

## Métodos para evaluar la biodisponibilidad, la bioaccesibilidad y el valor nutricional de suplementos alimenticios

S.A. Hernández-Esquivel<sup>1</sup>, I. Martínez-Arellano<sup>1</sup> y M.S. Córdova-Aguilar\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito escolar s/n Ciudad Universitaria, Col UNAM, CU, Delegación Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México

\*[marisol.cordova@icat.unam.mx](mailto:marisol.cordova@icat.unam.mx)

### RESUMEN

La biodisponibilidad, la bioaccesibilidad y la calidad nutricional en particular de las proteínas son variables importantes para definir la efectividad y calidad de un alimento o suplemento para su utilización terapéutica. Conocer el valor nutricional de las proteínas permite la complementación proteica en la formulación de mezclas de proteínas de baja calidad y mejorar la biodisponibilidad y la calidad de la mezcla. Existen diversos métodos para determinar estos parámetros de las proteínas tanto *in vitro* como *in vivo*. Los métodos *in vitro* incluyen sistemas de digestión simulada y el uso de métodos de cultivo celular que imitan el eje intestino-torrente sanguíneo, los cuales se utilizan ampliamente en las ciencias de la alimentación, la nutrición y la industria farmacéutica, ya que permiten estudiar los cambios estructurales, la digestibilidad y la liberación de componentes de alimentos bajo condiciones gastrointestinales específicas. La eficacia nutricional de los productos alimenticios puede garantizarse mediante la determinación de la bioaccesibilidad del alimento, metodología que proporciona información valiosa para seleccionar la dosis y la fuente adecuadas de matrices. Los ensayos de digestión *in vitro* simulan las condiciones fisiológicas que se llevan a cabo en el organismo durante la digestión *in vivo*. Entre los más relevantes tenemos a: ARES, IMGS, MGD, SGH, SIMGI, SMG y TIM.

**Palabras clave:** biodisponibilidad, bioaccesibilidad, proteína, calidad nutricional.

### ABSTRACT

Bioavailability, bio accessibility and nutritional quality in particular of proteins are important variables to define the effectiveness and quality of a food or supplement for therapeutic use. Knowing the nutritional value of proteins allows protein supplementation in the formulation of low quality protein mixtures and improve the bioavailability and quality of protein. There are several methods for determining these protein parameters both *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* methods include simulated digestion systems and the use of cell culture methods that simulate the gut-blood stream, which are widely used in food science, nutrition and the pharmaceutical industry, since they allow studying structural changes, digestibility and the release of food components under specific gastrointestinal conditions. The nutritional efficacy of food products can be ensured by determining the bioaccessibility of the food, a methodology that provides valuable information for selecting the appropriate doses and source of matrices. *In vitro* digestion tests simulate the physiological conditions in the body during *in vivo* digestion. Among the most relevant are ARES, IMGS, MGD, SGH, SIMGI, SMG and TIM.

**Keywords:** bioavailability, bio accessibility, protein.

## INTRODUCCIÓN

La biodisponibilidad, la bioaccesibilidad y la calidad nutricional en particular de las proteínas son determinantes importantes para definir la efectividad y calidad de un alimento o suplemento para su utilización terapéutica. Existen diversos métodos tanto *in vitro* como *in vivo* para determinarlas. Los métodos *in vitro* incluyen sistemas de digestión simulada y el uso de métodos de cultivo celular que imitan el eje intestino-toraxo sanguíneo, los cuales se utilizan ampliamente en las ciencias de la alimentación, la nutrición y la industria farmacéutica, ya que permiten estudiar los cambios estructurales, la digestibilidad y la liberación de componentes de alimentos bajo condiciones gastrointestinales específicas. El ser humano necesita un total de veinte aminoácidos, de los cuales 9 son aportados por la dieta. Es importante que no falte ningún aminoácido para sintetizar las proteínas en las que sea requerido (González *et al.*, 2007). De ahí que la proteína presente en la dieta no sólo debe aportar los aminoácidos para atender al mantenimiento de la proteína corporal y crecimiento, sino que también, debe tener la calidad que permita la biodisponibilidad de los aminoácidos. La limitación o ausencia puede dar lugar a diferentes tipos de desnutrición (González *et al.*, 2007; Gil, 2005). Por otro lado, conocer el valor nutricional de las proteínas permite la complementación proteica en la formulación de mezclas de proteínas de baja calidad y mejorar la biodisponibilidad y la calidad de la mezcla (Martínez & Martínez, 2006).

El valor nutricional de las proteínas dietéticas está, por lo tanto, relacionado con la biodisponibilidad de sus aminoácidos constitutivos y depende de la eficiencia de su utilización metabólica para satisfacer los requerimientos de aminoácidos necesarios para el crecimiento y la renovación de proteínas corporales (Mariotti *et al.*, 1999). Así mismo, depende de la velocidad de digestión del alimento dentro del tracto gastrointestinal (Boirie *et al.*, 1997). Para evaluar la calidad de la proteína existen diversos métodos que se pueden clasificar en químicos, biológicos y microbiológicos. Actualmente se utiliza de rutina el score de aminoácidos corregido por la digestibilidad de la proteína, conocido como PDCAAS (protein digestibility corrected amino acid score) (Martínez & Martínez, 2006). También se utiliza la puntuación de los aminoácidos indispensables digeribles (DIAAS), que tiene en cuenta el contenido de aminoácidos digeribles en comparación con una proteína de referencia y su digestibilidad ileal (FAO, 2013).

## MÉTODOS *IN VIVO* (BIODISPONIBILIDAD)

**PDCAAS:** La calidad proteica puede evaluarse expresando el contenido del primer aminoácido indispensable limitante de la proteína problema como porcentaje del contenido del mismo aminoácido en el patrón de referencia de aminoácidos indispensables (o frente a una proteína “patrón” o “ideal”). Posteriormente, este porcentaje se corrige con el coeficiente de digestibilidad verdadero (Schaafsma, 2000).

**DIAAS:** Puntuación de aminoácidos indispensables digestibles. Los mg del aminoácido de la dieta Indispensable digestible en 1 gramo de la proteína entre mg del mismo aminoácido en un gramo de la proteína de referencia. La digestibilidad debería basarse en la digestibilidad ileal verdadera (es decir determinada al final del intestino delgado) de cada aminoácido realizada preferiblemente en humanos (Gaudichon et al., 2002; Moughan, 2003; Fuller & Tomé, 2005). Si esto no es posible, se podrá determinar en cerdos en crecimiento (Stein et al., 2007) o en ratas en crecimiento (Moughan et al., 1984) en este orden.

La digestibilidad de proteínas de fuentes animales se encuentra en el intervalo de 96-99%, un valor biológico de 80 – 100%, utilización de proteínas 73-94%, PDCAAS 92-100% y DIAAS 113-114%. Asimismo, para las proteínas de fuentes vegetales, la digestibilidad se encuentra en el intervalo de 70-98%, un valor biológico de 56 – 74%, utilización de proteínas 53-67%, PDCAAS 25-100% y DIAAS 29-89%.

## MÉTODOS *IN VITRO*

La estimación de la digestibilidad del nitrógeno *in vitro* en animales monogástricos está basada en incubaciones consecutivas con enzimas que simulan la digestión gástrica e intestinal. El uso de estas enzimas en su secuencia y medio natural es un requisito para las incubaciones *in vitro* (Savoie, 1991). Esto puede ser posible mediante la utilización de fluidos intestinales (Furuya *et al.*, 1979, Dierick *et al.* 1985, Lowgren *et al.*, 1988); sin embargo, una solución de pancreatina puede reemplazar al fluido intestinal. Actualmente, hay enzimas que se utilizan en diferentes métodos de digestibilidad *in vitro*.

Dentro de las técnicas para evaluar la digestibilidad *in vitro* destacan el *pH Drop* y el *pH-Stat*. En el método *pH-Drop* se cuantifica la reducción del pH causada por la liberación de hidrógeno durante la ruptura de los enlaces peptídicos entre los aminoácidos que conforman una proteína. Esta digestión es mediada por la acción de enzimas proteolíticas que pueden ser extraídas de la especie de interés o enzimas purificadas de mamíferos y de uso comercial. Este método tiene de limitante que, durante la digestión, el pH de la reacción puede salirse del intervalo óptimo de acción de las enzimas proteolíticas (Alarcón *et al.*, 2002). Para resolver este problema el método del *pH-Stat*, cuantifica la cantidad de NaOH requerido para mantener constante el pH durante el periodo de digestión del ingrediente/dieta con la enzima por medio de un titulador automático altamente preciso (Alarcón *et al.*, 2002).

### *Método de Predicción de Digestibilidad in vitro*

Esta metodología permite predecir la digestibilidad de las materias primas o de las dietas en el tubo digestivo de los animales al someter a los alimentos evaluados a una serie de pasajes por compuestos enzimáticos, que simulan la degradación que ocurre dentro del organismo vivo teniendo en cuenta los segmentos del tracto gastrointestinal (Hervera *et al.*, 2007; Castrillo *et al.*, 2009; Coles *et al.*, 2011).

### Métodos diseñados para evaluar la digestión simulada

#### -Modelos de digestión *in vitro*

Actualmente existen distintos modelos de digestión *in vitro* que se diferencian principalmente, en el número y tipo de fases incluidas, en la composición de los fluidos simulados (enzimas, soluciones salinas, etc.) y en las tensiones mecánicas y flujos de fluidos empleadas. (Hur, *et al.*, 2011). Los modelos de digestión *in vitro* pueden ser estáticos o dinámicos.

#### -Modelos de digestión *in vitro* estáticos

En ellos se utiliza un compartimiento único, al que se le va añadiendo de forma manual las soluciones simuladas de cada fase, tras los periodos de incubación/agitación establecidos; además de corregir el pH del medio. Se han estudiado cuestiones relacionadas con el campo de la nutrición, la toxicología o la microbiología (Zhang *et al.*, 1996).

- **Estimación de la digestibilidad del nitrógeno:** Se estandarizó y validó una técnica *in vitro* para la evaluación de ingredientes para la alimentación de cerdos, basada en el método de Dierick *et al.* (1985). Se sustituyó la fuente comercial de pancreatina por enzimas extraídas del páncreas de cerdos. Los resultados de digestibilidad promedio para los diferentes ingredientes en los que se utilizó pancreatina comercial y extracto pancreático (75.9 vs 75.4 %  $\pm$  ES 0.379, respectivamente), evidencian que la sustitución de la enzima comercial por enzimas provenientes del preparado pancreático es un método confiable, preciso y repetible. Según los resultados se puede sustituir la pancreatina comercial utilizada en el método *in vitro* por Dierick *et al.*, (1985) por una solución enzimática obtenida con 200 mg de preparado enzimático. Esta sustitución no afecta la precisión y confiabilidad del método.

#### -Modelos de digestión *in vitro* dinámicos

Son capaces de reproducir de un modo más próximo el proceso de digestión *in vivo*, con lo que permiten predecir de un modo más aproximado el perfil de disolución y la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos en alimentos y fármacos (Viadel, 2016).

- **Modelo gástrico dinámico (MGD):** Se compone de dos compartimentos diferentes que persiguen simular dos partes anatómicas del estómago, el cuerpo y el antro, sin embargo, no es capaz de reproducir las contracciones peristálticas gástricas (Vardakou *et al.*, 2011).
- **El Simulador Gastrointestinal Dinámico (SIMGI):** Representa el funcionamiento del tracto gastrointestinal humano a través de la evaluación de los procesos de digestión gastrointestinal y fermentación colónica de los alimentos. Se compone de estómago, intestino delgado, y colon (ascendente, transversal y descendente) gobernados por un autómata, y que pueden operar de forma conjunta o independiente. El estómago se compone de dos unidades con paredes flexibles y rodeadas por una camisa de metacrilato donde se bombea agua, mantiene una temperatura constante y mezcla el contenido estomacal con movimientos peristálticos. El sistema varía el pH y el tiempo de vaciado al intestino delgado. El intestino delgado es un reactor con condiciones anaerobias y pH controlado, se mezcla el contenido gástrico con las secreciones intestinales mediante agitación mecánica regulable. Por último, el colon se compone de tres reactores (colon ascendente, transversal y descendente) que operan en condiciones de anaerobiosis, con agitación mecánica y pH controlado, y se aloja microbiota

intestinal de origen humano. Además, dispone de diferentes puntos de toma de muestras en cada uno de los compartimentos para llevar a cabo los análisis bioquímicos y microbiológicos correspondientes (Barroso *et al.*, 2015).

- **Simulador gástrico humano (SGH):** Reproduce los movimientos peristálticos de forma muy similar al del estómago (Kong & Singh 2010). Sin embargo, únicamente reproduce la fase gástrica de la digestión no simulan el tiempo de tránsito real, ni el vaciado gástrico (Guerra *et al.*, 2012). Es una cámara de látex cilíndrica que simula el compartimento del estómago, donde cuatro cintas transportadoras contienen una serie de rodillos de Teflón los cuales inciden periódicamente en la cámara de látex. Se enfocan en el estudio de los cambios en las propiedades físicas y químicas del contenido gástrico y la transformación de los constituyentes de los alimentos que se producen durante la digestión simulada, así como la influencia de las condiciones fisiológicas, los cuales incluyen las secreciones de enzimas y ácido, y las fuerzas de secreción sobre la desintegración de alimentos y la liberación de nutrientes (Verhoeckx *et al.*, 2015).
- **TNO gastro intestinal modelo 1 (TIM-1):** Es el modelo más realista en simular las condiciones de la digestión *in vivo*. Es dinámico controlado por ordenador que simula las principales funciones digestivas fisiológicas del estómago e intestino delgado (Villemejane *et al.*, 2015). A principios de la década de 1990 se desarrolló el Modelo TNO Gastrointestinal TIM-1 con el objetivo de predecir la bioaccesibilidad de comidas y productos farmacéuticos y evaluar el tiempo de tránsito de la comida a través del tracto gastrointestinal. Fue el primero en adaptar y controlar los parámetros dinámicos del lumen gástrico; se compone de 4 compartimentos, cada compartimento está compuesto por dos unidades de vidrio con paredes flexibles en su interior, los compartimentos están conectados entre ellos por medio de válvulas de bombeo peristáltico (Minekus *et al.*, 1995). El mezclado para cada compartimento se logra alternando la presión del agua que circula fuera de las paredes flexibles en donde la temperatura del agua se mantiene 37 °C con el objetivo de simular la temperatura corporal humana, la frecuencia de contracción en el compartimento gástrico y el intestino delgado fue llevado a cabo por medio de 3 y 9 contracciones por minuto respectivamente a través de las paredes flexibles (Minekus *et al.*, 1995). Antes de la introducción en el compartimento gástrico, la comida se mastica con un procesador de alimentos y se mezcla con saliva artificial que contiene electrolitos y amilasa- $\alpha$ . La secreción gástrica contiene electrolitos, pepsina y una lipasa fúngica (como una alternativa a la lipasa gástrica). La secreción duodenal consiste en electrolitos, bilis y pancreatina (Minekus *et al.*, 1995).
- **Modelo IMGS:** Es un modelo de estómago de látex con la misma morfología (en forma de J) y dimensiones de un estómago humano adulto, lo que es una mejora en comparación con otros *in vitro* modelos gástricos. Esta característica permite una distribución más realista del bolo alimenticio en el estómago, característica relevante a la hora de digerir partículas sólidas o semisólidas. Las partículas sólidas (más densas que el agua) del bolo alimenticio se colocan en la curvatura más grande del estómago, mientras que las partículas más ligeras fluyen en el canal del píloro (Schulze, 2006). Se utiliza para evaluar la lipólisis intestinal de emulsiones O/W estabilizadas con proteína (Barros *et al.*, 2016). El modelo se coloca en una cámara de acrílico transparente la cual contiene agua cuya temperatura se encuentra regulada por medio de un termostato manteniendo una media de operación de 37 °C, la simulación de la motilidad gástrica es ejercida por medio de un conjunto de pistones de acrílico. El sistema mecánico genera una frecuencia de 3 contracciones por minuto. Permite reproducir los cambios de pH durante la digestión gástrica; para la preparación de las enzimas gástricas, emplean una solución gástrica común, agua, HCl, pepsina (de la mucosa gástrica porcina), cloruro de calcio y lecitina de soja, donde para cada ensayo se realiza una mezcla independiente, los cuales son añadidos al contenedor gástrico previo a las pruebas (Barros *et al.*, 2016).

- **Modelo ARIS (Automatic and Robotic Intestinal System/ Sistema Intestinal Automático y Robótico):** El Centro de Investigación en Tecnología y Asistencia del Estado de Jalisco, CIATEJ, cuenta con el Laboratorio de Digestión Ex Vivo. Es un simulador del tracto digestivo humano, que ha sido validada en ensayos clínicos, que simula las condiciones fisiológicas de los sujetos de estudio. Los sujetos constituyen una población objetivo como niños, ancianos, deportistas, personas con obesidad u otros. Se toman muestras en cualquier momento respetando parámetros relevantes del ensayo *in vivo* sin la dependencia del uso de organismos superiores (animales). Puede ser utilizado en diversos mercados como: alimentos, bebidas, ingredientes nutricionales, nutracéuticos y farmacéuticos. Es alimentado cada 24 horas con 200 mL de alimento mezclado con amilasas salivales, éste es estandarizado de acuerdo a los hábitos alimenticios de la población objetivo y el producto a evaluar. El proceso inicia en el estómago donde se mantiene a un pH ácido, adición de enzimas pépticas y agitación controlada. Posteriormente la sección del intestino delgado alimentada con las descargas del estómago se ajusta el pH a condiciones más alcalinas y se adicionan soluciones de pancreatina y bilis, la agitación es controlada. Se continúa con el proceso de alimentación, en las siguientes tres secciones del colon previamente inoculadas con microbiota intestinal humana, respetando los tiempos de retención fisiológicos en cada sección. Se obtienen muestras de alimentos en cada sección del simulador en los días 0 (sin el producto a evaluar), día 4 (digestión completa de una administración) y día 9 (administración continua), tomando en cuenta que una digestión completa dura 72 horas.

En la actualidad, las empresas alimentarias únicamente pueden comercializar alimentos funcionales alegando declaraciones de salud una vez hayan demostrado científicamente que existen evidencias suficientes que confirmen su funcionalidad y tras haber logrado una opinión favorable de la EFSA (European Food Safety Authority) al respecto (Ramón, 2016). Para este proceso de validación, las ciencias ómicas juegan un papel fundamental. Son todo un conjunto de disciplinas en las que se analizan desde una aproximación global diferentes aspectos bioquímicos como son los genes o las proteínas. De entre las diferentes ómicas, la metabolómica, basada en el análisis del conjunto de metabolitos de un organismo mediante el uso de técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la cromatografía acoplada a detectores de masas (GC-MS, HPLC-MS y HPLC-MS/MS), destaca como pieza fundamental en los estudios diseñados para confirmar la funcionalidad de los alimentos. Así, al ingerir un alimento funcional se producirán una serie de cambios en el organismo que se verán reflejados en el metaboloma. Aquellos metabolitos que se puedan correlacionar directamente con la funcionalidad deseada serán los idóneos para ser usados como biomarcadores que confirmen su efectividad (Barallobre *et al.*, 2013).

## BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón F., Moyano J. & Diaz M. (2002). Evaluation of different protein sources for aqua feeds by an optimized pH-stat system. *Journal Science Food Agriculture*, 82, 697-704.
- Barallobre-Barreiro, Javier; Chung, Yuen-Li & Mayr, Manuel. (2013). La proteómica y la metabolómica: los mecanismos de la enfermedad cardiovascular y el descubrimiento de biomarcadores. *Revista Española de Cardiología*, 66 (8): 657-661.
- Barros, L., Retamal, C., Torres, H., Zúñiga, R.N. & Troncoso, E. (2016). Development of an *in vitro* mechanical gastric system (IMGS) with realistic peristalsis to assess lipid digestibility. *Food Research International*, 90, 216–225.
- Barroso E, Cueva C, Peláez C, Martínez-Cuesta MC, Requena T., 2015. Development of human colonic microbiota in the computer-controlled dynamic Simulator of the Gastro Intestinal tract SIMGI. *LWT-Food Sci Technol* ;61(2):283-9.
- Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M., Maubois, J. & Beaufrère, B. (1997). Slow and fast proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 14930-14935.
- Castrillo, C., Hervera, M. & Baucells, M., (2009). Methods for predicting the energy value of pet foods. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 1-14.
- Coles, L.T., Moughan, P.J. & Awati, A. (2011). Influence of assay conditions on the *in vitro* hindgut digestibility of dry matter. *Food chemistry*, 125(4), 1351-1358.
- Dierick, N., Vervaeke I., Decupeyre, I. & Henderickx, H. (1985). Protein digestion in pigs measured *in vivo* and *in vitro*. Digestive Physiology in the Pig. Proc. 3rd International Seminar on Digestive Physiology in the Pig. (Ed. A. Just , H. Jorgensen and J.A. Fernández). *National Institute of Animal Science. Copenhagen*. p. 329
- Dierick, N., Vervaeke I., Decupeyre, I. & Henderickx, H., (1985). Protein digestion in pigs measured *in vivo* and *in vitro*. Digestive Physiology in the Pig. Proc. 3rd International Seminar on Digestive Physiology in the Pig. (Ed. A. Just , H. Jorgensen and J.A. Fernández). *National Institute of Animal Science. Copenhagen*. p. 329
- FAO. Evaluación de las proteínas alimentarias en la nutrición humana: Informe de una consulta de expertos de la FAO de 2011; Documento 92 de la FAO sobre alimentación y nutrición; FAO: Roma, Italia, 2013.
- Fuller, M. & Tomé, D. (2005). *In vivo* determination of amino acid bioavailability in humans and model animals. *Journal of AOAC International*, 88, 923-934.
- Furuya, S., Sakamoto, K. & Takashi, S. (1979). A new *in vitro* method for the estimation of digestibility using intestinal fluid of the pig. *British Journal of Nutrition*, 41: 511.
- Gaudichon, C., Bos, C., Morens, C., Petzke, K., Mariotti, F., Everwand, J., Benamouzig, R., Daré, S., Tomé, D., & Metges, C. (2002). Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. *Gastroenterology*, 123, 50-9.
- Gil A. (ed.): Tratado de nutrición. Tomo 1. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Acción Médica. Madrid, 2005.
- González, L., Tellez, A., Sampedro, J. & Nájera, H. (2007). Las proteínas en la nutrición. *Respyn*, 8 (2), 1-7.
- 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.
- Hervera, M., Baucells, M.D., & Blanch, F. (2007). Prediction of digestible energy content of extruded dog food by *in vitro* analyses. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 91(5), 205-209,
- Hur, S., Lim, B., Decker, E. & McClements. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12.

- Kong, F., & Singh, R. (2010). A human gastric simulator (HGS) to study food digestion in human stomach. *Journal of Food Science*, 75(9): 627–635.
- Lowgren, W., Graham, H., Aman, P. & Raj, S. (1988). *In vitro* prediction of the nutritive value of pig feeds. Digestive Physiology in the Pig. Proc. 4th International Seminar : Polish Academy of Sciences. *Institute of Animal Physiology and Nutrition. Jablona, Poland*. p. 262
- Mariotti, F., Mahé, S., Benamouzig, R., Luengo, C., Daré, S., Gaudichon, C., & Tomé, D. (1999). Nutritional value of [15N]-soy protein isolate assessed from ileal digestibility and postprandial protein utilization in humans, *The Journal of Nutrition*, 129, 1992–1997.
- Martínez, O. & Martínez, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición hospitalaria*, 21(2), 1-14.
- Minekus M., Marteau P., Havenaar R. & Huis in't Veld J., (1995). “A multi compartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine.” *ATLA, Zeist, The Netherlands*, 23:197-209.
- Moughan, P. (2003). Amino acid availability: Aspects of chemical analysis and bioassay methodology. *Nutrition Research Reviews*, 16(2), 127-141.
- Moughan, P., Smith, W. & James, K. (1984). Preliminary observations on the use of the rat as a model for the pig in the determination of apparent digestibility of dietary protein. *New Zealand journal of agricultural research*, 27, 509-512.
- Moughan, R. & Nimmo, M. (1984). The influence of variations in muscle fibre composition on muscle strength and cross-sectional area in untrained males.
- Ramón, D., (2016). *Nuevas estrategias en la evaluación de alimentos funcionales* (Web: <http://www.sebbm.es/revista/articulo.php?id=295&url=nuevas-estrategias-en-la-evaluacion-de-alimentos-funcionales#sthash.Gs7WoxIF.dpuf>)
- Savoie, L. (1991). *In vitro* simulation of protein digestion: An integrated approach. En: *In vitro* digestion for pigs and poultry. (Ed. M.F. Fuller). *Commonwealth Agricultural Bureau International*. Slough. p. 135
- Schaafsma G. (2000). The protein digestibility-corrected amino acid score. *Journal of Nutrition*. 130(7).1865S-7S.
- Schulze, K. (2006). Imágenes y modelado de la digestión en el estómago y el duodeno. *Neurogastroenterología y motilidad*, 18, 172 - 183.
- Stein, H. & Bohlke, A. (2007). The effects of thermal treatment of field peas (*Pisum sativum* L.) on nutrient and energy digestibility by growing pigs. *Journal of animal science*, 85, 23-30.
- Vardakou, M., Mercuri, A., Barker, S., Craig, D., Faulks, R. & Wickham, M. (2011). Lograr fuerzas de trituración antral en modelos *in vitro* biorelevantes: comparación del aparato de disolución II de la USP y el modelo gástrico dinámico con datos *in vivo* humanos. *AAPS PharmSciTech*, 12 ( 2), 620 – 626.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D. & Wicher, H. (2015). The Impact of Food Bioactives on Health: *in vitro* and ex vivo models, *Springer International Publishing*, 92: 357– 66
- Viadel, B. 2016 [en línea] actualizado en 2016 Disponible en: <https://www.ainia.es/tecnoalimentalia/tecnologia/nuevos-modelos-de-digestion-in-vitro-para-el-desarrollo-de-alimentos-funcionales-y-farmacos/> [último acceso en 2022]
- Villemejeane, C., Wahl, R., Aymard, P., Denis, S., & Michon, C. (2015). *In vitro* digestion of short-dough biscuits enriched in proteins and/or fibres, using a multi-compartmental and dynamic system (1): viscosity measurement and prediction. *Food chemistry*, 182, 55–63.
- Zhang Q, Abe T, Takahashi, T., & Sasahara, T. (1996). Variations *in vitro* starch digestion of glutinous rice flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2672–2674.