), se añadieron a 0,25 mL de una disolución de amiloglucosidasa (1%) e invertasa (1%) en tampón acetato (pH 5,2) y se incubaron a 37 °C durante 10 minutos para completar la despolimerización a monosacáridos. Los azúcares reductores se determinaron añadiendo 0,75 mL de la mezcla de DNS (1 disolución de glucosa (0,5 mg/mL): 1 NaOH (4M):5 DNS), y calentándola durante 15 minutos a 95 °C. Finalmente, se añadió a cada tubo 4 mL de agua y se midió la absorbancia a 530 nm.

Los azúcares de liberación rápida (RDS) se determinaron como azúcares reductores liberados durante los 20 minutos iniciales de la etapa intestinal. Los azúcares de liberación lenta (SDS), se determinaron como los azúcares liberados al final de la digestión (RDS + SDS) menos RDS. Los azúcares no digeridos (RS) se calcularon como la diferencia entre los hidratos de carbono iniciales y los totales digeridos. Los hidratos de carbono iniciales, se determinaron como el azúcar total en la muestra inicial; para ello la muestra liofilizada (100 mg) se gelatinizó en sulfóxido de dimetilo (2 mL, 100°C, 10 min) y se digirió durante 30 min a 37°C después de añadir 8 mL de tampón de acetato pH 5,2 que contenía 0,1 mL de amiloglucosidasa.

E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como ya se ha indicado, las digestiones *in vitro* de todos los alimentos se realizaron por triplicado, así como las determinaciones analíticas, y se analizaron los resultados obtenidos mediante análisis simple y multifactorial (ANOVA) con el programa Statgraphics Centurion XVI con un nivel de confianza del 95%, considerando las diferencias estadísticamente significativas cuando $p_{valor} \leq 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de las matrices alimento antes de la digestión

La Tabla 3.1 recoge los resultados del análisis de proteínas, glúcidos, grasas y humedad de todos los productos con los que se ha trabajado en este estudio: donuts, croissant, gofre, magdalena y leche, siendo la leche el único alimento líquido. Dentro de los productos de bollería se observa que el croissant es el producto con mayor contenido en grasa (28,5 %) y proteína (8,2 %), mientras que el donut presenta el menor contenido graso, siendo éste del 18 %. Estos resultados analíticos son similares a los contenidos proteicos y grasos reflejados en su etiquetado (Tabla 2.2). Los resultados experimentales reflejan un menor contenido de humedad en comparación al indicado en el envase en todos los casos, probablemente debido a la deshidratación gradual que experimentan estos productos durante su almacenamiento a pesar de su envasado. En cuanto al tipo de hidratos de carbono presentes y contenido, cabe destacar que el croissant es el producto que presenta los menores contenidos tanto total como de azúcares simples (mono y disacáridos). Todos los productos presentan además entre sí diferencias composicionales importantes derivadas de los ingredientes implicados en cada caso (origen de la grasa, tipo de azúcares, emulgentes, estabilizantes, etc.), y que condicionan la hidrólisis de las grasas y glúcidos por parte de los agentes digestivos tal y como se muestra a continuación.

TABLA 3.1. *Contenidos totales (%) de grasas, hidratos de carbono, proteínas y humedad (promedio y desviación estándar) (n=3).*

	Donut	Gofre	Croissant	Magdalena	Leche
Grasas	18,01 ± 0,07	23,7 ± 0,3	28,50 ± 0,06	24,8 ± 0,9	2,43 ± 0,13
Hidr. decarb.	50,7 ± 0,6	54 ± 3	56 ± 3	56 ± 5	4,6 ± 0,5
Proteínas	5,73 ± 0,13	5,7 ± 0,2	8,07 ± 0,12	4,70 ± 0,12	3,00 ± 0,05
Humedad	16,70 ± 0,08	18,09 ± 0,02	15,00 ± 0,3	16,19 ± 0,08	88,5 ± 0,3

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

El índice de degradación de la matriz (IDM) permite evidenciar los cambios macroestructurales que experimenta el alimento a lo largo de la digestión como consecuencia de los procesos físicos (movimientos mecánicos) y químicos (hidrólisis enzimática de los macronutrientes, etc.) que tienen lugar. Estos cambios están condicionados tanto por la composición como la estructura matricial del alimento. Los productos de bollería son alimentos porosos con una importante fase gaseosa atrapada en su interior y cuya magnitud y tamaño de poros depende tanto de los ingredientes como del tipo de procesado. Así, los azúcares, junto con otros ingredientes, ayudan al desarrollo de la estructura durante el horneado o fritura (Tejero, 2000), y más concretamente a la retención de las burbujas de aire en el sistema, prolongando el periodo de su expansión, lo que contribuye a un aumento final del volumen del producto en la mayoría de estos productos. En concreto, el almidón desempeña un papel importante en la formación de la estructura del producto de bollería, ya que determina la viscosidad de la masa durante el calentamiento, ayudando a

retener los gases que se expanden: el dióxido de carbono (del impulsor), el aire (que se atrapa durante el batido) y vapor (del agua añadida). La grasa ayuda a incorporar aire durante el mezclado de la masa, las burbujas de aire que quedan atrapadas acumulan vapor de agua y el gas que aporta el impulsor se expande durante el horneado; también contribuye a una textura tierna, húmeda y suave, aumenta la palatabilidad del producto y mejora su masticabilidad (Stauffer, 1998; Lai & Lin, 2006; Oreopoulou, 2006). Todo ello, da como resultado productos con una estructura viscoelástica fácilmente desintegrable, tal y como indican los resultados del IDM (%) (Figura 3.1). Así, el IDM de los productos de bollería fue, al final de la digestión, superior al 80% en todos los casos, no existiendo influencia significativa ni de las condiciones de pH intestinal/ concentración biliar ni de la dosis de suplemento enzimático a partir de 1000 UL/ g grasa (IDM en ausencia de suplemente (0 UL/ g grasa) fue del 50 – 60 %). Es destacable el hecho de que las magdalenas presentaron un IDM ligeramente superior al resto de productos, siendo éste de entre un 88 – 95 %.

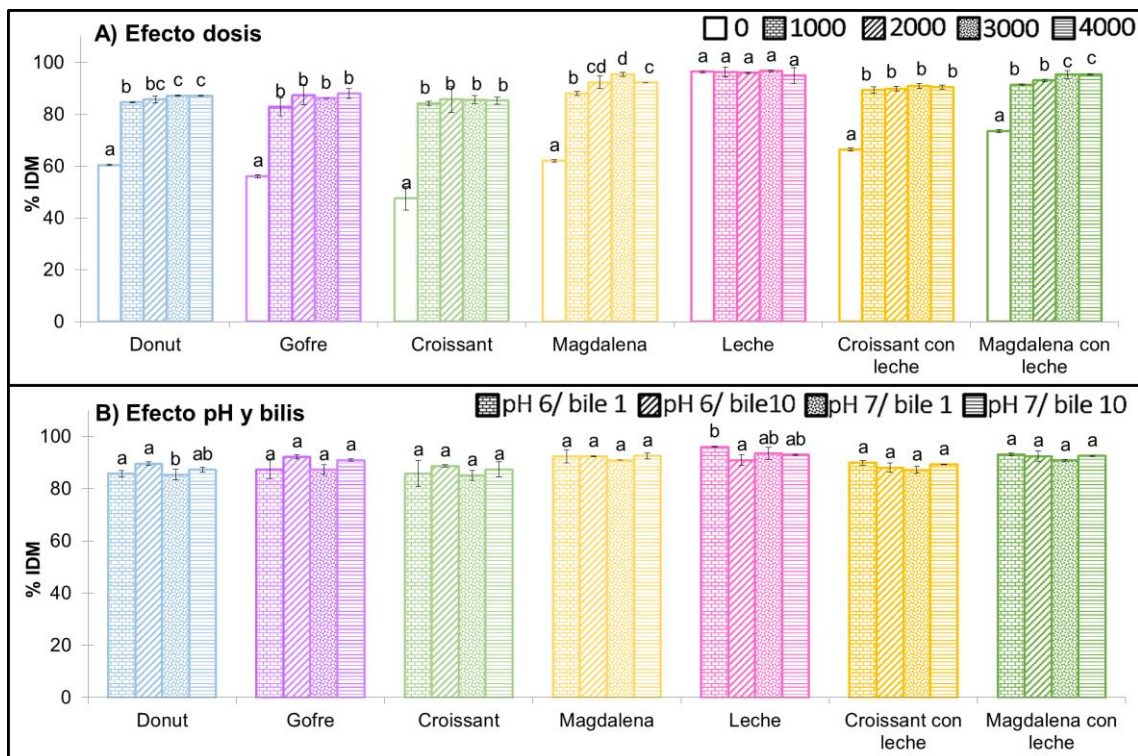


Figura 3.1. Índice de Degradación de la Matriz (% IDM) (promedio y desv. estándar ($n=3$)) de los productos de bollería digeridos de forma individual o conjunta (simulando la co-ingesta). El gráfico A muestra el IDM (%) a diferentes dosis de suplemento enzimático (kreon®) (0-4000 UL/ g grasa) y condiciones fijas de pH intestinal 6/1 mM de concentración biliar; mientras el B recoge el IDM (%) para una dosis fija de 2000 UL/ g grasa a diferentes condiciones de pH intestinal (6 o 7) y concentración biliar (1 o 10 mM). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p_{valor} \leq 0.05$).

La digestión conjunta de las magdalenas o croissants con leche supuso un ligero aumento respecto a su digestión individual, evidenciando la fácil desestructuración mecánica de estos productos durante el proceso digestivo, no requiriéndose de un líquido para mejorar la misma. Por último, cabe mencionar que el gofre aun presentando una estructura más compacta que el

resto de productos como consecuencia del molde térmico utilizado para su procesado, alcanza niveles similares de IDM.

3.3. Influencia de las condiciones intestinales de pH y concentración biliar, así como de la dosificación del suplemento enzimático Kreon® en la extensión de la lipólisis en productos de bollería, con y sin coingesta de leche.

La extensión de la lipólisis (%) obtenida bajo las diferentes condiciones ensayadas se recoge en la Figura 3.2. Primeramente, los resultados confirman la ausencia de lipólisis sin presencia del suplemento (0 UL/ g grasa) en todos los productos.

En cuanto a la influencia de la dosis, se puede observar un claro aumento de la lipólisis (%) conforme aumenta la dosis de suplemento ensayada para unas mismas condiciones de pH y concentración biliar (6/1), hasta alcanzar un máximo a una cierta dosis a partir de la cual no mejora la lipólisis o incluso disminuye. Así, los valores máximos de extensión de la lipólisis alcanzados en los ensayos in vitro, se situaron alrededor del 80 % con una dosis de 2000 y 3000UL/ g grasa en el caso de croissant y donuts respectivamente. El caso del gofre es una excepción, ya que la lipólisis aumenta para todo el rango de dosis ensayadas. Únicamente en el caso de la leche y de las magdalenas se llegó a una hidrólisis completa de los lípidos (100 %) requiriéndose para ello una dosificación de 2000 UL/ g grasa. La lipólisis del 100 % lograda en las magdalenas es consecuencia del tipo de grasa empleada en su formulación, siendo éste aceite de girasol. El aceite de girasol es un aceite vegetal líquido poliinsaturado, lo que facilita su digestión frente a otros lípidos como el aceite de soja, que contiene menos proporción de ácidos poliinsaturados, o el de palma y coco, los cuales presentan una mayor proporción de ácidos saturados y monoinsaturados (Giang, et al., 2016; Voiturez, 1997). La ingesta conjunta de magdalenas con leche no modificó significativamente la hidrólisis de los lípidos con respecto a los resultados obtenidos individualmente, dado que ya se alcanzaba una lipólisis del 100 %. En cambio, la codigestión de croissant con leche aumentó la lipólisis registrada en este producto de forma individual, debido a la presencia de leche, alimento de fácil digestión lipídica.

En relación al efecto del pH intestinal y concentración biliar, un aumento en la concentración biliar resultó ser relevante únicamente a pH 6 en la digestión lipídica de donuts y croissant. Parece interesante que a la vista de los resultados el simple aumento del pH intestinal de 6 a 7, pH óptimo de trabajo del suplemento, sería suficiente para mejorar considerablemente la lipólisis (20–30 % de incremento de lipólisis). En el caso del gofre, esta variable resultó ser un parámetro crítico a cualquiera de los dos pH ensayados, alcanzándose la lipólisis máxima a bilis 10 mM con independencia del pH intestinal. Las sales biliares actúan sobre el glóbulo graso, emulsificándolo y desplazando los componentes situados en la superficie interfacial, proteínas entre otros, favoreciendo así el acceso de la lipasa y co-lipasa al mismo para que puedan



iniciar la lipólisis. Una vez iniciado la hidrólisis de los lípidos por parte de las enzimas, las sales biliares ayudan al transporte de los productos de la lipólisis (ácidos grasos libres y monoglicéridos, principalmente) desde la superficie interfacial hasta la fase acuosa circundante (fluido digestivo). Por último y no menos importante, promueven la micelación de los ácidos grasos libres y monoglicéridos para su efectiva absorción en la mucosa intestinal (Maldonado-Valderrama et al., 2011).

Cabe destacar que, para la magdalena, la digestibilidad lipídica no se vio comprometida por las condiciones intestinales, registrándose una lipólisis del $\approx 85\%$ a 2000 UL/ g grasa independientemente del pH y concentración biliar, siendo este producto de bollería el más recomendable para individuos con IPE por su mayor digestibilidad en condiciones pH 6/ 1 mM comparativamente al resto de productos. En el caso de la leche, los resultados muestran una lipólisis máxima a pH 6/ bilis 1 mM lo que se debe a que la grasa de la leche presenta mayor digestibilidad que los productos de bollería ya que se trata de una emulsión en la que los glóbulos grasos se encuentran dispersos en la fase continua. En este sentido, para un mismo pH de 6, la concentración biliar de 10 mM incrementa la efectividad de la enzima, siendo necesaria una dosis menor para alcanzarse el óptimo. Del mismo modo, a pH 7, la enzima trabaja de forma más eficiente, siendo necesarias dosis menores para alcanzar la máxima lipólisis, si bien en este caso, la concentración de 1 mM es suficiente para alcanzar una lipólisis óptima a bajas dosis de enzima (Villa, 2016). La simulación de la digestión conjunta de croissant con leche, evidenció una reducción de la lipólisis con respecto a la digestión individual del croissant, a excepción de las condiciones pH 6/ bilis 1 mM. Este hecho estaría relacionado, tal y como se ha comentado anteriormente, con que la dosis de Kreon® ensayada (2000 UL/g grasa) es superior a la que maximiza la lipólisis para el resto de condiciones de pH y concentración biliar. En el caso de magdalenas con leche, la extensión de la lipólisis resultó ser del mismo orden en el alimento digerido individualmente o con leche.

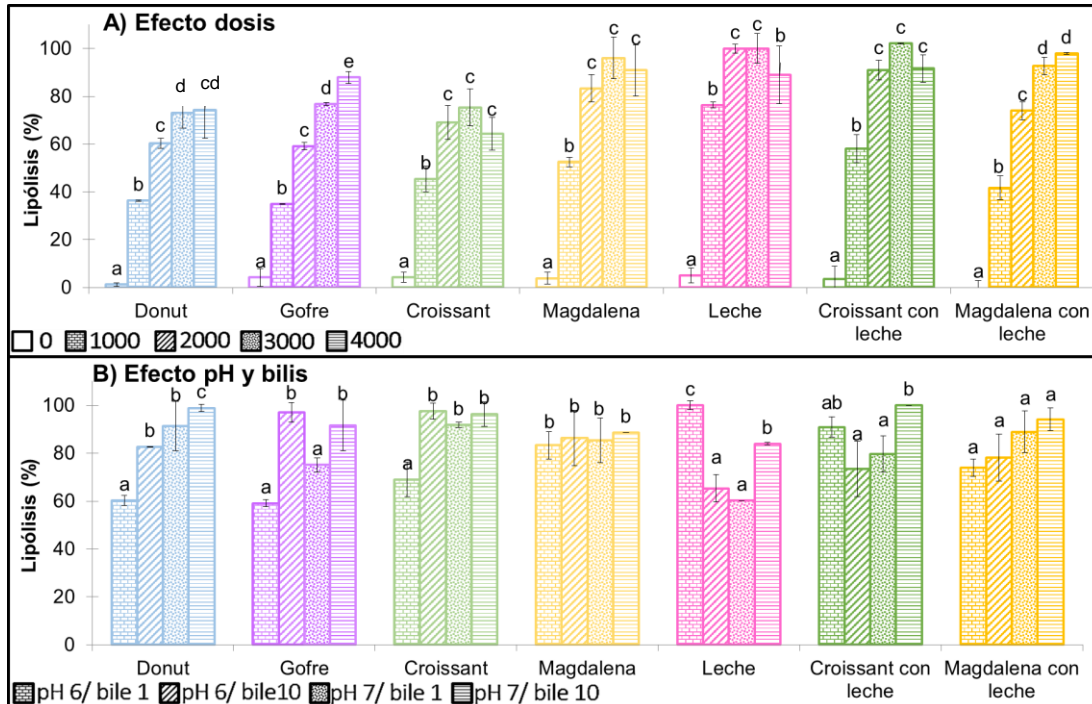


Figura 3.2. Extensión de la lipólisis (%) (promedio y desv. estándar ($n=3$)) de los productos de bollería digeridos de forma individual o conjunta (simulando la co-ingesta). El gráfico A muestra la lipólisis (%) a diferentes dosis de suplemento enzimático (Kreon®) (0-4000 UL/ g grasa) y condiciones fijas de pH intestinal 6/1 mM de concentración biliar; mientras el B recoge la lipólisis (%) para una dosis fija de 2000 UL/ g grasa a diferentes condiciones de pH intestinal (6 o 7) y concentración biliar (1 o 10 Mm). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p_{valor} \leq 0.05$).

3.4. Influencia de las condiciones intestinales de pH y concentración biliar así como de la dosificación del suplemento enzimático Kreon® en la extensión de la glucólisis en productos de bollería, con y sin coingesta de leche

El almidón se compone de dos tipos de polímeros de glucosa, amilosa (15-20%) y amilopectina (80-85%). La mayor parte de la digestión del almidón tiene lugar en el intestino donde la α -amilasa pancreática produce maltosa, maltotriosa y α -dextrinas, siendo la glucosa el producto final de dicha hidrólisis (Gropper & Smith, 2013), que, al ser absorbida, aparece a concentraciones relativamente altas en la circulación sanguínea durante la digestión (Butterworth, Warren & Ellis, 2011). La Figura 3.3 recoge los resultados de glucólisis obtenidos después de 20 y 120 minutos de etapa intestinal, pudiendo relacionarse la glucólisis tras 20 minutos (RDS) con el índice glucémico de dichos productos (Englyst, Veenstra & Hudson, 1996; Araya et al., 2002; Ells et al., 2005; Seal et al., 2003). Al igual que ocurría con el índice de degradación de la matriz, en ausencia de suplemento enzimático los valores de glucosa obtenidos fueron bastante menores comparados con los valores en presencia de enzima, excepto en la leche, para la que no se observaron diferencias en función de la dosis (aproximadamente 90 %) (Figura 3.3). Estos valores de glucólisis, aún sin presencia de enzima, se deben a la presencia de azúcares

simples (mono y disacáridos) en los alimentos, presentando la leche lactosa como único azúcar en su composición. El donut y la magdalena resultaron en mayores valores de RDS, lo que puede deberse, en el caso del donut, a que parte del azúcar de este producto se añade en forma de jarabe de glucosa y fructosa, además de llevar como aditivo dextrosa, lo que puede facilitar su digestión. En el caso de la magdalena, su composición y estructura parecen facilitar la accesibilidad de las enzimas, lo que conlleva a un aumento de la digestibilidad de sus macronutrientes. El gofre y el croissant, sin embargo, presentaron los valores más bajos de RDS, siendo éstos muy similares entre sí. Cabe destacar que de entre los productos de bollería digeridos individualmente, el croissant presentó los valores más bajos de azúcares resistentes (RS). Esto puede deberse a que presentó la menor proporción de azúcares resistentes (RS) lo que puede estar relacionado con el proceso de producción el cual implica una etapa de refrigeración previa al horneado que puede dar lugar a azúcares más resistentes a la digestión (Gallego, 2010). Finalmente, cuando la magdalena y el croissant fueron digeridos con leche, se observó que en ambos casos los resultados de glucólisis fueron similares a los obtenidos en los productos digeridos individualmente.

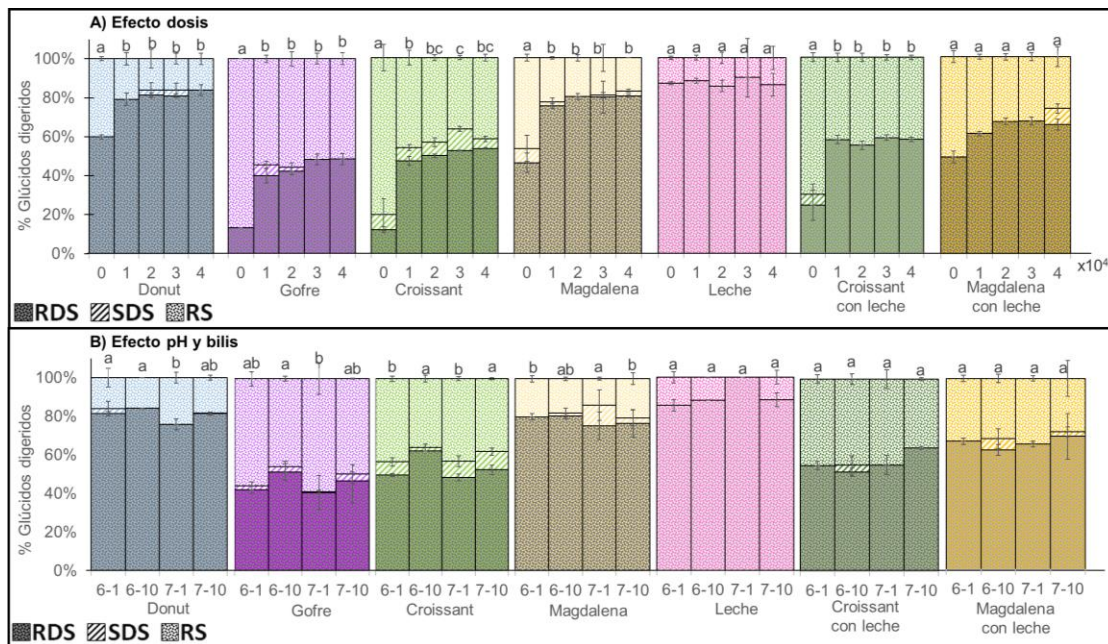


Figura 3.3. Glucólisis (%) (promedio y desv. estándar ($n=3$)) de los productos de bollería digeridos de forma individual o conjunta (simulando la co-ingesta). En el gráfico A se ve el efecto a diferentes dosis de suplemento enzimático (Kreon®) (0-4000 UL/ g grasa) y condiciones fijas de pH intestinal 6/1 mM de concentración biliar). En el gráfico B la dosis es fija (2000 UL/ g grasa) y varían las condiciones de pH intestinal (6 o7) y concentración biliar (1 o10 Mm). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p_{valor} \leq 0.05$).



4. CONCLUSIONES

El índice de degradación de la matriz fue similar en todos los productos de bollería, independientemente de si se acompañaban de leche. La extensión de la lipólisis aumento al aumentar la dosis de Kreon® hasta un valor a partir del cual un aumento de la dosis no se tradujo en un aumento de la lipólisis, pudiendo ser considerados estos valores como dosis óptimas. Únicamente en el caso del gofre, la lipólisis aumentó conforme lo hizo la dosis de suplemento. Así, para la magdalena y la leche se alcanzaron niveles de lipólisis del 100 % a una dosis de 2000 UL/g grasa; mientras que en donut y croissant la lipólisis máxima fue del 80 % a una dosis de 2000 y 3000 UL/g grasa, respectivamente. Respecto a la glucólisis, la leche presentó los mayores valores de azúcares rápidamente digeribles, seguida del donut y la magdalena. En cambio, el gofre y croissant presentaron mayores proporciones de azúcares resistentes.

Así pues, la magdalena sería el producto de bollería más recomendable para individuos con IPE y condiciones intestinales subóptimas de bajo pH y concentración biliar. No sólo por los resultados de lipólisis y glucólisis obtenidos, sino además por la presencia de aceite de girasol como único grasa en su formulación.

El acompañar la digestión de productos de bollería con leche, pareció tener una repercusión positiva en el caso del croissant en cuanto a un aumento de la lipólisis se refiere, al menos a pH 6 y concentración biliar 1 mM. A la vista de los resultados sería interesante diseñar un estudio orientado a estudiar la naturaleza de las interacciones sobre la digestión de macronutrientes.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a la Unión Europea, y concretamente al Programa Marco de Investigación e Innovación Horizonte 2020, la financiación otorgada al proyecto MyCyFAPP-643806.

6. REFERENCIAS

AOAC, (2000). *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemist. 15th Edition.

Araya, H., Contreras, P., Alvina, M., Vera, G., and Pak, N. (2002). *A comparison between an in vitro method to determine carbohydrate digestion rate and the glycemic response in young men*. European journal of clinical nutrition. 56, 735-739.

Butterworth, P. J.; Warren, F. J. & Ellis, P.R. (2011). *Human α -amylase and starch digestion: An interesting marriage*. Starch- Stärke, 63, 395-105.ç



Calvo-Lerma, J. (2014). *Digestión in vitro de grasas en pacientes sometidos a terapia de sustitución enzimática: puesta a punto del método y ensayos de digestión de leche*. Trabajo final del Máster Universitario en Ingeniería de Alimentos. U.P.V.

Camarero Gómez, A. (2015). *Presente y futuro de la industria de panadería, bollería y pastelería*. Universidad Complutense de Madrid. Distribución y consumo, 37, vol. (5).

Dupont, D.; Bordoni, A.; Brodkorb, A.; Capozzi, F.; Velickovic, T. C.; Corredig, M.; Cotter, P. D.; De Noni, I.; Gaudichon, C.; Golding, M.; Lea, T.; Huërou-Luron, I.; Mackie, A.; Madsen, C.; Meulenaer, D.; Nys, Y.; Pinhlanto, A.; Recio, I.; Rémond, D.; Requena, T.; Souchon, I.; Swiatecka, D.; Turgeon, S.; Vegarud, G.; Vreeburg, R.; Weitschies, W. & Wickham, M. (2011). *An International Network for Improving Health Properties of Food by Sharing our Knowledge on the Digestive Process*. Food Digestion, 2,23-25

Ells, L. J., Seal, C. J., Kettlitz, B., Bal, W., and Mathers, J. C. (2005). *Postprandial glycaemic, lipaemic and haemostatic responses to ingestion of rapidly and slowly digested starches in healthy young women*. British Journal of Nutrition, 94, 948-955.

Englyst, H. N., Veenstra, J., and Hudson, G. J. (1996). *Measurement of rapidly available glucose (RAG) in plant foods: a potential in vitro predictor of the glycaemic response*. British Journal of Nutrition, 75, 327-337.

Gallego, M. de M.(2010).*Manual de Buenas Practicas de Fabricación. Descripción de los procesos de fabricación*. Tecnoalbura.

Gelfond, D., Ma, C., Semler, J. & Borowitz, D. (2012). *Intestinal pH and Gastrointestinal Transit Profiles in Cystic Fibrosis Patients Measured by Wireless Motility Capsule*. Digestive diseases and sciences, 58(8), 2275-2281

Giang, T. M., Gaucel, S., Brestaz, P., Anton, M., Meynier, A., Trelea, I. C., & Le Feunteun, S. (2016). *Dynamic modeling of in vitro lipid digestion: Individual fatty acid release and bioaccessibility kinetics*. Food Chemistry, 194, 1180–1188. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.125>

Gropper, S., and Smith, J. (2013). *Advanced nutrition and human metabolism*. 6th Edition. Cengage Learning, United States of America.

Horstmann, S. W., Lynch, K. M. & Arendt, E. K. (2017). *Starch Characteristic Linked to Gluten-Free Products*. Foods, 6(4), 1-21

Lai, H.M. y Lin, T.C. (2006). *Bakery products: science and technology*. En: Bakery products: Science and Technology.(1ª edición) Ed: Hui. Y.H. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.

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.

Latham, M. C. (2002). *Nutrición humana en el mundo en desarrollo. Capítulo 9 (Macronutrientes: Carbohidratos, grasas y proteínas)*. Organización



de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 29.

Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A., Mackie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface science*, 165, 36-46.

MAPAMA, (2017). *Informe del consumo de alimentación en España 2016*. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente [Dirección URL: <http://www.mapama.gob.es/>; fecha última consulta 01/07/2017].

MAPAMA, *Monográfico 4º trimestre de 2004 (Productos destinados a la población infantil 3 – 12 años)*. (2004). Observatorio del consumo y la distribución alimentaria.

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.

Mishra, S., Monro, J. & Hedderley, D. (2008). *Effect of Processing on Slowly Digestible Starch and Resistant Starch in Potato*. *Starch*, 60, 500-507.

Oreopoulou, V. (2006). *Fat replacers*. En: *Bakery products: Science and Technology*. (1ª edición) Ed: Hui, Y.H. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, EEUU.

Seal, C. J., Daly, M. E., Thomas, L. C., Bal, W., Birkett, A. M., Jeffcoat, R., and Mathers, J. C. (2003). *Postprandial carbohydrate metabolism in healthy subjects and those with type 2 diabetes fed starches with slow and rapid hydrolysis rates determined in vitro*. *British Journal of Nutrition*, 90, 853-864.

Sikkens, E.C.M.; Cahen, D.; Kuipers, E. & Bruno, M. (2010). *Pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis*. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 24(3), 337-347

Stauffer, C.E. (1998). *Fats and oils in bakery products*. *Cereal Foods World*, 43(3), 120-126.

Tejero, F. (2000). *Los azúcares en las masas fermentadas*. Molinería y Panadería. (www.francisocotejero.com; fecha de última consulta 01/07/2017).

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 cystic fibrosis*. *Clinical Nutrition*, 3, 557-577

Villa, S. (2016). Estudio de la cinética de digestión de la grasa de la leche bajo distintas condiciones gastrointestinales simuladas. Trabajo fin de Grado en Biotecnología, UPV.

Voiturez, T. (1997). *Sustituciones entre aceites vegetales*. Palmas, Vol. 18, N°2.