

Evaluación de la digestibilidad in-vitro de aceite de soja y palma para su uso en avicultura

B. JIMENEZ-MOYA^{1*}, D. MARTIN², C. SOLER-RIVAS², A. TRES³, F. GUARDIOLA³, A.C. BARROETA¹, R. SALA¹

¹Facultad de Veterinaria/Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Servicio de Nutrición y Bienestar Animal (SNiBA), Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España; ²Facultad de ciencias, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)/Departamento de Producción y Caracterización de Nuevos Alimentos, Grupo de Ingredientes Alimentarios Funcionales (INGREEN), Universidad Autónoma de Madrid CEI UAM+CSIC, 28049 Cantoblanco, Madrid, España; ³Facultad de Farmacia/ Departamento de Nutrición, Ciencias de la Alimentación y Gastronomía, Grupo Libifood, Universidad de Barcelona, 08028 Barcelona, España.

*Autor corresponsal: beatriz.jimenez@uab.cat

El aceite de soja (S) y el aceite de palma (P) son materias grasas habituales en la formulación de piensos para avicultura, cubriendo una fracción importante de sus necesidades en energía metabolizable y/o de ácidos grasos esenciales. Es por ello por lo que es muy importante evaluar de forma fiable su utilización por parte de los animales. Uno de los principales factores que afectan al valor energético de una grasa es su digestibilidad, comúnmente determinada mediante los clásicos balances de digestibilidad in-vivo. Dichos balances implican un importante coste económico y de tiempo, mientras que el uso de modelos de digestión intestinal in-vitro de las grasas podría constituir una herramienta alternativa o complementaria, útil, económica y rápida para su evaluación. El objetivo del presente estudio es evaluar las diferencias en el proceso de digestión in-vitro entre S (aceite insaturado) y P (aceite saturado) mediante un modelo de digestión intestinal in-vitro. Durante el proceso de digestión se recogieron alícuotas a diferentes tiempos (10, 30 y 60 minutos) para analizar la evolución de los productos de la hidrólisis lipídica. Al final de la digestión (60 minutos), se aislaron diversas fracciones: la fracción oleosa (FO) y la fracción precipitada (FP), por centrifugación para evaluar la composición lipídica de la fracción no bioaccesible y la fracción micelar (FM), mediante cromatografía de exclusión molecular, para determinar los productos lipídicos potencialmente bioaccesibles. Los lípidos de la fracción micelar y precipitada se extrajeron y analizaron por HPLC-RID para obtener el contenido total en triacilglicéridos (TAG), diacilglicéridos (DAG), monoacilglicéridos (MAG) y ácidos grasos libres (AGL). En general, la mayor parte de la hidrólisis tuvo lugar durante los primeros 10 minutos, observándose un rápido descenso de TAG y un aumento de otros productos lipídicos, principalmente AGL. El comportamiento en la evolución de TAG, DAG, MAG y AGL a lo largo de la digestión fue similar entre S y P. Si bien la concentración final en AGL fue similar en ambos aceites, un mayor porcentaje de MAG se obtuvo para S. Dichos resultados fueron similares a los obtenidos en la composición de la fracción micelar (fracción biodisponible). Por otro lado, se observó que la fracción no bioaccesible (FO + FP) fue inferior para S que para P (S: 2,60%; P: 7,83%). La distribución de los productos lipídicos en la FP mostró que en ambos aceites (S y P), los AGL son los que presentan mayor proporción. Por el contrario, la proporción de DAG y MAG fue superior en S, mientras que el % de TAG y AGL en P. Una mayor cantidad de FM junto con una composición micelar más equilibrada y predominante en AGL y MAG, además de un mayor grado de insaturación de los ácidos grasos, podría explicar que S sea una fuente de grasa más bioaccesible y consecuentemente más biodisponible y efectiva que P para uso en alimentación de aves.

Palabras clave: digestibilidad; in-vitro; bioaccesibilidad; grasas; avicultura

Soybean oil (S) and palm oil (P) are useful fats in poultry feed formulation, as they cover an important fraction of their metabolizable energy and essential fatty acids requirements. So, a reliable evaluation of its use by the animal is very important. One of the main factors that affect the energy value of a fat is its digestibility, commonly determined by the classic balances of *in-vivo* digestibility. They imply an important economic and time cost, while the use of models of intestinal *in-vitro* digestion of fats could become a useful, economical and quick tool for its evaluation. The aim of the present study is to evaluate the differences in the *in-vitro* digestion process between S (unsaturated oil) and P (saturated oil) through an *in-vitro* intestinal digestion model. Aliquots of the intestinal digestion were taken at 10, 30 and 60 min of *in vitro* digestion to analyze the evolution of lipid hydrolysis products. After 60 min *in vitro* digestion different fractions were isolated: oily phase (OP) and precipitated phase (PP) by centrifugation to evaluate the lipid composition of the non-bioaccessible fraction and the dietary mixed micelle phase (DMM) by molecular weight exclusion chromatograph to determine the potentially bioaccessible lipid products. The composition in lipid products of DMM and PP was extracted and analyzed by HPLC-RID to obtain the total content in triacylglycerol (TAG), diacylglycerol (DAG), monoacylglycerol (MAG) and free fatty acids (FFA). In general, the larger hydrolysis rate took place during the first 10 min of digestion as there was a faster decrease of TAG and a subsequent increase in other lipid products, mainly FFA. The general evolution behavior of TAG, DAG, MAG and FFA over the digestion was similar between S and P. Although a similar final concentration in FFA was observed in both oils, a higher percentage of MAG was obtained for S. These results were similar to the ones obtained in DMM composition (bioavailable fraction). In the other hand, a lower non-bioaccessible fraction (OP + PP) was observed in S than P (S: 2.60%; P: 7.83%). The lipid products distribution in PP showed in both oils (S and P) that FFA was presented in larger proportion. In contrast, the proportion of DAG and MAG was higher in S, whereas the percentage of TAG and FFA was in P. A higher amount of DMM together with more balanced micellar composition and predominant in FFA and MAG, moreover a higher unsaturated degree of fatty acids might explain that S is a fat source more bioaccessible and consequently more bioavailable and effective than P in order to use in poultry feeding.

Keywords: digestibility; *in vitro*; bioaccessibility; fats; poultry

Introducción

Las grasas son ingredientes habituales en la formulación de piensos para avicultura dado su alto valor energético y su aporte en ácidos grasos esenciales. Uno de los principales factores que afectan al valor energético de una grasa es su digestibilidad. Es por ello que el estudio y conocimiento de los procesos de digestión y absorción de las materias grasas incorporadas en la dieta por parte del animal resulta de gran interés. La metodología comúnmente utilizada son los clásicos balances de digestibilidad *in-vivo* que conllevan el uso de animales y, muy frecuentemente, su sacrificio (Vilarrasa et al., 2014; Ravindran et al., 2016). Dichos balances van asociados a un elevado coste económico y de tiempo y sujetos a cierto grado de variabilidad inter-individual. Consecuentemente, existe gran interés en el desarrollo de herramientas útiles para la valoración de las materias grasas previa a su utilización *in-vivo*. Los ensayos de digestibilidad *in-vitro*, utilizados comúnmente en el ámbito de alimentación humana, presentan la ventaja de no utilizar animales, siendo métodos normalmente más rápidos y de menor coste económico. Así mismo permiten profundizar en los mecanismos físico-químicos que determinan su bioaccessibilidad. El objetivo del presente estudio es evaluar el proceso de hidrólisis y la bioaccessibilidad de dos grasas con distinto grado de insaturación, habitualmente utilizadas en alimentación aviar. Ello permitirá una mayor comprensión de los procesos implicados en la digestión y absorción de las grasas y, por consiguiente, de las diferencias en digestibilidad *in-vivo*.

Material y métodos

Reactivos y materiales

El aceite de soja (S, insaturado) se adquirió de R.I.O.S.A (Linares-Baeza, España) y el aceite de palma (P, saturado) de Lipidos Santiga S.A. (Santa Perpetua de Mogoda, Barcelona, España), ambos objeto de estudio, se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Trizma, ácido maleico, pancreatina porcina, sales biliares y lecitina de yema de huevo se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Sodio sulfato anhidro, cloruro de sodio y cloruro de calcio de Panreac (Barcelona, España). Todos los disolventes utilizados para el HPLC-RID se obtuvieron de Scharlab (Sentmenat, Barcelona, España).

Digestión lipídica in vitro

El modelo de digestión *in-vitro* se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Martin et al., (2014) con algunas modificaciones. Básicamente, una muestra de 0,5 g de grasa fue dispersada en 27 mL de Trizma-maleato de 0,1 M a pH 7,5 (tampón) a 37°C. Para simular la secreción biliar se incorporó a la mezcla 0,1 g de lecitina, 0,25 g de sales biliares, 0,5 mL de solución de CaCl₂ a 325mM y 1,5 mL de solución de NaCl a 3,25 mM. La mezcla se pre-emulsificó y homogenizó durante 2 min a 3500 rpm. La simulación de la digestión intestinal se inició con la adición de extracto fresco de pancreatina (0,5 g de pancreatina porcina en 3 mL de tampón Trizma-maleato). La mezcla se mantuvo durante 60 minutos en un incubador orbital a 37°C en constante agitación a 200 rpm. Con el objetivo de estudiar la evolución de los productos lipídicos a lo largo del proceso hidrolítico, se recogieron alícuotas (450 µl) por duplicado a 10, 30 y 60 min de digestión. La digestión *in-vitro* de cada aceite se realizó por triplicado.

Aislamiento de la fracción de micelas mixtas de la dieta

Se realizó una separación de las micelas mixtas de la dieta (DMM) de vesículas, otras gotas lipídicas y el resto de productos de la fracción hidro-solubles. Se llevó a cabo en una columna de Sepharose®4B (Sigma-Aldrich, Madrid, España) utilizando una fase móvil 0,5 M de NaCl y sales biliares (Sigma) según Gil-Ramírez et al., (2014). Para ello, la solución resultante posterior a los 60 min de digestión se pasó por un papel de filtro para eliminar las partículas aglomeradas. De la solución filtrada, se recogió 5 mL y se incorporaron en la columna junto con la fase móvil. La fracción correspondiente a DMM se recogió en forma de pool (20 mL) y posteriormente se analizó la composición lipídica.

Separación de fases tras la digestión lipídica in-vitro

Se realizó otra digestión con el fin de obtener distintas fases de acuerdo a Soler-Rivas et al. (2010). Para ello, después de 60 minutos de digestión, el medio se centrifugó a 4000 rpm durante 40 min a 37°C. Tras la centrifugación se obtuvieron 3 fases, una fase superior oleosa (FO), una fase media acuosa micelar (FM) y una fase inferior precipitada (FP). En el caso de la FP se procedió al análisis de la composición lipídica. La digestión *in-vitro* para la separación de fases de cada aceite se realizó por duplicado.

Extracción lipídica

Los lípidos totales de las muestras se extrajeron mediante hexano:metil tert-butil éter (50:50, v/v) a una ratio de 3:1 (v/v) de disolvente respecto muestra (Martin et al., 2014). La mezcla se agitó durante 1 min y se centrifugó durante 10 min a 15000 rpm para las alícuotas a diferentes tiempos de digestión y a 4000 rpm para DMM y FP. Se llevó a cabo una segunda extracción con cloroformo:metanol (2:1, v/v) a una ratio de 3:1 (v/v) de disolvente respecto muestra. Las dos fases orgánicas obtenidas post centrifugación se recogieron y se les añadió sodio sulfato anhidro.

Análisis de productos lipídicos

La composición lipídica (TAG: Triacilglicéridos, DAG: Diacilglicéridos, MAG: Monoacilglicéridos, AGL: ácidos grasos libres) de cada muestra lipídica extraída de las alícuotas a diferentes tiempos (10, 30, 60 min), de las DMM y de la FP se determinó según la ISO 18395:2005 por cromatografía líquida de alta eficacia Agilent 1100 equipado con un detector de índice de refracción (HPLC-RID) a 35°C. En cada una de las muestras extraídas se añadió 1 mL de tetrahidrofurano (THF), se homogeneizó y filtro a través de un filtro de nylon (0,45 µm) y se inyectó 100 µl (20 µl loop) en el cromatógrafo equipado con dos columnas Styragel (Phenogel HR1 y Stiragel HR 0.5) de 30 cm x 0,78 cm i.d., rellenas de partículas esféricas de copolímero styrenedivinilbenzeno, con un tamaño de partícula de 5 µm (Water Associates, Milford, MA, USA), conectadas en serie y ubicadas en un horno a 35°C. La fase móvil consistió en 1 mL/min de THF. El tiempo 0 minutos se corresponde a la composición en productos lipídicos de los aceites S y P.

Análisis estadístico

Se comprobó la normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza. Los datos de Nivel de Lipólisis post-digestión se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, mediante el programa R (versión 3.3.2; 2016). Se considera que las diferencias son significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Evolución de productos lipídicos

En la *Figura 1* se muestra la evolución de los productos lipídicos (TAG, DAG, MAG y AGL) generados tras la hidrólisis de S y P. En ambas grasas, los TAG son los productos lipídicos mayoritarios al inicio de la digestión. En general, a lo largo del tiempo de digestión se observó un descenso de TAG y paralelamente un aumento de AGL y en menor medida de MAG y DAG.

La mayor parte de la hidrólisis tuvo lugar en los primeros 10 minutos, donde los TAG se hidrolizaron, pasando al inicio de la digestión del 80 % (S) y 95 % (P), al 20 %. Los AGL, minoritarios al inicio de la digestión (S: 1%; P: 6%) llegaron a representar un 55 % de los productos lipídicos. Tanto los MAG como los DAG, constituyeron alrededor de un 10 % del total de los productos lipídicos.

Entre los 10 y los 60 minutos, la grasa continuó hidrolizándose pero con una tasa inferior. Al final de la digestión (60 min), los TAG representaron el 12 % (S) y el 8 % (P) de los productos lipídicos, lo que supuso una disminución de un 10 % respecto a los 10 minutos). Los AGL, por su parte, incrementaron en un 2,5 % para S y de un 8 % para P.

El hecho de que la mayor parte de la hidrólisis tenga lugar principalmente en los primeros 10 minutos concuerda con los resultados obtenidos por Martin et al. (2014) en aceite de oliva, y se ha relacionado con un proceso de saturación las micelas mixtas (Sek et al., 2002). Pese a que el comportamiento general de hidrólisis que se observó fue similar para ambas grasas, se obtuvieron algunas diferencias al final de la digestión. S presentó un mayor porcentaje de MAG (S: 17,2 %; P: 12,8 %) y menor de DAG (S: 8,9 %; P: 13,6 %) que P. La presencia de un mayor porcentaje de MAG en S podría mejorar la absorción de las grasas ya que facilitan la absorción de otros AGL (Ravindran et al., 2016).

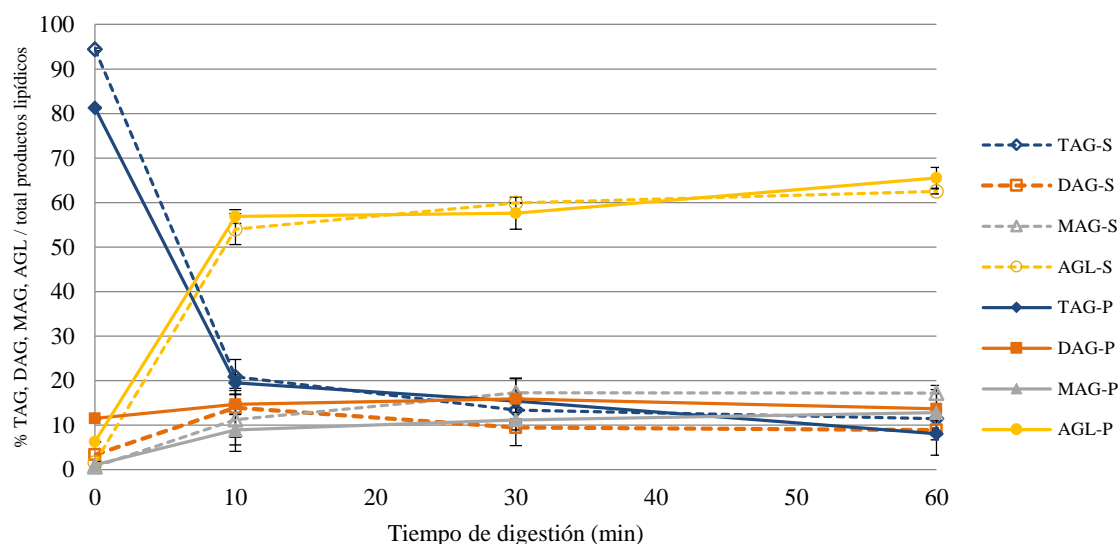


Figura 1. Evolución de productos lipídicos (% productos lipídicos/total productos lipídicos) durante la digestión intestinal *in-vitro* de S (aceite de soja) y P (aceite de palma). TAG (triacilglicéridos), DAG (diacilglicéridos), MAG (monoacilglicéridos), AGL (ácidos grasos libres). Los datos se presentan como valores medios (n = 3) ± desviación estándar.

La absorción de las grasas requiere la conversión de TAG y DAG en AGL y MAG como productos finales de la hidrólisis potencialmente absorbibles. Con el fin de comparar los productos lipídicos potencialmente absorbibles por parte del animal, se estimó el Nivel de Lipólisis (L%) de cada grasa objeto de estudio según Carrière et al. (2001). Para ello, se aplicó la fórmula siguiente: $L\% = 100 \times (AGL + MAG) / (3 \times TAG + 2 \times DAG + MAG + AGL)$, teniendo en cuenta que de un TAG podemos obtener 1 DAG + 2 AGL y de un DAG, 1 MAG + 1 AGL. Antes de la digestión, el % mol AGL+MAG era muy bajo para ambas grasas, si bien en S era menor que en P (Figura 2). No obstante, no se obtuvieron diferencias en L% al final de la digestión (60 min), indicando que la cantidad de productos potencialmente absorbibles es igual en S y P.

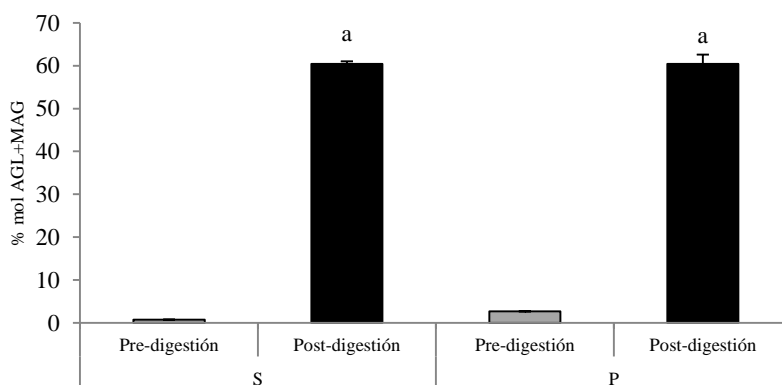


Figura 2. Nivel de lipólisis (L%) estimado como productos lipídicos potencialmente absorbibles (% mol AGL+MAG) según Carrière et al. (2001) en Pre-digestión y Post-digestión (60 minutos) de S (aceite de soja) y P (aceite de palma). “Post-digestión”: diferentes letras sobre las barras marcan diferencias significativas (p < 0,05); los datos se presentan como valores medios (n = 3) ± desviación estándar.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias claras en cuanto al proceso de hidrólisis *in-vitro* entre las dos fuentes grasas (S, aceite insaturado y P, aceite saturado), pese a estar descrito que la actividad de la lipasa se ve influenciada por el grado de saturación, presentando las grasas saturadas una mayor complejidad en la unión con la lipasa pancreática (Vankuiken & Behnke, 1994), y por consiguiente dificultad en su hidrólisis.

Bioaccesibilidad de productos lipídicos

La bioaccesibilidad de cada una de las grasas se estudió en base a la FO (fase oleosa), FM (fase micelar) y FP (fase precipitada), con ello se pretende realizar una aproximación sobre la utilidad que tendrían estos aceites por parte del animal (Figura 3). Tras 60 min de digestión, la FO, fase que corresponde a la grasa no digerida, es prácticamente inexistente (0,1 %) en ambas grasas. Por el contrario, la FM es la fase mayoritaria. En esta fase es donde se encuentran las sales biliares junto con los productos lipídicos generados tras la digestión, principalmente MAG y AGL formando micelas mixtas, micelas, vesículas o gotas lipídicas (Fatouros et al., 2007), siendo pues considerada como la fase potencialmente bioaccesible. Los resultados mostraron que tanto S como P son grasas con una elevada bioaccesibilidad (FM > 90 %), si bien S presentó una FM mayor frente a P (S: 97,4 %; P: 92,17 %) y una menor fracción no bioaccesible (FP) (S: 2,50 %; P: 7,69 %).

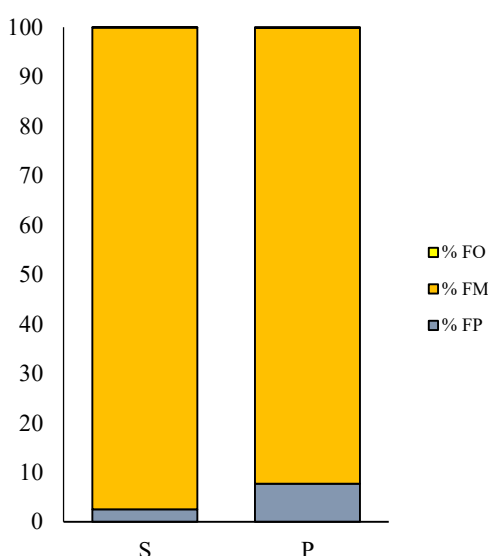


Figura. 3. Porcentaje de las fases aisladas tras 60 min de digestión intestinal *in-vitro* de S (aceite de soja) y P (aceite de palma). FO (Fase Oleosa), FM (Fase Micelar), FP (Fase Precipitada). Los datos se presentan como valores medios (n = 2).

El análisis de las fracciones lipídicas de las micelas mixtas (DMM, contiene los productos lipídicos potencialmente absorbibles) presentes en la FM (fase bioaccesible) y de la FP (fase no bioaccesible) se presentan en la Figura 4. La grasa recuperada correspondiente a la fracción de micelas mixtas (DMM) en S (46,3 mg) fue mayor que en P (23,0 mg) (Figura 4a). No obstante, la composición en productos lipídicos expresados en porcentaje, fue similar en ambas grasas para AGL (S: 64,9 %; P: 61,9 %), MAG (S: 26,2 %; P: 25,2 %), TAG (S: 0,9 %; P: 1,8 %) y DAG (S: 7,8 %; P: 10,8 %). En cuanto a la FP (Figura 4b), se observó que la cantidad de grasa recuperada fue menor en S (46,9 mg) que P (141,4 mg). En cuanto a las fracciones lipídicas de la FP, S presentó menor porcentaje de TAG (S: 4,9 %; P: 13,6 %) y de AGL (S: 66,7 %; P: 73,0 %) que P, en cambio un mayor porcentaje de DAG y MAG (un 5,6 % y un 9,4 % más).

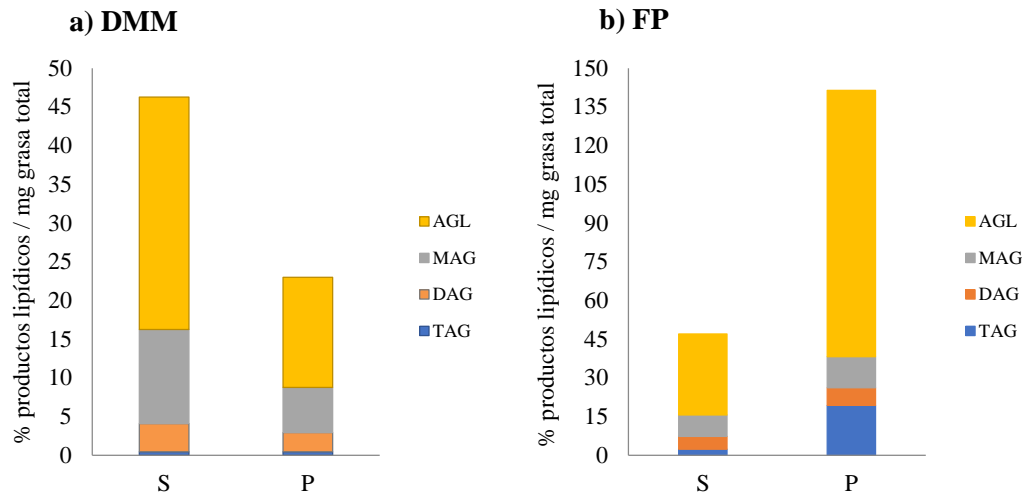


Figura. 4. Distribución de los productos lipídicos (% productos lipídicos / mg grasa total recuperada) a lo largo de a) micelas mixtas (DMM) de la FM y b) FP en S (aceite de soja) y P (aceite de palma). Los datos se presentan como valores medios (n = 2).

Los resultados observados en la *Figura 3* y *4* indican que ambas grasas son muy bioaccesibles, aunque S en mayor medida que P. Sin embargo, el mayor porcentaje de FM, junto con una mayor cantidad de grasa formando parte de las DMM indicarían una mayor bioaccesibilidad y consecuentemente mayor biodisponibilidad de S respecto a P. Esto podría explicarse por el grado de saturación que presenta cada grasa, ya que las grasas insaturadas (S) forman las micelas mixtas con mucha más facilidad que las grasas saturadas (P) (Freeman, 1969). Por el contrario, P presentó más grasa precipitada, posiblemente debido al punto de fusión más elevado en P que S (Small, 1991).

Según los resultados obtenidos en este estudio preliminar de digestión intestinal *in-vitro*, S y P no parecen tener diferencias importantes en cuanto al proceso de hidrólisis, pero sí presentan diferencias en cuanto a la bioaccesibilidad, relacionada directamente con la absorción de estas grasas por parte del animal. Tancharoenrat et al., (2014) y Vilarrasa et al., (2014), coincidieron en que las grasas insaturadas presentaron mayor digestibilidad que las grasas saturadas estudiadas en pollos broilers. Sería necesario establecer una correlación entre los resultados obtenidos *in-vitro* y los obtenidos en estudios *in-vivo*, que permita asegurar que los resultados extraídos de un modelo *in-vitro* reflejaran los que se obtendrían en un estudio *in-vivo*, de manera que los ensayos *in-vitro* sirvieran como modelos de predicción del uso de las grasas en avicultura. No obstante, hay que tener en cuenta que la simulación de los procesos fisicoquímicos y fisiológicos del tracto digestivo de las aves puede resultar más compleja que en humanos ya que la digestión y velocidad de paso a través del tracto intestinal de las aves no es unidireccional, debido a los movimientos de retroceso (Angel et al., 2013).

Agradecimientos

El presente estudio ha sido financiado, en parte, por una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) concedida por el *Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España* y por el proyecto (CICYT AGL2015-64431-C2-1-R) concedido por la *Comisión Interministerial de Ciencias y Tecnología de España* del *Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España*.

Referencias bibliográficas

- ANGEL, R., KIM, S. W., LI, W., and JIMENEZ-MORENO, E. (2013). Velocidad de paso y pH intestinal en aves: implicaciones para la digestión y el uso de enzimas. *XXIX Curso de Especialización FEDNA*
- CARRIÈRE, F., RENO, C., RANSAC, S., LOPEZ, V., DE CARO, J., FERRATO, F., DE CARO, A., FLEURY, A., SANWALD-DUCRAY, P., LENGSELD, H., BEGLINGER, C., HARVARY, P., VERGER, R., and LAUGIER, R. (2001). Inhibition of gastrointestinal lipolysis by Orlistat during digestion of test meals in healthy volunteers. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **281**, 16–28.
- SOLER-RIVAS, C., R. MARIN, F., SANTOYO, S., GARCÍA-RISCO, M. R., JAVIER SEÑORÁNS, F. J., and REGLERO, G. (2010). Testing and enhancing the in vitro bioaccessibility and bioavailability of rosmarinus officinalis extracts with a high level of antioxidant abietanes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**: 1144-1152
- FATOUROS, D. G., BERGENSTAHL, B., and MULLERTZ, A. (2007). Morphological observations on a lipid-based drug delivery system during in vitro digestion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **31**, 85–94.
- GIL-RAMÍREZ, A., RUIZ-RODRÍGUEZ, A., MARÍN, F. R., REGLERO, G., & SOLER-RIVAS, C. (2014). Effect of ergosterol-enriched extracts obtained from *Agaricus bisporus* on cholesterol absorption using an in vitro digestion model. *Journal of Functional Foods*. **11**: 589-597.
- MARTIN, D., MORAN-VALERO, M. I., VÁZQUEZ, L., REGLERO, G., & TORRES, C. F. (2014). Comparative in vitro intestinal digestion of 1,3-diglyceride and 1-monoglyceride rich oils and their mixtures. *Food Research International*. **64**: 603-609.
- RAVINDRAN, V., TANCHAROENRAT, P., ZAEFARIAN, F., & RAVINDRAN, G. (2016). Fats in poultry nutrition: Digestive physiology and factors influencing their utilisation. *Animal Feed Science and Technology*. **213**. 1-21.
- SEK, L., PORTER, C. J. H., KAUKONEN, A. M., & CHARMAN, W. N. (2002). Evaluation of the in-vitro digestion profiles of long and medium chain glycerides and the phase behaviour of their lipolytic products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **54**: 29-41.
- SMALL, D. M. (1991). Structure on Absorption and Metabolism. *Annual Review of Nutrition*. **11**: 413-434
- TANCHAROENRAT, P., RAVINDRAN, V., ZAEFARIAN, F., & RAVINDRAN, G. (2014). Digestion of fat and fatty acids along the gastrointestinal tract of broiler chickens, *Poultry Science*. **93**: 371–379.
- VANKUIKEN, B. A., & BEHNKE, W. D. (1994). The Activation of Porcine Pancreatic Lipase by Cis-Unsaturated Fatty-Acids. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, **1214**, 148–160.
- VILARRASA, E., TRES, A., BAYÉS-GARCÍA, L., PARELLA, T., ESTEVE-GARCIA, E., & BARROETA, A. C. (2014). Re-esterified palm oils, compared to native palm oil, do not alter fat absorption, postprandial lipemia or growth performance in broiler chicks. *Lipids*. **49**: 795-805.