# UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



# ESTANDARIZACION DE METODOLOGIA pH-STAT PARA EVALUACION DE DIGESTION DE LIPIDOS EN PRESENCIA DE HARINAS VEGETALES: EVALUACION DEL EFECTO DEL PROCESAMIENTO DE MATERIAS PRIMAS VEGETALES

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al Título de Biotecnólogo.

MARIA JOSE SPULER FIGUEROA TEMUCO – CHILE 2012

# UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



# ESTANDARIZACION DE METODOLOGIA pH-STAT PARA EVALUACION DE DIGESTION DE LIPIDOS EN PRESENCIA DE HARINAS VEGETALES: EVALUACION DEL EFECTO DEL PROCESAMIENTO DE MATERIAS PRIMAS VEGETALES

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al Título de Biotecnólogo.

MARIA JOSE SPULER FIGUEROA PROFESOR GUIA: DRA. MARÍA CAROLINA SHENE DE VIDTS TEMUCO – CHILE 2012 ESTANDARIZACION DE METODOLOGIA pH-STAT PARA EVALUACION DE DIGESTION DE LIPIDOS EN PRESENCIA DE HARINAS VEGETALES: EVALUACION DEL EFECTO DEL PROCESAMIENTO DE MATERIAS PRIMAS VEGETALES

PROFESOR GUIA	: DRA. MARÍA CAROLINA SHENE DE VIDTS INGENIERO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA DEPARTAMENTO INGENIERIA QUÍMICA.
PROFESOR CONSEJERA	: DRA. CLAUDIA LORENA RABERT PINILLA INGENIERO AGRÓNOMO DEPARTAMENTO INGENIERIA QUÍMICA.
CALIFICACION PROMEDIO TESIS	:

Dedicada primero que todo a mi madre y hermana, que son mi fuerza y razón de vivir, a mi mamá por ser un ejemplo de esfuerzo y lucha constante, a mi nanita por su compañía, ayuda y amor. A mi papito, que desde el cielo nos cuida y observa con orgullo.

#### **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi estimada profesora Dra. Carolina Shene, por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis con ella, por guiarme, por su paciencia y sobre todo por su calidad humana.

A mis compañeros de laboratorio, por enseñarme tanto y por hacer los días de trabajo más amenos, en especial a la Dra. Claudia Rabert, por ser mi co-tutora.

Gracias también a mis queridas amigas, que me apoyaron en los momentos difíciles y me permitieron entrar en su vida durante estos años de Universidad.

A Dios por sobre todo, por llevarme siempre al lugar correcto y con las personas adecuadas y por darme la fuerza y salud para alcanzar mis objetivos.

Finalmente agradezco a todas las personas que se cruzaron en este camino y que de alguna forma me dieron ánimo y aliento para salir adelante, en especial a ti Seba.

Muchas gracias a todos.

# **INDICE**

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
1.1	Hipótesis	4
1.2	Objetivos	4
1.2.1	Objetivos general	4
1.2.2	Objetivos específicos	4
2	ANTECEDENTES GENERALES	6
2.1	Lípidos	6
2.2	Digestión de los lípidos y función de las sales biliares (SB)	7
2.3	Lipasas y el fenómeno de la activación interfacial	10
2.4	Método pH-Stat, cuantificación de actividad de lipasa	13
2.5	Estudio de la actividad lipásica con tributirina como sustrato	16
2.6	Proteínas vegetales	18
2.7	Extrusión de alimentos	21
2.8	Inestabilidad de emulsiones	22
3	MATERIALES Y METODOS	26
3.1	Materiales	26
3.1.1	Reactivos y material de laboratorio	26
3.1.2	Equipos e instrumentos	27
3.2	Metodología	27
3.2.1	Preparación de materias primas	27
3.2.2	Análisis proximal de las materias primas	28
3.2.3	Soluciones utilizadas	29
3.2.4	Determinación del grado de hidrolisis por pH-Stat	29
3.2.5	Preparación de la emulsión	30

3.2.6	Ensayo de actividad	30
3.2.7	Cálculo de la actividad enzimática	31
3.2.8	Determinación del tamaño de gota de las emulsiones	32
3.2.9	Determinación de la capacidad emulsificante (CE)	33
3.3.0	Determinación del índice de actividad emulsionante (IAE) e índice de la estabilidad de las emulsiones (IEE)	33
3.3.1	Análisis estadístico de los resultados	35
4	RESULTADOS Y DISCUCION	36
4.1	Estandarización de la metodología in vitro para evaluar la digestibilidad de lípidos	36
4.2	Efecto de las materias primas vegetales en la digestión de lípidos	46
4.2.1	Composición proximal de las muestras evaluadas	46
5	CONCLUSIONES	65
6	PERSPECTIVAS	68
7	LITERATURA CITADA	70

#### RESUMEN

La comprensión de los mecanismos involucrados en la digestión de los lípidos tiene varias aplicaciones; entre éstas se encuentran el diseño de técnicas destinadas a suministrar fármacos y drogas, o compuestos bioactivos los que deben alcanzar sitios específicos en el tracto intestinal de humanos y animales. Además, la posibilidad de controlar el nivel de absorción de los altos niveles de grasas y aceites en la dieta, como una forma de reducir o controlar la obesidad, posee enormes perspectivas comerciales. En las evaluaciones preliminares de una determinada materia prima es casi imposible utilizar seres vivos para estos fines dado el alto costo de la implementación de estos ensayos.

El método de pH-Stat ha sido usado para la caracterización de la digestión de lípidos por varios autores. La técnica se basa en la cuantificación de los ácidos grasos libres generados a partir de lípidos (triacílgliceroles, TG) por lipasas, bajo condiciones constantes de pH. Para este fin, el pH utilizado para evaluar la actividad de la lipasa pancreática (LP) se encuentra en el rango neutral (7,0) lo que prevalece en el intestino. Para simular lo que ocurre en el tracto digestivo, el medio de reacción debe contener además concentraciones adecuadas de sales biliares, y minerales.

Esta metodología puede utilizarse para evaluar el efecto de distintos factores que inciden en la actividad de la enzima. Ejemplos son: tipo de lípido (grado de instauración y longitud de la cadena de los ácidos grasos que constituyen los TG, estado sólido para grasas, líquido en lípidos), características de la emulsión (tamaño de gota, concentración de los lípidos emulsionados, concentración y propiedades de los estabilizantes de la emulsión) ya que la lipasa actúa en una interfase lípido-agua, concentración de sales biliares. La composición de la fase acuosa (polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, etc.) es otro factor a considerar, dado que los compuestos

anfifílicos pueden orientarse y distribuirse en la interfase lípido-agua e impedir la adsorción de la enzima.

En este trabajo se usó esta técnica para evaluar el efecto de materias primas vegetales utilizadas principalmente como fuente de proteínas, en alimentación animal, en la digestión de lípidos.

Las condiciones del ensayo (concentración de sales biliares, lípidos, enzima, y sales minerales) para evaluar la digestión de lípidos fueron estandarizadas. Se evaluó el efecto de la concentración de tres materias primas; linaza, lupino y soya, estableciéndose además el efecto de su procesamiento a través de la extrusión. Según los resultados obtenidos en este trabajo se determinó que algunos materiales vegetales se comportaban como inhibidores significativos (p<0,05) de la actividad enzimática. La linaza presenta características de inhibición de la actividad de la LP, específicamente la fracción extruida (48%), seguida del lupino que arrojó buenos resultados también (42%). Estos materiales vegetales representarían una alternativa tecnológica de menor costo en tratamientos contra la obesidad, dirigido a la formulación de dietas especiales para personas con problemas nutricionales.

La soya en cambio, mostró tanto características inhibitorias como potenciadoras de la actividad de la LP, con concentraciones mayores se incrementa la actividad de la enzima en un 18% aproximadamente, por lo que es complicado pronosticar el efecto que este material vegetal tendría en la alimentación.

Se observó que el proceso de extrusión afecta la actividad de la enzima dependiendo de la harina experimentada, para la linaza el tratamiento térmico representó un efecto positivo en la

actividad de la LP, sin embargo, para lupino y soya, la extrusión resultó ser un factor con incidencia negativa.

#### **SUMMARY**

The understanding of mechanism involved in the digestion of lipids has several applications and enormous commercial potential; among these are the designs of drugs for delivering of bioactive compounds that bind specific sites in intestinal tract of humans or animals. Furthermore, modulate fats and oils absorption could be a method for the obesity control. It is almost impossible to implement preliminary assay in living creatures due to high implementation cost.

The pH-Stat method has been used for the characterization of lipid digestion by several authors. The technique is based on the quantification of free fatty acids generated from lipids (triglycerides, TG) by lipases, under constant conditions of pH. To this end, the pH used to evaluate the activity of pancreatic lipase (PL) is in a neutral range (7.0) a condition that prevails in the intestine. To simulate what happens in the digestive tract, the reaction medium should also contain adequate concentrations of bile salts and minerals.

This methodology can be used to evaluate the effect of different factors on enzyme activity for example: type of lipid (degree of instauration and chain length of fatty acids, constituting triglycerides, fats solid state, liquid lipid), emulsion characteristics (droplet size, concentration of emulsified lipids, concentration and properties of emulsion stabilizers) and bile salt concentration because lipase behavior in a lipid-water interface is strongly dependent on this. The aqueous phase composition (polysaccharides, proteins, phospholipids, etc.) is another factor to consider, as the amphiphilic compounds can be distributed in the lipid-water interface and prevent adsorption of the enzyme. In this work this methodology was used to evaluate the effect of vegetal meals used mainly as a protein source in animal feed for the digestion of lipids.

Conditions (concentration of bile salts, lipids, enzymes, and minerals) of the assay to assess lipid digestion were standardized. The effect of the concentration of meals formulated with three raw materials, flaxseed, lupin, and soybeans were also evaluated establishing the effect of extrusion process on lipase activity. According to the results obtained in this study some vegetal materials has a significant inhibition effect (p <0.05) on enzyme activity. Flaxseed inhibited pancreatic lipase activity, specifically the extruded fraction (48%), followed by lupin (42%). These vegetal meals are lower cost alternative that could be used for formulating special diets for the control of obesity.

Soybean however, showed both inhibitory and intensified effect on enzyme activity; at the higher concentration of soybean tested the activity of the PL was increased by about 18%. The effect of extrusion process depend of meal used, heat treated-flaxseed has a positive effect on PL activity. However, for lupine and soybean-meal extrusion effect on PL activity was negative.

# 1. INTRODUCCIÓN

La calidad nutricional de un alimento no se puede predecir completamente a partir de su composición química. La digestibilidad, absorción y utilización (biodisponibilidad) son parámetros que también deben ser considerados (Marable y Sanzone, 1981). La digestibilidad de los distintos nutrientes de los alimentos ha sido extensamente estudiada *in vivo*; sin embargo estos experimentos requieren de largos periodos de tiempo, generalmente son caros, laboriosos y los resultados pueden ser afectados por diversos factores ambientales y metodológicos (Biswas *et al.*, 2007). Actualmente, se ha dado énfasis al desarrollo de métodos *in vitro* que permitan obtener resultados reproducibles, confiables, en tiempos y costos razonables.

Existen distintas metodologías para evaluar la digestibilidad *in vitro*, las cuales varían en el tipo de enzimas empleadas, las condiciones de hidrólisis, y la forma de cuantificar los productos generados por la digestión. La mayoría de ellos tratan de reproducir el ambiente bioquímico y fisiológico (pH, temperatura, tiempo de residencia intestinal, composición enzimática) presente en el tracto gastrointestinal del organismo bajo estudio (Moyano y Savoie, 2001).

En el último tiempo se ha observado un creciente interés en entender y controlar la digestibilidad de los lípidos en el tracto intestinal humano, para el desarrollo de alimentos funcionales, control de la obesidad, y el desarrollo de productos farmacéuticos. La influencia de la microestructura y composición del producto sobre la digestibilidad de los lípidos se suele estudiar con métodos *in vitro*.

Una mejor comprensión de los factores que impactan la biodisponibilidad de los lípidos de la dieta le permitiría a la industria de alimentos diseñarlos para aumentar, disminuir o controlar la digestión y adsorción de los lípidos en el tracto gastrointestinal humano (McClements *et al.*, 2007).

Los lípidos son componentes importantes de la dieta; representan la principal fuente de energía, son fundamentales en la formación de estructuras celulares como las membranas, precursores para la síntesis de hormonas, proveen de ácidos grasos esenciales necesarios para la síntesis de los eicosanoides y de otros derivados bioactivos; constituyen además un vehículo para suministrar vitaminas liposolubles. Organolépticamente aportan la palatabilidad y el sabor de las comidas además de ser los componentes más importantes en la saciedad post-prandial que producen los alimentos.

La mayor parte de la digestión de lípidos ocurre en el intestino delgado (Carriere *et al.*, 1993), y se lleva a cabo por la lipasa pancreática (LP) que actúa sobre sustratos insolubles que se encuentran en emulsiones.

La adsorción de la lipasa en la interfase aceite / agua modifica la estructura de la enzima permitiendo su actividad catalítica. La composición de la fase acuosa y la de la interfaz, determinarán la velocidad de la reacción enzimática en varias formas.

En el proceso digestivo, la composición de la fase acuosa y la interfase depende de la composición de la dieta ingerida (proteínas, polisacáridos, entre otros). Pruebas de digestibilidad han proporcionado estimaciones de la proporción de nutrientes que pueden ser absorbidas por el sistema digestivo.

Por otro lado, ha aumentado el interés en sustituir ingredientes artificiales por otros naturales, en parte debido al mayor grado de conocimiento de los consumidores. En este sentido, el uso de proteínas vegetales como agentes funcionales podría ser muy favorable para la industria alimentaria. Las proteínas son uno de los polímeros más importantes utilizados como ingredientes en emulsiones alimentarias, ya que tienen la propiedad de estabilizar las emulsiones.

La capacidad de las proteínas para actuar como surfactantes y estabilizar emulsiones depende de su capacidad para adsorberse en las interfaces aceite/agua, reduciendo en gran medida la tensión interfacial, formando una película cohesiva.

El método del pH-Stat ha sido sugerido como una metodología *in vitro* alternativa para evaluar la digestibilidad de los lípidos y las proteínas. El método se basa en la cuantificación de los ácidos grasos libres (AGL) formados a partir de los TGs en la presencia de la enzima manteniendo un pH constante. La pendiente inicial del volumen de base añadido para neutralizar los AGL en función del tiempo es una medida directa de la actividad de la enzima.

El presente trabajo fue realizado en el marco de los objetivos del proyecto Fondecyt 1100320.

De acuerdo a lo fundamentado anteriormente se postuló la siguiente hipótesis definiendo los objetivos mencionados a continuación.

## 1.1 Hipótesis

 El tratamiento térmico y la concentración de las materias primas vegetales evaluadas, afecta la actividad de la lipasa pancreática en el modelo in vitro de digestión de lípidos.

## 1.2 Objetivos

## 1.2.1 Objetivo general

• Definir las condiciones para evaluar la digestión de lípidos en presencia de materias primas vegetales utilizadas como fuente de proteína a través de la metodología pH-Stat.

## 1.2.2 Objetivos específicos.

- Determinar el efecto de las variables (concentración de sales biliares, enzima, lípidos, sales) en evaluación de la digestión de lípidos a través del método del pH-Stat.
- Evaluar el efecto de la concentración de harinas vegetales y del proceso térmico en la digestión lipídica usando las condiciones estandarizadas para la metodología.

• Evaluar materias primas vegetales como posibles fuentes de compuestos inhibidores o potenciadores de la actividad de la lipasa pancreática.

## 2. ANTECEDENTES GENERALES.

**2.1. Lípidos.** Los lípidos son una fuente importante de energía metabólica, aportando 9,5 kcal/g (Tacon, 1989; Madrid, 1994), mientras que las proteínas y carbohidratos solo aportan 4 kcal/g (Madrid, 1994). El mayor componente lipídico, alrededor del 95%, en la dieta humana son los triglicéridos (TG). Los TG se componen de tres ácidos grasos esterificados con un esqueleto de glicerol (Figura 1); los TG no pueden ser absorbidos directamente por los enterocitos en el intestino, y necesitan ser previamente hidrolizados (Hofmann y Borgström, 1962; 1964).

Un 15% de la digestión de las grasas/lípidos ocurre en el estómago; la mayor parte de ésta se produce en el intestino delgado (Carriere *et al.*, 1994). Otra función importante de los lípidos en el metabolismo es que favorecen la absorción del calcio y son el vehículo de transporte para vitaminas liposolubles (A, D, K y E) (Madrid, 1994).

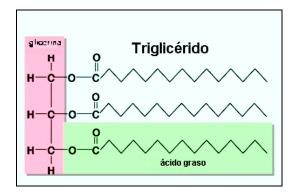


Figura 1. Fórmula general de un triacílglicerol.

2.2. Digestión de los lípidos y función de las sales biliares (SB). La digestión de los lípidos es un proceso complejo que ocurre en la cavidad bucal, gástrica, e intestinal del ser humano y otros animales. Debido a la naturaleza de la catálisis lipídica (Reis *et al.*, 2010), donde las sustancias que interactúan se encuentran en fases inmiscibles, es necesario que se cumplan ciertas condiciones para lograr la digestión. Las características de polaridad de los lípidos los hacen insolubles tanto en los contenidos del lumen como en la linfa y la sangre hacia donde deben ser transportados después de la absorción intestinal (Berne y Levy, 2001). Es por ello que el proceso de hidrólisis de los TG requiere de la participación de enzimas lipolíticas, denominadas lipasas, cofactores, hormonas y SB.

El primer paso para la digestión de los lípidos es la emulsificación. La fase lipídica del bolo alimenticio, que abandona la boca y se dirige al estómago, se encuentra dispersa en gotas embebidas en una matriz acuosa de composición compleja (Hur *et al.*, 2009).

En el estómago comienza la degradación química de los lípidos emulsionados, los cuales son hidrolizados parcialmente por la lipasa gástrica. Esta enzima actúa específicamente sobre un solo ácido graso de un TG, posiciones sn-1 o sn-3, generando 1 AGL y diacílgliceroles (DG). Así, se completa entre un 5-30% de la digestión de los lípidos (Golding y Wooster, 2010).

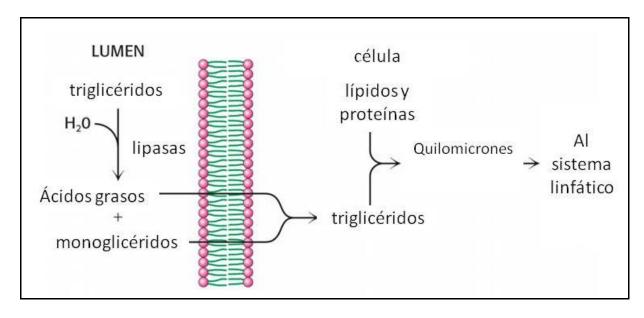


Figura 2. Digestión, absorción y transporte de lípidos.

Posteriormente el quimo pasa al intestino delgado, provocando el vaciado de la vesícula biliar en el duodeno y la secreción de la hormona colecistoquinina (CCK) en el páncreas (Figura 2.). En este órgano se produce la LP como respuesta hormonal de la CCK (Mu y Hoy, 2004). Una vez en el intestino delgado los lípidos emulsionados y parcialmente hidrolizados se mezclan con los jugos digestivos, que contienen SB, fosfolipídos, LP, colipasa, proteasas, sales y bicarbonato de sodio (Hur *et al.*, 2009); la secreción de bicarbonato de sodio se encarga de neutralizar el medio ácido que proviene del estómago, aumentando el pH hasta 6-6,5 (Golding y Wooster, 2010).

Las SB son bio-surfactantes presentes en el tracto gastrointestinal (TGI), que desempeñan un papel crucial en la digestión y absorción de nutrientes. Las SB son la forma ionizada de los ácidos biliares, los cuales son sintetizados a partir del colesterol en el hígado (Feroci *et al.*, 2007)

(Figura 3). Se ha comprobado que la ausencia de éstas impide la digestión de las grasas provocando heces blanquecinas y esteatorrea.

Las SB actúan como fuertes detergentes, permitiendo el aumento de la interface lípido/agua, ya que cuando se encuentran en concentraciones suficientemente altas, tienden a formar micelas, pequeños glóbulos esféricos. Como estos grupos polares tienen carga negativa, todo el glóbulo micelar se disuelve en el agua y permanece en una solución estable hasta la absorción de la grasa a pesar del gran tamaño micelar.

La formación de micelas, junto con la formación de vesículas unilamelares de fosfolípidos, completa el ciclo de digestión de los lípidos, facilitando la adsorción de estos a través del lumen intestinal (Golding y Wooster, 2010).

**Figura 3.** Esquema simplificado de las rutas de síntesis de los ácidos biliares de las sales biliares.

2.3. Lipasas y el fenómeno de la activación interfacial. De acuerdo con la definición de la Comisión de Enzimas de la IUPAC las lipasas o glicerol éster hidrolasas (E.C.3.1.1.3) son enzimas solubles en agua que juegan un rol clave en el metabolismo de los lípidos. Catalizan de forma natural la hidrólisis de TG. Poseen una triada catalítica compuesta por serina, histidina y aspartato/ glutamato (Reis *et al.*, 2010). Están presentes en la mayoría de los organismos vivos, siendo imprescindibles para la asimilación de los lípidos, así como también, para su almacenaje y posterior utilización como reserva energética. Las lipasas han evolucionado para realizar su función en el microambiente interfacial donde se encuentra su sustrato.

Los sustratos naturales para las lipasas son aceites y grasas, como los TG de ácidos grasos de cadena larga (mayores a 10 átomos de carbono), a diferencia de las esterasas que actúan sobre ésteres simples de ácidos grasos de bajo peso molecular (Colowick y Kaplan, 1955).

La LP es la responsable de entre 50-70% de la digestión de los lípidos consumidos (Birari y Bhutani, 2007). Se encarga de hidrolizar los ácidos grasos de TG en las posiciones sn-1 y sn-3, produciendo 2-monogliceridos y AGL (Hur et al., 2009). Esta enzima es especialmente activa cuando el sustrato, parcialmente soluble en agua, se encuentra en forma de emulsión, siendo su actividad escasa o nula sobre el sustrato disuelto (forma monomérica) (Sarda y Desnuelle, 1958). La enzima soluble en agua debe moverse desde la fase acuosa hacia la interfase lípido-agua en donde el sitio activo de la enzima se enlaza con el sustrato. (Figura 4). Este fenómeno se ha denominado "activación interfacial". Desnuelle et al., (1958) propusieron que un cambio conformacional de la lipasa estaría asociado al fenómeno de la activación interfacial. Por otro lado Brady et al., (1990) al obtener la estructura tridimensional de la enzima de Mucor miehei, descubrieron la presencia de un bucle antipático en la superficie de la proteína, que cubre el centro activo de la lipasa cuando se encuentra en solución acuosa, impidiendo el acceso a éste. Los mismos autores postulan que en la conformación activa de la enzima dicha "tapadera" sufre un reajuste como resultado del cual el centro activo se torna accesible. Neves-Petersen et al., (2001) estudiaron la distribución de aminoácidos polares, débilmente polares y apolares en la superficie de diversas lipasas en función del pH, observando que la región cercana al centro activo es más hidrofóbica cuando las enzimas se encuentran en su conformación abierta. La LP tiene un rango de actividad entre pH 4,5 y 7,5, con un óptimo de alrededor de 6,5 (Golding y Wooster, 2010).

Por otro lado, según Belitz *et al.*, (2009) la reacción de las lipasas se acelera con la adición de iones calcio que precipitan los AGL en forma de sales de calcio insolubles, mientras

que Madrid (1994) afirma que las condiciones de actuación de estos catalizadores biológicos consideran un medio alcalino y la previa acción de SB.

Estudios *in vitro* han demostrado que varios compuestos de superficie activa son capaces de inhibir la actividad de las lipasas en la interfase lípido-agua, incluyendo las SB, pequeñas moléculas de surfactantes, fosfolípidos y proteínas (Mun *et al.*, 2007). Además, se ha reportado que emulsiones estabilizadas con proteínas, una vez en el estómago y debido a la acción de la pepsina sufrirían algunos cambios (Sarkar *et al.*, 2009) y no deberían presentar competencia por sitios en la interfase de las emulsiones en el duodeno.

Los alimentos contienen distintas sustancias antipáticas, los que entrarían en una competencia con las moléculas de los jugos gastrointestinales por un sitio en la interfase de las emulsiones (Golding y Wooster, 2010). La naturaleza de las sustancias emulsionantes, posee un impacto en la susceptibilidad de las gotas de lípidos a la coalescencia o a la dispersión en el tracto intestinal, alterando el área total de los lípidos expuestos a la enzima (Hur *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que muchas enzimas no son proteínas puras, sino que contienen iones metálicos y/o diferentes moléculas no proteícas de pequeño tamaño, denominados *cofactores*, los cuales son imprescindibles para la actividad enzimática. Los iones metálicos están implicados en la unión del sustrato, y cooperan en la catálisis como ácidos de Lewis o como transportadores de electrones. Los iones Ca<sup>2+</sup> son ácidos de Lewis, pueden estabilizar la conformación de la enzima, en el caso de la α-amilasa, mediante una interacción iónica con restos de aminoácidos cargados negativamente, o bien que toman parte en la unión con el sustrato, en el caso de las lipasas.

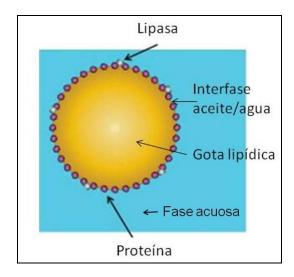


Figura 4. Mecanismo de acción de la lipasa pancreática, interfase aceite/agua.

2.4. Método pH-Stat, cuantificación de actividad de lipasa. La actividad de una enzima se mide normalmente determinando la velocidad de generación de producto o la de desaparición del sustrato, durante la reacción catalizada por la misma (Belitz *et al.*, 2009). Se refiere a la cantidad de sustrato que es transformado o a la cantidad de producto generado por una enzima, por minuto. La actividad lipasa se expresa en unidades de actividad enzimática (U) como micromoles (μmol) de AGL generados por minuto (Ceriotti *et al.*, 1985). Existen varias técnicas para medir la actividad de una enzima concreta. Y hoy en día se cuenta con métodos tanto para la detección cualitativa como para la medida de la capacidad hidrolítica. Beisson *et al.* (2000) han publicado completas recopilaciones de los diferentes métodos disponibles.

El método de pH-Stat se utiliza comúnmente para caracterizar la digestibilidad *in vitro* de los lípidos en condiciones simuladas del intestino delgado. Este método mide la fracción de AGL liberados de los TG en el tiempo. Para llevar a cabo este proceso se utiliza un titulador

automático que cuantifica el progreso de la hidrólisis titulando los AGL liberados con una solución alcalina que por lo general es hidróxido de sodio (Brocklehurst, 1992; Navarrete-del-Toro y García-Carreño, 2002). La técnica del pH-Stat es catalogada como el método más efectivo para determinar la digestibilidad de materias primas por la FAO y una de las ventajas de esta técnica es que permite la utilización de concentraciones altas de sustrato en contraste con los equipos espectrofotométricos usados en turbidimetría (Arzoglou *et al.*, 1982).

La detección de los protones liberados durante la reacción de hidrólisis catalizada por la lipasa requiere de la ionización total o al menos parcial de los AGL que se producen. Por ello el pH fijado en el medio de reacción debe ser igual o mayor que el pK aparente del ácido liberado (Beisson *et al.*, 2000).

Después de cada experimento se obtiene una curva de valoración, que refleja el volumen del agente titulante, en este caso, la base NaOH, que se añade para mantener el pH del medio constante durante la reacción en función del tiempo, (Anexo 1).

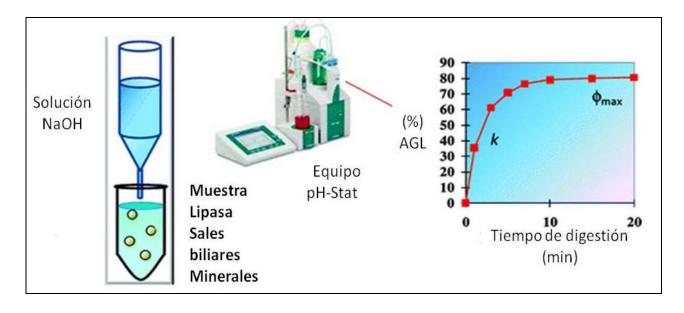
El método *in vitro* para medir la digestibilidad de lípidos, tiene al menos cuatro aplicaciones básicas:

a) Conocer la actividad lipasa utilizando sustratos naturales o artificiales, como TG y fosfolípidos.

- b) Obtener la velocidad de digestión de diferentes insumos lipídicos por especie, en función de su origen, composición, longitud de ácidos grasos asociados, calidad de los lípidos., etc.
- c) Conocer la digestibilidad relativa respecto a un lípido de referencia.
- d) Hacer correlaciones de digestibilidad *in vivo* e *in vitro*. Esta información complementaria puede ser útil para la selección de insumos para la formulación de alimentos.

El equipo del pH-Stat permite trabajar en dos modos diferentes:

- a) **Punto final:** donde se añade el agente titulante (NaOH), hasta alcanzar el pH deseado y especificado previamente.
- b) **pH-Stat:** permite mantener el pH del medio a un valor constante, por un periodo de tiempo determinado.



**Figura 5.** Representación esquemática del sistema pH-Stat en el modelo de digestión *in vitro* (Li y McClements., 2010).

**2.5** Estudio de la actividad lipásica con tributirina como sustrato. En todos los procedimientos en los cuales se evalúa la actividad lipolítica se utiliza como sustrato una fuente lipídica en estado de emulsión. Las emulsiones son sistemas dispersos de dos líquidos poco solubles o insolubles entre sí, como es el caso de un aceite disperso en agua.

Algunas lipasas como la de *Mucor miehei*, y la lipasa pancreática hidrolizan más rápidamente ácidos grasos de cadena corta (Xu, 2000).

La tributirina (TB), glicerol tributirato o 1, 2,3 tributirilglicerol, de fórmula  $C_{15}H_{26}O_6$  y de peso molecular 302,4 g/mol, es un TG, triéster de la glicerina y el ácido butírico (Figura 6). Su densidad es de 1,04 g/cm³ y su índice de refracción es 1,436. Es una grasa artificial, se forma a partir de un ácido de apenas cuatro átomos de carbono, por lo que se considera un ácido graso de cadena corta, y carece de doble enlace.

Figura 6. Fórmula tributirina.

El empleo de TB como sustrato para la medición de la actividad lipásica mediante el pH-Stat resulta bastante frecuente (Rapp, 1995; Noor *et al.*, 2003), pues es relativamente fácil de dispersar en agua y su producto, el ácido butírico se encuentra disociado casi totalmente a pH (7,0) y un (95,5%) pasa a la fase acuosa. Por ello es posible titularlo continuamente durante la reacción. Sin embargo, algunos autores no aconsejan su utilización cuando lo que se pretende es verificar la actividad de una enzima desconocida, ya que, al ser ligeramente soluble en agua, podrían darse falsos positivos si la enzima posee actividad esterásica (Jensen, 1983).

El proceso de hidrólisis de TB en forma de emulsión con la enzima lipasa pancreática, implica el contacto directo entre la enzima y los enlaces ésteres a hidrolizar. Para que se produzca la reacción de hidrólisis es necesario que el enlace éster esté situado en la superficie de la gota en contacto con la fase acuosa en la que se encuentra la lipasa.

Para que la hidrólisis ocurra, la enzima debe entrar en contacto con un enlace éster superficial. Debido a la disposición tetraédrica del carbono central de la glicerina en la molécula de TB y a la presencia de tres grupos n-butilo hidrófobos en tres de las cuatro posiciones, lo más probable es que la molécula de TB se disponga con la arista formada por el hidrógeno y un grupo éster en contacto con la fase acuosa. Por esta razón se nos hace lógico pensar que la concentración inicial de moléculas de TB superficiales es igual a la de enlaces éster de la superficie accesibles.

Según Belitz *et al.* (2009), cuanto mayor sea la superficie interfacial, es decir, cuanto menor sea el diámetro de la gota de aceite, tanto más activas serán las lipasas. Esta relación se debe tener en cuenta al preparar las emulsiones que se emplean como sustrato para determinar la actividad enzimática.

**2.6 Proteínas de origen vegetal.** Se espera que a futuro sea cada vez más común que las dietas contengan proteínas y aceites provenientes de vegetales. La competitividad de las harinas vegetales, frente a las harinas de pescado por ejemplo, se debe a su mayor producción, la cual no se encuentra limitada por la productividad natural del medio. Además, muchas de ellas son subproductos agroindustriales (oleaginosas) y por consiguiente, los precios pueden llegar a ser muy competitivos (De la Higuera y Cardente, 1993).

La búsqueda de nuevas materias primas es un desafío con el fin de minimizar el impacto que generan las fluctuaciones en la disponibilidad de los recursos animales (Den Bieman, 2000). Como fuentes de proteína vegetal se utilizan: cereales, semillas oleaginosas y leguminosas. A esto se le añaden los subproductos de las industrias de fermentación en el caso de los cereales, y los de la obtención de aceite en el caso de las oleaginosas.

Las leguminosas se caracterizan por su alto contenido en proteínas (Campos-Vega *et al.*, 2010). Con niveles de proteína cercanos al 30%, además de presentar la mayoría de los aminoácidos esenciales (Petterson *et al.*, 1998); las leguminosas, como alfalfa, frijoles, arveja, haba, y soya, han sido utilizadas en reemplazo de la harina de pescado en la alimentación animal. No obstante su empleo se ve reducido en muchos casos, debido a su utilización directa en la alimentación humana y hoy en día a su potencial uso en la producción de biocombustibles.

La valoración de una materia prima vegetal no sólo debe considerar el aporte nutritivo, sino que también es necesario valorar aspectos tales como digestibilidad de la materia prima y su relación con otros nutrientes (Glencross *et al.*, 2007); deficiencias de aminoácidos esenciales, particularmente los ingredientes vegetales son deficientes en lisina y metionina (Tacon, 1994); presencia de factores antinutricionales y su efecto sobre la palatabilidad, digestión y absorción de nutrientes (Francis *et al.*, 2001).

También, el tratamiento tecnológico (descascarado, extrusión, cocción o microondas) aplicado a materias primas de origen vegetal (Tabla 3) puede mejorar el grado de utilización digestiva y tener significativas mejoras en los índices productivos de la especie (Glencross *et al.*, 2007;Pereira y Oliva-Teles, 2003). A nivel mundial una de las leguminosas de mayor potencial

como fuente de proteína vegetal alternativa a la harina de pescado es el lupino (*Lupinus spp*), también conocido como altramuz o lupini.

Los productos de origen vegetal tienen un gran potencial como posibles portadores de sustancias con actividad inhibidora de enzimas; esto se puede comprobar ya que han sido utilizados por la medicina ancestral para aliviar diversos tipos de malestares y desordenes metabólicos, incluida la obesidad (Birari y Bhutani, 2007). Los mismos autores han clasificado algunos compuestos derivados de fuentes vegetales que han demostrado tener un efecto negativo en la actividad de la LP, diferenciándolos según su estructura química en saponinas, polifenoles y terpenos.

Las especies vegetales abordadas (leguminosas), en este estudio, no corresponden a las descritas por algunos autores (Sharma *et al.* 2005; Kokotos, 2003) ya que son cultivos que se producen a gran escala.

Algunos ejemplos de cultivos industrializados, fuentes de compuestos inhibidores de lipasa pancreática, son el salvado de trigo y las semillas de girasol (Kumar y Chauhan, 2010).

• El lupino es una rica fuente de proteínas (40-50%), en general, el nivel de la mayoría de los factores antinutricionales en lupino son considerablemente menores que en otras fuentes proteicas vegetales. Notablemente el lupino está desprovisto de inhibidores de proteasas, saponinas, lecitinas, taninos y glucocinolatos (Glencross, 2004).

- La soya es una leguminosa de alto valor nutritivo ya que contiene la proteína más completa de los vegetales por poseer aminoácidos esenciales como la lisina. En su composición, las proteínas representan un 40,3%, mientras que los lípidos un 21,0%. El aceite es de alta digestibilidad y es rico en AGPIs, los cuales representan el 86% (Valencia, 2006). En este aceite predominan ácidos grasos como el ácido linoleíco (C18:2 n-6) con un 51,0%, seguido con un 22,8% ácido oleico (C18:1) y un 10,3% de ácido palmítico (C16:0) (FAO, 2010).
- La semilla de linaza (*Linum usitatissmum*) posee un contenido de omega-3 mayor a cualquier otra oleaginosa. También es rica en proteínas (23,4%) siendo su composición aminoacídica similar a la de la soya, considerada como una de las más nutritivas entre las proteínas de origen vegetal (Lenzi de Almeida *et al.*, 2008). Su contenido lipídico aproximado es de un 35% y posee un 53,3% de ácido linolénico (C18:3 n-3), un 12,7% de ácido linoleíco (C18:2 n-6), un 20,2% de ácido oleico (C18:1) y un 5,3% de ácido palmítico (C16:0).

**2.7 Extrusión de alimentos.** La cocción - extrusión en la industria de alimentos puede definirse como un proceso en el cual un material alimenticio rico en proteína y/o almidón es forzado a fluir bajo diversas condiciones de humedad, temperatura, presión y fuerza mecánica a través de un molde o matriz que le da forma al producto extruido (De Witt, 1994).

De acuerdo a De Witt (1994), en el proceso de extrusión ocurren una serie de fenómenos casi todos ellos ventajosos; estos son:

- Gelatinización de los almidones que permite una mayor captación de agua, mejorando la digestibilidad y disponibilidad calórica.
- Coagulación parcial de las proteínas mejorando su digestibilidad. Estas junto con el almidón, se unen formando una mezcla homogénea y cohesionada.
- Inactivación térmica de las enzimas deteriorantes de las materias grasas de las harinas, como las lipasas y lipoxigenasas, las cuales catalizan reacciones químicas que llevan a la formación de compuestos de fácil rancidez.
- Inactivación de factores inhibidores del crecimiento. La alta temperatura necesaria para eliminar dichos factores, no atenta contra la calidad nutritiva de la mezcla, ya que se aplica por breve tiempo.

La extrusión se ha convertido en una importante herramienta para procesar alimentos y mejorar su digestibilidad y otros aspectos nutricionales. La extrusión con bajos niveles de humedad, o extrusión seca, ha sido utilizada durante muchos años por la industria de piensos. Aunque sus aplicaciones han estado limitadas principalmente a la extrusión de ingredientes tales como la soya integral (Hancock, 1992).

**2.8 Inestabilidad de emulsiones.** La definición tradicional de una emulsión se refiere a una dispersión coloidal de gotas de un líquido en otra fase líquida (Dickinson y Stainsby, 1988). En estos sistemas la fase dispersa se encuentra en forma de pequeñas gotas o micelas (Figura 7), entre 0,1 y 10 µm distribuidas en la fase continua o dispersante. Las emulsiones son inestables, y

si se les permite reposar por algún tiempo, las moléculas de la fase dispersa tienden a asociarse (coalescencia) para constituir una capa que puede precipitar o migrar a la superficie, según la diferencia de densidades entre las dos fases (Lissant, 1984).

Por lo general las emulsiones contienen estabilizantes, sustancias cuyas moléculas contienen una parte no polar y otra polar, por lo que es posible que se disuelvan tanto en soluciones acuosas como disolventes orgánicos y aceites. Dependiendo del predominio de una de las partes de la molécula sobre la otra, el emulgente tendrá un carácter lipófilo o lipófobo y por consiguiente, presentará una mayor afinidad por el agua o por los aceites; esta característica se conoce como balance hidrófilo-hidrófobo (Becher, 1957).

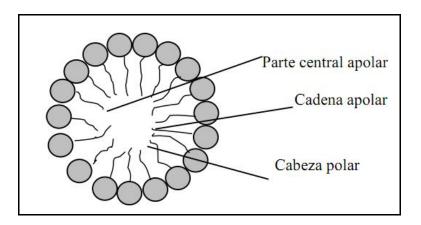


Figura 7. Micela esférica.

La inestabilidad de las emulsiones es un proceso que envuelve diferentes mecanismos que contribuyen a la transformación de una emulsión uniformemente dispersada en un sistema

separado en fases. Existen diversos mecanismos que originan la inestabilidad de las emulsiones entre los que se encuentran (Figura 8).

- Agregación, la cual es una separación causada por el movimiento hacia arriba de las gotas del líquido que tienen una menor densidad que el medio que las rodea.
- Floculación o agregación de gotas, que sucede cuando la energía cinética liberada durante las coaliciones lleva a las gotas a través de una barrera de fuerzas repulsivas y dentro de una región donde las fuerzas atractivas operan y causan que las gotas se adhieran unas con otras, manteniendo su identidad.
- Coalescencia, lo cual significa que cuando dos gotas chocan, pierden su identidad y
  forman una sola gota de mayor tamaño. En una emulsión, entre mayor sea el tamaño de la
  gotas, mayor es la tendencia a la coalescencia. De este modo, gotas finas generalmente
  proveen buena estabilidad (Lissant, 1984).

Generalmente las emulsiones contienen agentes emulgentes para estabilizar las dos fases inmiscibles (Lissant, 1984). Sin la presencia de agentes emulgentes las fases de una emulsión (aceite-agua) se separan inmediatamente (Friberg y Larson, 1997).

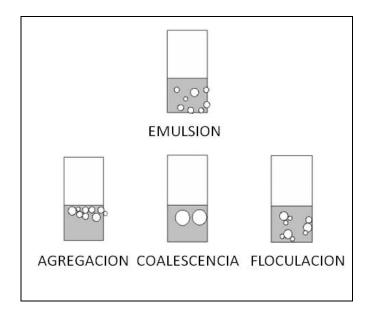


Figura 8. Algunos mecanismos que contribuyen a la inestabilidad de las emulsiones.

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales.

## 3.1.1 Reactivos y material de laboratorio.

- 2-Mercaptoetanol
- Bureta 50 mL
- Cubetas de espectrofotómetro de vidrio y de cuarzo
- Espátula
- Gradilla
- Lipasa pancreática de cerdo (Sigma)
- Matraces aforados de 5, 50,100 y 500 mL
- Matraces Erlenmeyer
- Membrana de diálisis Spectra/Por MWCO: 6000-8000 Da
- Micropipetas
- Microtubos eppendorf de 1,5 y 2 mL
- N,N,N',N'-Tetrametiletineldiamina (TEMED)
- Papel aluminio
- Piceta
- Probetas de 50, 100, 250 y 500 mL
- Reactivo de Folin
- Sales biliares (Sigma)
- Suero de albúmina bovina (BSA)
- Sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Termómetro
- Tributirina (Sigma)
- Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)

- Tubos de ensayo
- Vasos precipitados de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL

# 3.1.2 Equipos e instrumentos.

- Extrusor (Polydrive-R252, Thermo-Haake, Karlsruhe, Alemania)
- Molino de discos, modelo SB 200, Tema
- Tamiz Tyler 40 (425 μm)
- Titulador automático pH-Stat, Metrohm, modelo Tritando 902.
- Soxlhet: balón de vidrio fondo plano 250ml, tubos butt.

## 3.2 Metodología

**3.2.1 Preparación de materias primas.** En este estudio se emplearon tres materias primas vegetales diferentes, sometidas a distintos tratamientos, las cuales fueron linaza extruida y desgrasada (LiED), linaza desgrasada (LiD), lupino extruido y desgrasado (LED), lupino desgrasado (LD), soya extruida y desgrasada (SED) y soya desgrasada (SD). Todas las semillas de las materias primas fueron obtenidas en el mercado local.

Para la extrusión el material fue acondicionado a una humedad de 25% aprox. en base seca. Se utilizó un extrusor (Polydrive-R252, Thermo-Haake, Karlsruhe, Alemania; diámetro 19,1 mm, largo/diámetro 25/1) de tornillo simple. El material fue alimentado por un dosificador (Brabender FC-B1, Alemania) a una velocidad de 600 g/h. Se utilizó un

perfil de temperatura de 4 zonas (75, 85, 105 y 140°C) y una velocidad de tornillo de 60 rpm: La materia prima fue forzada a salir por un dado de abertura de 4 mm. El producto obtenido fue secado a 65°C; molido, tamizado, y almacenado en envase cerrado. El desengrasado de las muestras se realizó por Soxhlet por 6 h usando éter de petróleo. Posteriormente las muestras fueron almacenadas en frascos de vidrio en un lugar fresco y seco.

Las materias primas fueron trituradas en molino de discos; la mezcla que resultó de la trituración fue posteriormente tamizada para separar la fracción más pequeña; en tamiz Tyler 40 (425 µm), ya que por bibliografía se sugiere moler las muestras a tamaño de partículas inferior a 3mm para una predicción razonable de la digestibilidad *in vivo* especialmente en el caso de muestras de baja digestibilidad inicial y de textura gruesa. El desengrasado se realizó como se mencionó anteriormente.

3.2.2 Análisis proximal de las materias primas. La composición proximal de las materias primas vegetales evaluadas se determinó según el método AOAC (1995). La humedad se determinó evaporando la muestra a 65°C durante 12 h. El contenido de proteína se determinó mediante la medición de nitrógeno (N × 6,25) por el método de Kjeldhal, el contenido de cenizas se determinó después de la combustión a 550° C durante 6 h. El contenido de grasa se determinó por extracción con éter utilizando el método de Soxhlet. El extracto no nitrogenado (ELN) se determino por diferencia.

#### 3.2.3 Soluciones utilizadas.

- Solución de hidróxido de sodio (NaOH). Su función es la de neutralizar los ácidos grasos liberados en la reacción de hidrólisis, manteniendo constante el pH del medio durante la misma, así como también fijar el pH de la emulsión antes de la adición de la enzima.
- Solución buffer fosfato (pH 7,0, 50 mM). Con enzimas pancreáticas se prefiere usar un tampón de fosfato ajustado a pH cercano a la neutralidad. Se utilizó para preparar la solución de lipasa pancreática y para ajustar el volumen requerido para cada ensayo.
- Solución de sales. Las soluciones de NaCl (2,86 M) y CaCl<sub>2</sub> (0,378 M) fueron preparadas disolviendo cierta cantidad de polvo en agua doblemente destilada.
- **3.2.4 Determinación del grado de hidrólisis por pH-Stat.** En el modelo de digestión *in vitro* se utilizó una modificación de la metodología descrita por Li *et al.*, (2011).

La composición de la solución de reacción (17 ml) a menos que se indique lo contrario fue de: bilis bovina (Sigma) 25 mg/ ml, NaCl 250 mM, CaCl<sub>2</sub> 5,6 mM, goma arábiga 0,08% (p / v), TB (Sigma) 15 mg / ml en tampón fosfato (pH 7, 50 mM).

Para llevar a cabo la medida de la actividad enzimática mediante la técnica del pH-Stat se utilizó el titulador automático (Metrohm, EE.UU. Inc.), este equipo permite trabajar en dos modos diferentes:

- **Ajuste de pH:** se trata de una titulación a punto final, es decir, se añade el agente titulante hasta alcanzar el pH final deseado (7,0).
- **Modo Stat:** permite mantener el pH del medio en un valor constante especificado, es el que se utiliza durante la reacción de la hidrólisis.

Para conseguir que los resultados sean válidos, hay que asegurarse que la dosificación sea continua y que la velocidad de adición del agente titulante sea la adecuada lo que depende de la concentración del mismo.

- **3.2.5 Preparación de la emulsión.** Para obtener las emulsiones se utilizó dispersión mecánica. El procedimiento utilizado constó de las siguientes etapas:
  - a) En un vaso de vidrio de 100 mL, se dosificaron las cantidades de cada uno de los componentes que se especificaron anteriormente.
  - b) Se agitó a alta velocidad durante 10 min, manteniendo el recipiente que contenía la solución de reacción en baño termostatizado para mantener la temperatura en 37°C.
- **3.2.6 Ensayo de actividad.** Para la determinación de la actividad lipásica se siguió la metodología que se describe a continuación:

- a) Los 20 ml de solución (emulsión) se colocaron en el reactor (vaso de vidrio), y este a su vez en un baño a 37°C. Se mantuvo con agitación constante sin introducir burbujas de aire para evitar sobreestimaciones a causa de la introducción de CO<sub>2</sub> atmosférico a la reacción.
- b) Se esperó el tiempo necesario para alcanzar la temperatura fijada para el experimento, que fue siempre de 37° C.
- c) Luego se procedió a ajustar el pH de la reacción a 7,0, agregando NaOH o soluciones de HCl con la concentración adecuada según los requerimientos del ensayo.

Para llevar a cabo la reacción enzimática se utilizó el modo pH-Stat y se inició la reacción agregando después de 20 s 3,0 ml de solución enzimática recién preparada (90 mg de LP de cerdo, dispersa en buffer fosfato pH 7.0, 50 mM). El pH del medio se mantuvo constante gracias a la adición continua de NaOH.

d) El volumen del agente titulante se registró durante 30 min.

Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces en muestras recién preparadas. Los resultados fueron posteriormente reportados como promedios ± desviación estándar.

**3.2.7** Cálculo de la actividad enzimática. A partir de la curva de titulación obtenida es posible calcular la actividad enzimática desde el valor de la pendiente inicial de la curva volumen de base/tiempo, durante los primeros 200 s de reacción, aproximadamente. Se define una

unidad lipasa (LU) como la cantidad de enzima capaz de liberar un µmol de ácidos grasos por minuto bajo las condiciones descritas.

La actividad se calculó por medio de la ecuación:

$$A = \frac{v \cdot M_{NaOH} \cdot 1000}{m_{enzima}}$$

#### Donde:

- A es la actividad enzimática en unidades de lipasa por gramo de enzima (U/g)
- $M_{NaOH}$  es la concentración de la base (M)
- $m_{enzima}$  corresponde a la masa (g) de la PL en la solución de reacción.

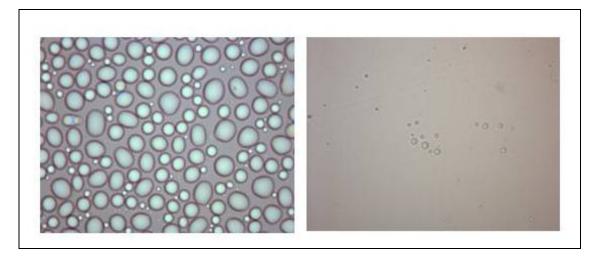
El porcentaje de tributirina hidrolizada se calculó usando

$$P = \frac{V_{NaOH,30\,\text{min}} \cdot M_{NaOH}}{(3 \cdot m_{tb} / 302,37) \cdot 1000} \cdot 100$$

## Donde:

- $V_{NaOH, 30 \text{ min}}$  es el volumen de base añadido hasta 30 min.
- $m_{tb}$  es la masa (g) de TB en la solución de reacción.
- 302,37 corresponde al peso molecular del sustrato (TB).

**3.2.8 Determinación del tamaño de gota de las emulsiones.** En este trabajo no se consideró evaluar en detalle el tamaño de las gotas de cada emulsión, solo se procedió a verificar el efecto de la hidrólisis en ellas (Figura 8).



**Figura 8.** Visión 100× de gotas de TB en emulsión antes y después de la digestión en el ensayo control.

**3.2.9 Determinación de la capacidad emulsificante (CE).** La capacidad emulsificante se define como el volumen de aceite (mL) que puede ser emulsificado por cada gramo de proteína, antes de que se produzca la inversión de fases. Para efectuar este ensayo se prepararon soluciones (50 mL) con una concentración de 2,5 (mg/mL) del material vegetal en buffer fosfato pH 7,0, 50 mM, mezclando a máxima velocidad. Se agregó aceite de maravilla a ritmo constante hasta que se produjo la inversión de la fase, la cual se detectó por el incremento de la resistencia eléctrica o disminución de la conductividad.

3.3.0 Determinación del índice de actividad emulsionante (IAE) e índice de estabilidad de las emulsiones (IEE). Los IAE e IEE de los materiales vegetales fueron determinados según lo descrito por Pearce y Kincella (1978). Se prepararon emulsiones mediante sonicación, donde 5 g

de una solución de proteína 0,5 (p/p) y 5 g de aceite de maravilla se sometieron durante 10 min a la aplicación de ultrasonido para su homogenización.

Inmediatamente después de terminado el proceso de homogenización, se tomaron 50  $\mu$ l de la fase donde se encontraba la emulsión, los que se diluyeron en 7,5 ml de buffer BA (0,1% p/v de SDS, buffer fosfato pH 7,0, 50 Mm). Se procedió a agitar en vortex durante 10 s y se midió la absorbancia en cubeta de vidrio a 500 nm.

Se repitió el mismo proceso después de 20 min de almacenamiento estático de la emulsión a temperatura ambiente.

Los valores de EAI y IEE se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$EAI\left(\frac{m^2}{g}\right) = \frac{2 \times 2,303 \times dil \times A_0}{c \times \Phi \times \theta \times 10.000}$$

$$ESI(min) = \frac{A_0}{(A_0 - A_{20})} \times \Delta t$$

#### Donde:

- A<sub>o</sub> Corresponde a la absorbancia en el tiempo 0
- N es el factor de dilución
- c la concentración de proteína
- φ representa el volumen del aceite
- AA Es el cambio de absorbancia a los 20 min

• **t** corresponde al tiempo

**3.3.1.** Análisis estadístico de los resultados. Para establecer el efecto del procesamiento y la concentración de las materias primas en la actividad de la enzima, se realizó análisis de varianza, para determinar que factor era significativo (p<0,005) en la respuesta, debido a la dispersión de algunos resultados a continuación se realizó un test de promedios de Duncan para determinar si existía diferencia significativa entre los resultados obtenidos. Los resultados son expresados como el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar (DE) de por lo menos dos experimentos.

La hipótesis inicial fue: "Ni la concentración, ni el procesamiento de la materia prima utilizada influye en la actividad de la lipasa durante la digestión de lípidos".

# 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

# 4.1 Estandarización de la metodología in vitro para evaluar la digestibilidad de lípidos.

En esta etapa se determinaron los efectos de las concentraciones de bilis bovina, aceites vegetales, tributirina, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, goma arábiga en la actividad de la LP (A) y el porcentaje de AGL (P) en 30 min de reacción.

El efecto de la concentración de LP en la digestión de lípidos no se examinó en este trabajo, los experimentos se realizaron basándose en las condiciones del ensayo reportadas por Li *et al.*, (2011). Se sabe que la velocidad de la digestión de los lípidos aumentaría al incrementar la concentración de lipasa, ya que habría más enzima presente en el sistema para catalizar la conversión de los TG en AGL (Reis *et al.*, 2010). A bajas concentraciones de lipasa, ésta no sería capaz de desplazar las SB desde la interfase aceite/agua, por lo que la enzima no podría entrar en contacto con su sustrato dentro de las gotas de aceite. En base a este conocimiento, se decidió no evaluar el efecto de la concentración de enzima, dejándolo como trabajo futuro.

El efecto de la concentración de bilis bovina y del sustrato (tributirina, TB) se muestra en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

**Tabla 1**. Efecto de la concentración de la bilis bovina en la actividad de la LP (A) y el porcentaje de AGL liberados (P) en 30 min de reacción.

Bilis	A	P
(mg/mL)	(U/g)	(%)
13,9	136	29,3
16,0	141	31,9
18,0	167	33,5

El porcentaje de AGL liberados aumentó linealmente con el aumento en la concentración de bilis. Por otra parte, la actividad de la LP solo presentó un alza considerable cuando la concentración de bilis aumentó desde 16,0 mg/mL a 18,0 mg/mL (15%). Los resultados muestran que la concentración de bilis tiene un efecto positivo en la digestión de los lípidos.

Una de las razones de la capacidad de la bilis para facilitar la digestión de lípidos son las siguientes. En primer lugar, es posible que la bilis desplace a todos o algunos de los lípidos emulsionados de las superficies de las gotas y formé una capa interfacial que promueva adsorción de la LP. Sin embargo, la supresión de la digestión de lípidos por las SB está bien definida en la literatura, lo que se explica por la capacidad de éstas para desplazar a la lipasa de la interfase aceite/agua, es decir existiría una competencia evitando que la enzima entre en contacto directo con el sustrato (Bauer *et al.*, 2005).

Por otro lado, se sabe que la función principal de la bilis es la de emulsionar los lípidos, permitiendo el aumento de la superficie de contacto disponible para la enzima. Esta función explicaría el efecto positivo de la bilis en la digestión de los lípidos, reportada en el presente trabajo. En base a los resultados obtenidos se decidió utilizar la concentración de bilis 16,0 (mg/mL) ya que no existe un aumento considerable de la actividad de la LP al seguir aumentando la concentración de bilis, todo esto, considerando la cantidad de ensayos a realizar y el costo de ésta.

Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto de la concentración de TB sobre la actividad de la LP y el porcentaje de AGL liberados se muestran en la Tabla 2. Los ensayos se realizaron en presencia y ausencia de bilis.

**Tabla 2.** Efecto de la concentración de tributirina (TB) en la actividad de la LP (A) y el porcentaje de AGL liberados (P) en 30 min de reacción.

	[TB]	A	P
	(mol/mL)	(U/g)	(%)
con bilis	8,1	420±97	57,9±8,8
	16,3	516±43	60,5±5,6
	32,7	823±25	62,3±3,2
	40,7	1828±102	67,7±6,7
sin bilis	8,2	422±43	48,5±9,9
	16,5	406±46	47,3±3,4
	40,9	917±52	65,1±4,5

La actividad de la LP aumentó en forma importante cuando se elevó la concentración de TB; el mayor incremento en la actividad se obtuvo al elevar la concentración de TB desde 32,7 hasta 41 mol/mL, efecto que también fue observado en el porcentaje de AGL liberados. Además, se obtuvo un incremento notable de los valores de A y P, en presencia de bilis, resultando casi un100% más en comparación con la misma concentración de TB, pero, sin las sales biliares. Esta diferencia no fue observada con las concentraciones menores ensayadas.

Estos resultados no concuerdan con lo señalado por Li et al., (2011), quienes muestran que la velocidad y el grado de la digestión de lípidos disminuye notablemente al usar una mayor cantidad de lípidos. Esto se puede deber a que estos autores examinaron la influencia de distintas cantidades de aceite de maíz, cuya composición incluye ácidos grasos de cadena larga. En el presente caso se utilizó TB constituido por ácido graso de cadena corta. Además, se esperaría observar un incremento en la velocidad de hidrólisis al aumentar la concentración del sustrato siempre que este efecto esté acompañado de un incremento proporcional en el área de superficie lípido/agua para la adsorción de la enzima. La presencia de bilis conduce a una mayor cantidad AGL, pero no es absolutamente necesaria para la actividad de la LP en la mayoría de los sistemas.

**Tabla 3.** Efecto de la concentración de la goma arábiga (GA) en la actividad de la LP (A) y el porcentaje de AGL liberados (P) en 30 min de reacción.

(% p/v) (U/g) (%)	
0.00	
0,03 183 33,0	
0,06 296 41,5	
0,12 150 34,5	

Los resultados en la Tabla 3 muestran que la adición de la goma arábiga incrementa la actividad de la enzima al aumentar desde 0,03 hasta 0,06% p/v esto se debería a que en emulsiones aceite/agua, generalmente, la adición de polímeros hidrosoluble provoca un aumento de la viscosidad de la fase continua y por lo tanto disminuye la movilidad de las gotas, disminuyendo así, la probabilidad de que dos gotas de encuentren y se agreguen, permitiendo que la enzima no tenga impedimentos para actuar.

Las propiedades de la goma arábiga le permiten absorberse en la interfase aceite/agua formando una película viscoelástica, donde los lípidos se ligan a la estructura a través de la formación de uniones por medio de las gotitas de aceite y las cadenas de la goma (Matsumara *et al.*, 2000).

La capa adsorbida del emulsionante contribuye a reducir la energía interfacial por unidad de área, y también ayuda a generar las fuerzas de repulsión entre las gotas para prevenir encuentro cercano. Si la concentración de polímero es muy pequeña, el efecto es inverso debido a la floculación por depleción. Además, con la concentración optimizada debería existir un menor diámetro medio de las gotas de aceite en la emulsión lo que se traduce en una mayor área interfacial específica, lo que explicaría el aumento en la velocidad de la reacción.

La reproducibilidad de los resultados se ve incrementada, disminuyendo considerablemente el coeficiente de variación. La incorporación de esta goma permite obtener emulsiones con las cuales se obtiene una reproducibilidad aceptable.

Se evaluó el efecto del aceite en la actividad de la LP bajo las condiciones de digestión simulada. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Efecto del aceite en la actividad de la LP (A) y el porcentaje de AGL liberados (P) en 30 min de reacción.

	Concentración	A	P
Aceite	$(\mu mol/mL)$	(U/g)	(%)
	4,8	261	42,5
Maravilla	7,3	154	32,0
	9,7	212	27,2
Oliva	11,0	255	29,3
Soya	10,2	214	35,2
Raps	9,9	354	33,7
Maravilla	9,7	212	27,2

Aryee *et al.* (2007) reportaron que existe un efecto de la longitud de cadena de los ácidos grasos componentes de una fuente lipídica, sobre la actividad específica de la enzima.

Los cuatro tipos de aceite evaluados presentan en su composición lipídica ácidos grasos de cadena relativamente larga (entre 18 y 20 carbonos). La mayor actividad de la LP se obtuvo al usar aceite de raps, según bibliografía consultada el aceite de raps posee un 80,3% de ácidos grasos con 18 átomos de carbono, un porcentaje mayor a los demás aceites ensayados. Sin embargo, con todos ellos se obtuvo una actividad de LP mucho menor que la obtenida con TB y una menor liberación de AG.

La TB utilizada finalmente como sustrato en la digestión de lípidos es un ácido graso de cadena corta y presenta mejores resultados tanto en la actividad enzimática, como en el porcentaje de AGL liberados en comparación con los demás aceites ensayados. Este efecto se puede atribuir al hecho de que al ser de cadena corta los AGL producidos durante la digestión presentan una mayor dispersión en un medio acuoso que los productos de la digestión de ácidos grasos derivados de aceites vegetales de cadena más larga (Porter *et al.*, 2007). Los ácidos grasos de cadena media producidos durante la digestión de los TG son capaces de migrar rápidamente a la fase acuosa circundante y por lo tanto, no inhiben la adsorción de la lipasa. Por otro lado, los ácidos grasos de cadena larga producidos por el aceite vegetal tienden a acumularse en la interfase agua-aceite e inhibir la actividad lipasa hasta que son solubilizados en micelas o precipitadas por los iones de calcio.

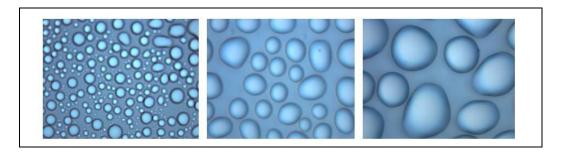
Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto de las sales (CaCl<sub>2</sub> y NaCl) se muestran en la Tablas 5 y 6, respectivamente.

**Tabla 5.** Efecto del CaCl<sub>2</sub> en la actividad de la LP (A) y el porcentaje de AGL liberados (P) en 30 min de reacción.

	A	P
CaCl <sub>2</sub> (mM)	(U/g)	(%)
4,2	253	37,9
8,1	153	31,6
11,4	155	31,8

Desde los resultados mostrados en la Tabla 5 se desprende que un incremento de la concentración de CaCl<sub>2</sub> desde 4,2 a 8,1 mg/mL reduce en casi un 40% la actividad de la enzima, y en un 17% el porcentaje de AG liberados. Esto concuerda con el rango reportado en literatura en condiciones de alimentación normal que es de 5 mM. (Zangenberg *et al.*, 2001).

El Ca2<sup>+</sup> tiene un gran impacto en el proceso de digestión *in vitro* de lípidos (Armand *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 2010). Los iones de calcio aumentarían la velocidad de digestión de lípidos por la unión y la precipitación de AGL que se acumulan en la interfase aceite/agua y que de otra forma restringen el acceso de la lipasa a la interfase. Además, el calcio puede ejercer efectos en la inestabilidad de las emulsiones a través del aumento de tamaño de las gotas de lípido y su posterior floculación, lo que también restringe el acceso de la lipasa hacia el sustrato. Este fenómeno se comprobó mediante la visualización microscópica de las gotas lipídica (Figura 9), se puede observar que al utilizar mayores concentraciones de CaCl<sub>2</sub>, el tamaño y agregación de éstas se ve incrementado, lo que podría disminuir la digestión lipídica.



**Figura 9.** Visión 100× de gotas de tributirina en emulsión con concentraciones de 2,48 mM, 8,12 mM y 13,25 mM de CaCl<sub>2</sub> respectivamente.

Es posible que el CaCl<sub>2</sub> forme un complejo insoluble con las SB aniónicas (Zangenberg, *et al.*, 2001), que se distribuiría alrededor de las gotas de lípido restringiendo el acceso de la lipasa a los TG.

En la Tabla 5 podemos observar que con una menor concentración (4,2 Mm) de CaCl<sub>2</sub> se obtienen los mejores resultados en cuanto a la actividad enzimática y por ende un mayor porcentaje de liberación de AGL.

**Tabla 6.** Efecto del NaCl en la actividad de la LP (A) y el porcentaje de AGL liberados (P) en 30 min de reacción.

NaCl	A	P
(mM)	(U/g)	(%)
62,4	123	29,3
122,8	154	32,0
176,6	287	38,2
237,4	290	40,4
290,2	290	41,5

El conocimiento del papel de cloruro de sodio en la digestión de lípidos puede ser útil para el diseño de alimentos funcionales que son más saludables. Un número de estudios han encontrado un aumento en las enfermedades humanas tales como la hipertensión y las enfermedades cardiovasculares asociadas con un aumento del consumo de sodio o sal. El

consumo de más de 6 g NaCl / día / persona se asocia con un aumento de la presión arterial (Ruusunen y Puolanne, 2005).

Los resultados en la Tabla 6 muestran que con la concentración de 237,4 mM de NaCl se obtuvieron los mejores resultados tanto para la actividad de la enzima como para el porcentaje de AG liberados. Los resultados muestran que existiría una concentración óptima, llegando a un punto de saturación en la reacción, ya que al momento de seguir aumentado la cantidad de NaCl no se reportan alzas en la actividad enzimática, ni en el grado de hidrólisis. Estos resultados coinciden con los reportados por (Hur *et al.*, 2010) donde la adición de NaCl a los lípidos emulsionados induciría una mayor producción de AGL.

## 4.2 Efecto de las materias primas vegetales en la digestión de lípidos

**4.2.1** Composición proximal de las muestras evaluadas. La Tabla 8, muestra la composición proximal de las materias primas cuyo efecto en la digestibilidad de lípidos fue evaluada.

**Tabla 8.** Composición proximal de las materias primas cuyo efecto en la actividad de la lipasa pancreática fue evaluada.

MUESTRA	HUMEDAD%	LÍPIDOS%	CENIZAS%	PROTEINAS%	FIBRA%	ENN%
LED	0,43	1,22	4,15	47,87	2,77	43,56
LD	4,85	2,86	3,82	45,90	1,64	40,94
LiED	4,69	1,79	5,54	30,99	10,32	46,68
LiD	7,78	10,38	5,45	27,91	11,00	37,48
SED	2,91	0,87	5,98	40,31	7,07	42,86
SD	7,01	6,96	5,66	37,44	8,91	34,02

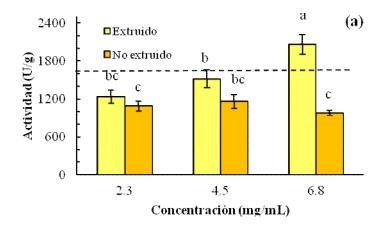
Al momento de evaluar el efecto de la adición de materias primas vegetales al modelo *in vitro* de digestión de lípidos, debemos conocer las características y componentes de éstas.

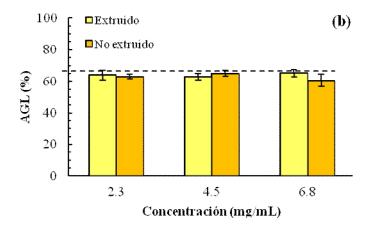
El contenido proteico en las harinas extruidas y no extruidas fue de 27% (linaza desengrasada, LiD) y 47% (lupino extruido desengrasado, LED). La linaza contiene altos porcentajes de fibra (10,3 a 11,0%), seguido de la harina de soya (7,1-8-9,0%). A pesar de que las materias primas vegetales fueron sometidas a extracción soxhlet, para eliminar los lípidos, el contenido de éstos en el LiD (10,4%) y soja desengrasada (SD, 7,0%) fue relativamente alta.

El material extruido y luego desengrasado contiene los porcentajes más bajos de lípidos. Esto se explica porque el tratamiento térmico y el esfuerzo cortante en la boquilla del extrusor afectan a la estructura de la matriz sólida lo que favorece la extracción de lípidos.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la hidrólisis de TB en presencia de las materias primas mencionadas anteriormente y el efecto de la concentración y su procesamiento. La actividad de LP y los porcentajes de AGL hidrolizados fueron evaluados por 30 min. En estos experimentos la concentración de TB fue de 40,7 µmol/ml.

En los gráficos de la Figura 7 (a) y (b) se muestra la actividad lipásica y el porcentaje de AGL liberados respectivamente, después de 30 min de digestión, en presencia de LED y LD en distintas concentraciones.





**Figura 10.** (a) Actividad lipásica y (b) porcentaje de AGL liberados, después de 30 min de digestión, en presencia de las distintas muestras y concentraciones de lupino (LED y LD). La línea punteada corresponde a los valores obtenidos en el ensayo control (sin la harina).

Para determinar la característica de potenciador o inhibidor de las muestras evaluadas los valores obtenidos se compararon con el promedio de los ensayos control (sin muestra) cuyo valor fue de (1701,3 U/g) para la actividad de LP y 65,0% para el porcentaje de AGL liberado.

El LED tuvo un efecto negativo sobre la actividad de LP en las concentraciones de 2,3 y 4,5 mg / mL con una reducción de un 27,2 y 10,6% respectivamente. Sin embargo, para la mayor concentración de lupino utilizada (6,8 mg / mL) la actividad enzimática aumentó un 21% aproximadamente, superando el ensayo control. Por lo tanto a este nivel de LED actuaría como un potenciador de la actividad de la LP.

En cuanto al LD, éste tuvo siempre un efecto negativo en la actividad de la LP, llegando a un 42% con 6,8 mg / mL. Se puede incidir que el lupino al ser extruido e incorporando una alta concentración se comportaría como un potenciador de la actividad de la LP en la digestión lipídica.

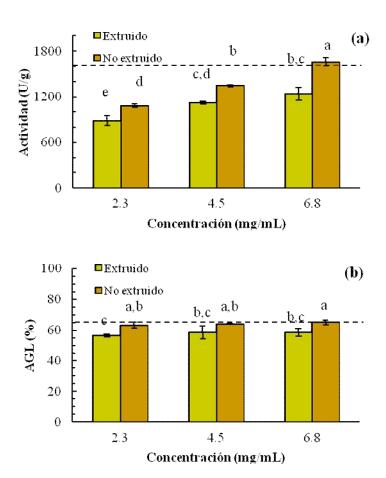
En los ensayos anteriores, la reducción del porcentaje de AG liberados se encontró entre un 1,5-6%. Se observó que los valores no variaban significativamente con las distintas concentraciones ni con el procesamiento del lupino.

La variable concentración de harina de lupino, resultó tener un efecto significativo sobre la actividad de la enzima lipasa pancreática. La concentración 6,8 mg/mL, de LED, fue la que presentó un mayor efecto comparada con las demás muestras.

Por otro lado, entre grupos la concentración de material vegetal no tiene incidencia en el porcentaje de hidrólisis, presentando un F experimental menor con el valor crítico para F.

Se procedió a realizar un ANOVA de dos factores con varias muestras por grupo, en esta oportunidad, tanto la concentración como el procesamiento del lupino tienen un efecto significativo (p<0,05) sobre la actividad de la LP.

El lupino presenta una ventaja económica, sobre la utilización de otras harinas vegetales como la soya, la cual lo convierte en una fuente alternativa de reemplazo bastante atractiva. La proteína del lupino presenta a menudo una digestibilidad superior al de otras fuentes de proteínas vegetales y animales.



**Figura 11.** (a) Actividad lipásica y (b) porcentaje de AGL liberados, después de 30 min de digestión, en presencia de las distintas muestras y concentraciones de linaza (LiED y LiD).

Con el análisis de varianza de un factor (concentración) entre grupos, el F experimental obtenido tanto para A, como para P, fue mayor que el F critico (p<0,05), por lo tanto existe diferencia significativa en la actividad de la LP (A) y el porcentaje de AGL (P) entre las muestras evaluadas al utilizar distintas concentraciones de linaza, es decir, el factor concentración influye en estos dos valores.

Al realizar un ANOVA de dos factores con varias muestras por grupo, los resultados de la modificación de la actividad de LP por la influencia de los factores concentración y procesamiento térmico del material vegetal resultaron significativos con valores F experimentales superiores al F tabla, (p<0,05).

El coeficiente de determinación indicó que la velocidad de la hidrólisis de TB, estaría influenciada en un 60% por la concentración utilizada y un 33% por el tratamiento térmico. Al evaluar el porcentaje de conversión, la concentración no influye, pero si, el tratamiento térmico.

En la digestión de lípidos en presencia de LiED se observó una clara disminución de la actividad enzimática para todos las concentraciones probadas, los resultados fueron: 47,8; 34,3 y 27,2% de reducción con concentraciones de 2,3; 4,5 y 6,1 mg / mL, respectivamente, en comparación con la actividad obtenida en el ensayo control (1701,3 U/g).

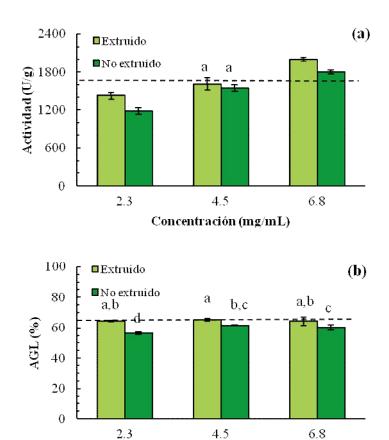
El menor porcentaje de AG liberados fue de 56,6% para la menor concentración utilizada, en comparación con el control que presentó un 64,4%; en los demás ensayos la reducción de porcentaje de AG liberados se encontró entre un 9-12%.

En la digestión de lípidos en presencia de LiD, los porcentajes de inhibición de la actividad de la LP tuvieron una disminución comparados con los percibidos con LiED, logrando un 36,5% de reducción para 2,3 mg/ml, al incrementar este valor a 4,5 mg/ml se obtuvo aproximadamente un 21% de inhibición, mientras que con la mayor concentración solo se llegó a un 2% de disminución en A, la mayor concentración de LiD (6,8 mg/ml) presenta el mayor efecto en A y P con respecto a las demás muestras.

LiED se convertiría entonces en un inhibidor de la actividad enzimática en la digestión de los lípidos bordeando un 48% de inhibición, en comparación al control, superando en un 13,5% al LD.

Algunos compuestos característicos de las materias primas identificadas como inhibidoras de la lipasa son las conglutinas, isoflavonas (genisteína) y alcaloide (quinolizidina) en el lupino, y lignanos (secoisolariciresinol) en la linaza (Campos-Vega *et al.*, 2010). Es posible que estos compuestos sean los responsables de la disminución de la actividad de LP, ya que existen estudios en curso que indicarían que estas sustancias reducen los niveles de colesterol total y colesterol LDL en el plasma sanguíneo (Duncan *et al.*, 2003).

A diferencia de lo ocurrido con LiED los porcentajes de conversión fueron bastante similares, solamente se diferenció el efecto de la mayor concentración con un aumento de este valor en un 1,09%. Esto se debe a que en los porcentajes solo influye el tratamiento del material, no la concentración.



**Figura 12.** (a) Actividad lipásica y (b) porcentaje de AGL liberados, después de 30 min de digestión, en presencia de las distintas muestras y concentraciones de soya (SED y SD).

Concentración (mg/mL)

Los gráficos en la Figura 12 comparan la actividad de LP y los porcentajes de AG liberados en las soluciones de reacción que contenía las diferentes muestras de soya a diferentes concentraciones.

Los resultados mostraron distintos efectos en función de la concentración y procesamiento de la materia prima; a la menor concentración 2,3 mg/ml de SED se observó una reducción en la

actividad PL (16,3%), sin embrago, con la mayor concentración (6,8 mg / ml) el efecto fue positivo presentando un incremento de un 17,6% en la actividad de la LP en comparación con la actividad obtenida en el ensayo control (1701,3 U/g). Para la concentración de 4,5 mg / ml, tanto para SD, como para SED, el valor de A no presenta diferencias significativas (p>0,05).

En cuanto a los porcentajes de liberación de AG, se obtuvieron valores similares, levemente menores (0,61-0,77% de reducción), sin ser significativamente diferentes a lo obtenido en el ensayo control (65%), ni tampoco entre sí (p>0,05).

Para SD la concentración menor (2,3 mg / ml) alcanzó un 30,3% de diminución en la actividad de la LP, la concentración intermedia un 9,01% consiguiendo inhibir la actividad lipásica, por el contrario de la concentración 6,8 mg / mL la cual tuvo un efecto potenciador con un aumento del 5,7%.

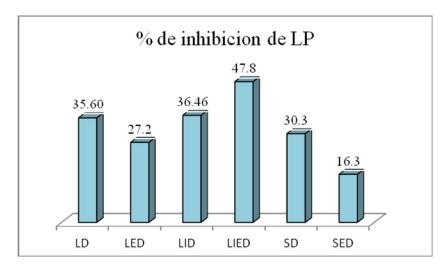
Se puede observar que el procesamiento de la soya presentó un efecto sobre la actividad de la LP; un dato interesante fue que en los dos casos, la mayor concentración provocó un aumento en la actividad enzimática, lográndose hasta un 17,6% más comparado con el ensayo control.

Los porcentajes de AG liberados fueron todos menores y diferentes entre sí, con reducciones entre 5,07-13,07% en relación al ensayo control.

Análisis de varianza de un factor, entre los grupos evaluados el factor concentración, presentó como resultado un F experimental mayor al F de tabla, entonces este factor es significativo para la respuesta (actividad enzimática). Los valores de A, en SD y SED con la concentración 4,5 mg / ml, mostraron ser significativamente superiores en comparación con las demás muestras. La variable concentración también tiene un efecto significativo en la conversión de TGs.

De acuerdo a los resultados entregados por el ANOVA de dos factores con varias muestras por grupo (dentro del grupo), las dos variables evaluadas (concentración y procesamiento térmico) son significativas. Es decir, la actividad enzimática depende tanto de la concentración, como del procesamiento del material vegetal. Lo mismo ocurre en el caso de la respuesta DE porcentaje de AGL.

La soya sin extruír (SD) en bajas concentraciones serviría como un inhibidor de la actividad de lipasa pancreática logrando un 30% de disminución, sin superar a la linaza que con la mayor concentración probada alcanzó una inhibición de casi un 48%.



**Figura 13.** Porcentaje de inhibicion de actividad LP, en presencia de las distintas harinas vegetales evaluadas (2,5 mg/mL).

En la Figura 13 se compara el grado de inhibición de las distintas muestras utilizadas en este trabajo. Estos efectos se pueden atribuyen a la capacidad de las proteínas para actuar como tensioactivos que tienen la capacidad total o parcial de desplazar las moléculas de la lipasa de la interfase aceite-agua, reduciendo así, el contacto directo entre el sustrato y la enzima.

Además diversos componentes de las fuentes de proteína vegetal, específicamente la fracción proteica, sufren cambios en su estructura durante el tratamiento térmico (desnaturalización), aplicados para eliminar FAN, estos cambios alteran las propiedades de retención de agua, aceite, impactan la actividad y estabilidad de la emulsión que a su vez podría afectar a la digestión de los lípidos.

El tratamiento térmico modifica la estructura terciaria de proteínas, exponiendo a los segmentos hidrofóbicos que se atraen a la interfase aceite/agua. Por otro lado, una mayor actividad emulsificante reduciría el tamaño de las gotas de lípido, y aumentaría la superficie a la que se absorbe la enzima.

La composición, estructura y propiedades de la interfase que rodea las gotas de lípidos en el intestino delgado es muy complejo, por ende es complicado sacar conclusiones sobre lo que realmente sucede en las emulsiones evaluadas.

**Tabla 6**. Efecto de la concentración y extrusión de las tres materias primas evaluadas en la capacidad de emulsión (CE).

	CE		
Fracción	(g aceite/g sólido)		
LD	646,6±28		
LED	712,8±20		
LID	916,0±44		
LIED	832,2±23		
SD	943,9±17		
SED	929,4±50		

La capacidad de emulsificante (CE) se define como la cantidad de aceite que se puede emulsionar con una cantidad estándar de proteínas bajo condiciones específicas (Pearce y Kinsella, 1978). En el presente trabajo se procedió a evaluar el efecto del procesamiento del material vegetal (extrusión) en los valores de CE.

Según el análisis estadístico el factor muestra evaluada (lupino, linaza, soya) presentó un F experimental mayor que el F tabla, por ende, existe significancia en la CE, dependiendo de la muestra experimentada.

Para la variable procesamiento térmico del material vegetal, no existe diferencias estadísticamente significativas, (p>0,05), en la respuesta.

Los valores de CE para todas las muestras fueron similares en magnitud, independientemente del procesamiento de la materia prima, según el análisis de varianza no existirían diferencias significativas entre ellas, con un p>0,05. Para LD (646,6±28 g aceite / g sólido) resultaron ser menores que la CE para LED (712,8±20 g aceite / g sólido) en un 10,2%. En cambio en el caso de la linaza la extrusión provocó una disminución de un 9,1% en CE. Para SD y SED (943,9±17 g aceite/g sólido y 929,4±50 g aceite/g sólido) la extrusión afecto negativamente CE con una disminución de un 1,5%.

Como los resultados obtenidos no presentaron un efecto significativo en CE, la capacidad de las proteínas presentes en las muestras para migrar a la interfase aceite/agua, es similar.

Lo que podemos concluir es que la adición de linaza probablemente tenía una mayor facilidad para migrar a la interfase aceite/agua, que las demás muestras, ocasionando un amento de su CE, lo que coincide con los resultados analizados previamente, donde la linaza presenta el mayor grado de inhibición de la actividad de la PL.

Los valores de CE no son concluyentes, ya que no presentan una tendencia clara, a simple vista se podría decir que el tratamiento térmico de las materias primas tiene un efecto negativo en la capacidad para formar la emulsión, pero en el caso del lupino, se observa un aumento de CE al extruír el material. Sin embargo los análisis estadísticos nos corroboran que el aporte del material vegetal extruido no es significativo para CE.

**Tabla 7**. Efecto de la concentración y extrusión en el índice de la actividad emulsificante (IAE), e índice de estabilidad de las emulsiones (IEE) de lupino, linaza, y soya.

	Lupino		Linaza		Soya	
С	IAE	IEE	IAE	IEE	IAE	IEE
(mg/mL)	$(m^2/g)$	(min)	$(m^2/g)$	(min)	$(m^2/g)$	(min)
2,5	$3,4\pm0,6^{a}$	29,9±3,3	3,8±0,0	87,8±2,6	6,8±0,0	102,4±4,3
5,0	$2,3\pm0,1^{b}$	29,2±0,2	2,5±0,0	77,3±0,0	4,0±0,0	30,6±0,0
6,8	$1,8\pm0,0^{c}$	66,8±3,1 <sup>b</sup>	1,7±0,0	114,5±1,8 <sup>b</sup>	2,8±0,0	176,3±27,5
2,5	$3,4\pm0,1^{a}$	$73,1\pm13,4^{b}$	2,3±0,0	144,5±21,6 <sup>a</sup>	3,1±0,0	37,3±0,5
5,0	$2,7\pm0,1^{b}$	$73,4\pm11,6^{b}$	2,0±0,0	77,1±0,1	1,6±0,0	48,3±2,3
6,8	$2,0\pm0,0^{c}$	96,1±1,3°	1,3±0,0	115,4±9,4 <sup>b</sup>	1,2±0,0	8,7±5,7

<sup>\*</sup>Valores promedio y desviación estándar.

Las emulsiones son termodinámicamente inestables, ya que la energía asociada a la interfaz de la gota es proporcional a la superficie total, que se reduce al mínimo cuando el aceite y el agua se han separado en distintas capas.

El índice de actividad emulsificante (IAE) es una medida de la disposición de la zona interfacial que se puede estabilizar por unidad de cantidad de proteínas y es estimada a partir de la turbidez de una emulsión diluida (Pearce y Kinsella, 1978). Por otra parte,

el índice de estabilidad de la emulsión (IEE) proporciona una medida de la estabilidad de la misma emulsión diluida a lo largo de un período de tiempo definido.

Como se observa en la Tabla 7, en las emulsiones preparadas con lupino se observó una disminución en los IAE para ambos casos, (extruido y no extruido) al aumentar la concentración, mientras que las diferencias entre los tratamiento no fueron significativas. En las muestras de lupino con tratamiento térmico se observa un aumento de hasta un 150% en los IEE.

En el caso de la linaza, es complicado definir un efecto, ya que los resultados no presentan una tendencia; a grandes rasgos se puede incidir que existe un impacto negativo en IAE al incorporar linaza extruida. En cuanto a los valores de IEE solo podemos concluir que a la mayor concentración del material en ambos casos (extruido y no extruido) se obtiene la mayor estabilidad alrededor de 115±5,6 min.

Para soya, al igual que en el caso de la linaza, se muestra una disminución en los valores de IEA al incrementar la cantidad de material en la emulsión, así como también, en las muestras extruidas, alcanzando incluso un 60% de reducción, representando diferencias significativas.

Los IEE también disminuyeron al aumentar la concentración de SED en la emulsión, logrando un 95% menos en comparación con la concentración 6,8 mg/ml de SD.

Se podría concluir que los valores de IAE se vieron negativamente afectados con el aumento de la concentración del material vegetal, siendo la soya la que presenta los mejores resultados (6,8±0,0 m²/g) para la menor concentración utilizada (2,5 mg/ml) en comparación al efecto del resto de las materias primas experimentadas. Es decir que la soya desgrasada tiene una mayor capacidad para permanecer en la interfase aceite/agua tras la formación de la emulsión.

Así mismo para el índice de estabilidad de la emulsión (IEE), donde SD obtuvo 176,3±27,5 min. Con una concentración de 6,8 mg/ml.

Todas las muestras sin extruír presentaron los mayores valores de IEE con la mayor concentración probada; esto se puede deber a que según algunos reportes la extrusión de los alimentos proporciona efectos en la solubilidad y digestibilidad.

Mientras la concentración aumenta los valores de IAE disminuyen, en cambio los IEE son directamente proporcionales a la concentración utilizada.

Los resultados del procesamiento de las materias vegetales estudiadas no tuvieron un efecto claro ya que para el lupino se observó un aumento en IEE solo con la concentración mayor (96,1±1,3 min), para linaza y soya extruida se tuvo resultados sin tendencia. En el caso de la linaza a la mayor concentración los valores de IEE tanto para LiD como para LiED fueron 114,5±1,8 y 115,4±9,4 min respectivamente, no existiendo diferencias entre ellos.

La adición de 2,5 mg/ml de SED a la emulsión presentó una disminución del 95% en IAE en comparación con SD a la misma concentración.

A diferencia de los resultados de la soya sin tratamiento térmico esta vez esta materia prima fue la que tuvo los menores valores de IEE comparada con las demás muestras extruidas.

## 5. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se logró definir las condiciones para evaluar la digestión de lípidos, por lo que la técnica de evaluación de digestibilidad *in vitro* estandarizada ha sido validada y permite evaluar la contribución de distintas materias primas a la digestión de lípidos.
- El método del pH-Stat es relativamente simple y rápido de llevar a cabo y permite la comparación cuantitativa de las distintas muestras en condiciones similares.
- El método de preparación de la emulsión es muy importante; la agitación promueve la desactivación al facilitar el intercambio de la enzima entre el seno de la fase acuosa y la interfase aceite-agua, donde se desnaturaliza por acción de la tensión superficial.
- La actividad de lipasa es influenciada por la fuente lipídica. Al utilizar TB como sustrato,
   la actividad de la LP resultó ser mayor a la actividad obtenida con aceites de raps, el cual
   presentó los mejores resultados entre los aceites evaluados.
- El análisis de varianza mostró que la contribución del material vegetal en la actividad enzimática es significativo (p<0,05) y por lo tanto, se rechaza la hipótesis inicial; el tratamiento térmico y la concentración de las materias primas vegetales evaluadas, afecta la actividad de la lipasa pancreática en el modelo *in vitro* de digestión de lípidos.

- Las tres materias primas vegetales evaluadas y su proceso térmico mostraron diferentes respuestas sobre la actividad enzimática; algunas de ellos se comportaron como potenciales inhibidores, con altos porcentajes de reducción de la actividad experimentada.
- Según los resultados obtenidos desde las pruebas estadísticas es posible determinar cual materia prima sería objetivo de estudio para identificar el o los compuestos inhibidores o potenciadores de la actividad de LP.
- Se presenta como el mayor inhibidor de la enzima a la linaza con casi un 48% de reducción en la actividad de la LP, en comparación con el control, lo que coincide con los valores obtenidos de IAE e IEE.
- En base a los resultados se recomienda incluir en la dieta, linaza en bajas concentraciones, ya que fue la materia prima vegetal que representó los mejores resultados, es decir, una mayor inhibición (48%).
- Al aumentar la concentración de harina de soya, ésta se transforma en un potenciador de la actividad lipásica, alcanzando hasta un 17,6% de incremento.
- La velocidad y el porcentaje de la hidrólisis de lípidos dependen fuertemente de la composición interfacial.
- Bajas concentraciones de lupino representaría una disminución en la actividad de la LP. Según literatura reciente se han indicado algunos posibles beneficios para la salud: El consumo diario moderado de proteínas de lupino llevó a una reducción del colesterol total y de baja densidad (LDL), cuando se administró a un modelo animal establecido de la

hiperlipidemia y una fracción de proteína específica era capaz de controlar hiperglicemia en un modelo con ratas.

- Alternativamente la soya sin tratamiento térmico y en una baja concentración también serviría para reducir la actividad de la LP, aunque en menor grado que la linaza y el lupino.
- El tratamiento térmico (extrusión) modifica la estructura terciaria de las proteínas, permitiendo la exposición de segmentos hidrofóbicos que se atraen más a la interfase aceite/agua impidiendo el paso de la enzima al sustrato.
- Se observó que el proceso de extrusión afecta la actividad de la enzima dependiendo de la harina experimentada, para la linaza el tratamiento térmico representó un efecto positivo en la actividad de la LP, sin embargo, para lupino y soya, la extrusión resultó ser un factor con incidencia negativa.
- Por último, cabe destacar que los resultados obtenidos con el método propuesto debe ser correlacionada con los obtenidos con sistemas similares e *in vivo* en animales y / o humanos a fin de establecer *in vitro* - *in vivo* en las correlaciones.
- En la práctica, existen muchos otros factores que también se espera que influyan en la capacidad de la lipasa para absorber en la superficies de la gota y promover la hidrólisis de lípidos, incluyendo la presencia de otros ingredientes que pueden interactuar con la superficie de la gota, la lipasa o emulsionante (por ejemplo, fibras dietéticas, proteínas, productos de la digestión, minerales, surfactantes).

## 6. PERSPECTIVAS

- Son necesarios mayores análisis para determinar los efectos de estas materias primas, en la actividad de otras enzimas digestivas como las amilasas o proteasas.
- La información obtenida en este estudio será de utilidad para el desarrollo del estándar en los protocolos de pruebas in vitro para la digestión de los otros lípidos.
- Los potenciadores de la actividad de lipasa pueden ser utilizados en la alimentación animal para mejorar la digestión lipídica y obtener más energía sin variar la cantidad de TG consumidos.
- Formular alimentos balanceados tanto para animales, como humanos, en base a linaza, podría ser un buen tratamiento antiobesidad, sin desmerecer al lupino que también presentó resultados favorables.
- Para mejorar el efecto potenciador que presentó la soya en altas concentraciones, así como también, el lupino extruido desgrasado, se podría formular un pienso que integre estas harinas y lograr dietas animales que faciliten la digestión lipídica.
- Se podría utilizar esta técnica como método de control de calidad en una planta de producción de insumos o de alimentos. Evaluando la digestibilidad de diversas materias primas con el

objetivo de encontrar alguna que nos brinde los resultados esperados en cuanto a poder incluirlos en tratamientos para las personas con problemas nutricionales.

- En algunos casos puede ser primordial para aumentar la biodisponibilidad de lípidos, por ejemplo, en los seres humanos que tienen enfermedades que impiden una eficiente digestión o absorción de los lípidos, como la fibrosis quística o pancreatitis.
- En otros casos puede ser importante para disminuir la biodisponibilidad de los lípidos, por ejemplo, en los seres humanos que están en riesgo de la obesidad o las enfermedades cardiovasculares.

## 7. LITERATURA CITADA

- Armand, M., Borel, P., Ythier, P., Dutot, G., Melin, C., Senft, M., Lafont, H., Lairon, D. (1992). "Effects of droplet size, triacylglycerol composition, and calcium on the hydrolysis of complex emulsions by pancreatic lipase An in vitro study". *J. Nutr. Biochem.*, 3: 333–341.
- **Aryee, A.N., Simpson, B.K., Villalonga, R.** (2007). "Lipase fraction from the viscera of grey mullet (*Mugil cephalus*). Isolation, partial purification and some biochemical characteristics". *Enzyme Microbial Technol.*, **40**: 394-402.
- **Arzoglou, P.L., Ferard, G., Khalfa, F., Metais, P.** (1982). "Conditions for assay of pancreatic lipase from human plasma using a nephelometric technique". *Clin. Chem. Acta*, **45**: 119-329.
- **Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C., Verger, R.** (2000). "Methods for lipase detection and assay: a critical review". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **102**: 133-153.
- **Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P.** (2009). "Food Chemistry". 4<sup>th</sup> Ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Berne, R., Levy, M. (2001). Fisiología. Madrid: Harcourt.
- **Birari, R.B., Bhutani, K.K.** (2007) "Pancreatic Lipase Inhibitors from Natural Sources: Unexplored Potential". *Drug Discov. Today*, **12**: 879-889.
- **Biswas, A.K., Seoka, M., Takii, K., Kumai, H.** (2007). "Comparison of apparent digestibility coefficient among replicates and different stocking density in red sea bream Pagrus major". *Fish Sci.*, **73:** 19–26.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Hugejensen, B., Norskov, L., Thim, L. Menge, U. (1990). "A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase". *Nature*, **343**: 767-770.
- **Brocklehurst, K.** (1992). "Electrochemical assays: The pH-stat. En: Eisenthal, R. y M.J. Danson. Enzyme assays. A practical approach. Oxford university press. New York, USA. 191-216 p.

- **Brocklehurst, K**. (1992). Electrochemical assays: The pH-stat. En: Eisenthal, R. y M.J. Danson. Enzyme assays. A practical approach. Oxford university press. New York, USA. 191-216 p.
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., Oomah, B.D. (2010) "Minor Components of Pulses and Their Potencial Impact in Human Health". *Food Res. Int.*, **43**:461-482.
- Carrière, F., Barrowman, J.A., Verger, R., Laugier, R. (1993). "Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans". *Gastroenterol. J.*, **105**: 876-888.
- Carrière, F., Gargouri, Y., Moreau, H., Ransac, S., Rogalska, E., Verger, R. (1994). "Lipases: Their Structure, Biochemistry, and Application" (Ed. P. Woolley and S. B. Petersen). Cambridge University Press, Cambridge England, pp. 181-205.
- Ceriotti, F., Bonini, P.A., Murone, M., Barenghi, L., Luzzana, M., Mosca, A., Ripamonti, M., Rossi-Bernardi, L. (1985). "Measurement of lipase activity by a differential pH technique". Clin. Chem., 31: 257–260.
- **Colowick, S.P., Kaplan, N.O.** (1955-7). "Methods in Enzymology". *New York: Academic Press* vol. 2, pp. 334-337; vol. 3, pp. 981-1001.
- **Colowick, S.P., Kaplan, N.O.** (1955). "Preparation and assay of enzymes". Methods in Enzymology. New York: *Academic Press INC.*, *Publishers*. Vol. 1. 835 p.
- **De la Higuera, M., Cardente, G.** (1993). "La proteína en la nutrición de los peces". En: Castello, F. (ed). En: *Acuicultura Marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*: pp 195-225. Editorial Universidad de Barcelona. España.
- **De Witt Hepp A.** (1994). "Elaboración de Extruidos a base de mezclas de Lupino-cereales". Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales., Escuela de Agronomía. Tesis de Grado. 70 pp.
- **Den Bieman, H.,** (2000). "Los desafíos de la industria de alimento para peces". *Aquanoticias Internacional*, **12**: 59-60.
- **Desnuelle, P.** (1961). "Pancreatic lipase". *Adv. Enzymol.*, **23**: 129-161.
- **Desnuelle, P., Sarda, L., Ailhaud, G.** (1960). "Inhibition de la lipase pancréatique par le diethyl-p-nitrophényl phosphate en emulsion". *Biochim. Biophys. Acta*, **37**: 570-571.
- **Dickinson, E.** (2003). "Hidrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hidrocollids*, **17**: 25-39.

- **Dickinson, E., Stainsby, G.** (1988). "Advances in Food Emulsions and Foams". Elsevier Applied Science, Londres y Nueva York. E.U.
- **Feroci, G., Roda, A., Fini, A.** (2007) "Study of the Interaction between Oxygen and Bile Salts" *Bioelec.*, **70**: 524-531.
- **Francis, G., Harinder, P.S., Becker, M.K.** (2001). "Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish". *Aquaculture*, **199**: 197–227.
- **Glencross, B. D.** (2004). "Lupins". *Aqua Feeds: Formulation & Beyond, Research Division, Department of Fisheries, North Beach, Australia,* 1: 15 pp
- **Glencross, B., Hawkins, W.** (2004). "A comparison of the digestibility of lupin (*Lupinus sp.*) kernel meals as dietary protein resources when fed to either, rainbow trout ,*Oncorhynchus mykiss* or red seabream, *Pagrus auratus*". *Aquacult. Nutr.*, **10:** 65-73.
- **Glencross, B.D., Booth, M.A., Allan, G.L.** (2007). "A feed is only as good as its ingredients a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds". *Aquacult. Nutr.*, **13**: 17–34.
- Golding, M., Wooster, T.J. (2010) "The Influence of Emulsion Structure and Stability on Lipid Digestion". *Curr. Op. in Coll & Int. Sci.*, **15**: 90-101.
- **Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P.** (2004). "Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**: 763–81.
- **Hancock, J.D.** (1992). Contribution No. 92-316A. Kansas Agriculture Expansion Station. Published in Proceedings of the Distillers Feed Conference. Cincinnati, Ohio, **47**: 33-49 pp.
- **Hofmann, A. F. Borgstrom, B.** (1963). "Hidrolisis of long-chain monoglycerides in micellar solution by pancreatic lipase". *Biochim. Biophys. Acta*, **43**: 247.
- **Hofmann, A.F., Borgstrom, B.** (1962). "Physico-chemical state of lipids in intestinal content during their digestion and absorption". *Fed. Proc.*, **21**: 43-50.
- **Hofmann, A.F., Borgstrom, B.** (1964). "The intraluminal phase of fat digestion in man: the lipid content of the micellar and oil phases of intestinal content obtained during fat digestion and absorption". *J. Clin. Invest.*, **43**: 247-257.
- **Hu, M., Li, Y., Andrew, D., McClements, D.J.** (2010). "Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model." *Food Hydrocolloids* **24**: 719-725.

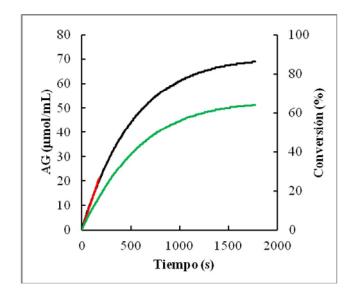
- **Hur, S.J., Decker, E.A., McClements, D.J.** (2009). "Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion". *Food Chem.*, **114:** 253–262.
- **Jensen, RG.** (1983) "Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources". *Lipids*, **18:** 650–657.
- **Kinsella, J. E.** (1979). "Functional properties of soy protein". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**: 242–258.
- **Kokotos, G.** (2003) "Inhibition of Digestive lipases by 2-Oxo Amide Triacylglycerol Analogues". *J. Mol. Cat. B: Enz.*, **22**: 255-269.
- Kumar-Rao, J.V., Johansen, C., Chauhan, Y.S., Chahan, Y.S., Jain, V.K., Jain K.C., Talwar, H.S. (2001). "An analysis of yield variation among long-duration pigeonpea genotypes in relation to season, irrigation and plant population". *J. Agric. Sci.*, **136:** 291-299.
- **Kumar, A., Chauhan, G.S.** (2010) "Extraction and Characterization of Pectin from Apple Pomace and Its Evaluation as Lipase (Steapsin) Inhibitor". *Carb. Polym.*, **82**: 454-459.
- **Li, Y., M. Hu., McClements, J.** (2011). "Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model: Proposal for a standardized pH-stat method." *Food Chem.*, **126**: 498-505.
- **Li, Y., McClements, D.J.** (2010). "New mathematical model for interpreting pH-stat digestion profiles: Impact of lipid droplet characteristics on in vitro digestibility". *J. Agric. Food Chem.*, **58**: 8085–8092.
- **Lissant, K. J.** (1984). "Emulsions and Emulsion Technology". Vol. VI. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. E.U.
- Madrid, A. (1994). "Tecnología del pescado y productos derivados". Ed. AMV, Madrid.
- **Marable, N.I., Sansone, G.** (1981). "*In vitro* assays of protein quality-assays utilizing enzymatic hydrolyses. Discussion In: Protein quality in humans: assessment and *in vitro* estimation (Bodwell, C.E., Adkins, J.S. y Hopkins, D.T., eds). AVI. Publishing Company. Westport, CT. 275 pp.
- Matsumara, Y., Satake, C., Egami, M., Mori, T. (2000). Interaction of gum arabic, maltodextrin and pullulan whit lipids in emulsions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**: 1827-1835.

- McClements, D.J., Decker, E.A., Park, Y. (2007). "Physicochemical and structural aspects of lipid digestion. In D. J. McClements (Ed.), Understanding and controlling the microstructure of complex foods 483–503 pp.
- McClements, D.J., Li, Y. (2010) "Structured Emulsion-Based Delivery Systems: Controlling the Digestion and Release of Lipophilic Food Components". *Adv. in Coll. Inter. Sci.*, **159**: 213-228.
- Moyano, F., Savoie, L. (2001). "Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes". *Comparative Bioch. and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology.*, **128**: 359–368.
- Moyano, F.J. y Savoie, L. (2001). "Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes". *Comp. Biochem. Physiol.*, A. **128**: 359-368.
- Mu, H., Hoy, C.E. (2004). "The Digestion of Dietary Triacylglycerols". *Prog. Lip. Res.*, 43: 105-133.
- Mun, S., Decker, E.A., Park, Y., Weiss, J., McClements, D.J. (2006). "Influence of interfacial composition on in vitro digestibility of emulsified lipids: Potential mechanism for chitosan's ability to inhibit fat digestion". Food Biophysics., 1: 21–29.
- Mun, S., Decker, E.A., McClements, D.J. (2007) "Influence of Emulsifier Type on *In Vitro* Digestibility of Lipid Droplets by Pancreatic Lipase". *Food Res. Int.*, **40**: 770-781.
- **Navarrete-del-Toro, M.A., García-Carreño, F.L.** (2002). "Evaluation of the progress of protein hydrolysis". En: Unit B. Biochemical compositional analyses of protein. Current protocols in food analytical chemistry. Editorial John Wiley and Sons. Vol 1.
- **Neves Petersen, M.T., Fojan, P., Petersen, S.B.** (2001). "How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution". *J. Biotech.*, **85**: 115-147.
- **Noor, M., Hasan, M., Ramachandran, K.B.** (2003). "Effect of Operating Variables on the Hidrolysis Rate of Palm Oil by Lipase". *Process Biochem.*, **39:** 13-20.
- **Pearce, K.N., Kinsella, J E.** (1978). "Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique". *J. Agric. Food Chem.*, **26**: 716–723.
- **Pereira, T.G., Oliva-Teles, A.** (2003). "Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles". *Aquacult. Res.*, **34:** 1111–1117.
- **Petterson, D.S.** (1998). "Composition and food uses of lupins. In J. S.Gladstones, C. Atkins, & J. Hamblin (Eds.), Lupins as crop plants: biology, production and utilization Oxon, UK: CAB International. 353–384 pp.

- **Porter, C.J.H., Trevaskis, N.L., Charman, W.N.**(2007). Lipidsandlipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6:** 231-248.
- **Rapp, P.** (1995). "Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum". Enzyme Microbiol. Technol., **9**: 832-838.
- Reis, P., Watzke, H., Leser, M., Holmberg, K., Miller, R. (2010) "Interfacial Mechanism of Lipolysis as Self-Regulated Process". *Bioph. Chem.*, **147**: 93-103.
- **Ruusunen, M., Puolanne, E.** (2005). "Average muscle fibre cross sectional area varies considerably in pork loins". 51st International Congress of Meat Science and Technology. Baltimore, USA
- **Sarda, L. Desnuelle, P.** (1958). "Action de la lipase pancréatique sur les esteres en émulsion". *Biochim. Biophys. Acta*, **30**: 513-521.
- **Sarkar, A., Goh, K.T., Singh, H.** (2009). "Colloidal stability and interactions of milk-protein-stabilized emulsions in an artificial saliva". *Food Hydrocolloids*, **23**: 1270–1278.
- **Sharma, N., Sharma, V.K, Seo, S.Y.** (2005). "Screening of Some Medicinal Plants for Anti-Lipase Activity". *J. Ethnopharm.* **97**:453-456.
- **Tacon, A.** (1994). "Feed ingredients for carnivorous fish species alternatives to fish meal and other fishery resources". *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 35 pp.
- **Tibbetts, S. M., Milley, J.E., Ross, N.W., Verreth, J.A.J., Lall, S.P.** (2011). "*In vitro* pH-Stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, Gadus morhua. 1. Development of the method." *Aquaculture.*, **319:** 398-406.
- **Valencia, R.** (2006). "Soya (*Glicine max* (L.) Merril): Alternativa para los sistemas de producción de la Orinoquia colombiana". Ed. Guadalupe Ltda. Bogotá, D.C.
- **Xu, X.** (2000). "Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **102**: 287-303.
- **Zangenberg, N.H., Mullertz, A., Kristensen, H.G., Hovgaard, L.**(2001a). "A dynamic *in vitro* lipolysis model I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium". *Eur. J. Pharmaceutical Sci.*, **14:** 115-122.

## **ANEXOS**

Anexo 1: Curva tipo, obtenida en cada análisis por medio del programa, acoplado al pH-stat.



A continuación se muestran las tablas con los análisis estadísticos utilizados en este trabajo de investigación. Sólo se muestra las tablas realizadas para la evaluación de linaza, a modo de ejemplo.

Anexo 2. Tabla de análisis de varianza de un factor (concentración), para linaza. Respuesta: actividad enzimática.

						Valor
Origen de las	Suma de	Grados de	Promedio de			crítico
variaciones	cuadrados	libertad	los cuadrados	F exp	Probabilidad	para F
Entre grupos	966450,99	6	161075,16	72,08	6,15×10 <sup>-6</sup>	3,87
Dentro de los						
grupos	15641,70	7	2234,53			
Total	982092,69	13	_			

Anexo 3. Tabla de análisis de varianza de un factor (concentración), para linaza. Respuesta: % de conversión TGs.

						Valor
Origen de las	Suma de	Grados de	Promedio de los	$\boldsymbol{F}$		crítico
variaciones	cuadrados	libertad	cuadrados	exp	Probabilidad	para F
Entre grupos	145,37	6	24,23	5,39	0,02	3,87
Dentro de los						
grupos	31,47	7	4,50			
Total	176,85	13				

Anexo 4. Tabla de análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

Origen de las	Suma de	Grados de	Promedio de	F		Valor crítico
variaciones	cuadrados	libertad	los cuadrados	ехр	Probabilidad	para F
(Concentración)	435357,4	2	217678,7	88,1	$3,57\times10^{-5}$	5,1
(Procesamiento)	238927,2	1	238927,2	96,7	6,36×10 <sup>-5</sup>	6,0
Interacción	31018,3	2	15509,2	6,3	0,034	5,1
Dentro del						
grupo	14818,0	6	2469,7			
Total	720120,9	11				

Anexo 5. Tabla de análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

						Valor
Origen de las	Suma de	Grados de	Promedio de			crítico
variaciones	cuadrados	libertad	los cuadrados	F exp	Probabilidad	para F
(Concentración)	7,89	2	3,95	0,76	0,51	5,14
Procesamiento	117,65	1	117,65	22,60	0,00	5,99
Interacción	0,71	2	0,35	0,07	0,94	5,14
Dentro del						
grupo	31,24	6	5,21			
Total	157,49	11				

Anexo 6. Tabla Test de Duncan

		v							
	C	(mmol/min		Conversión		v/v	C/C		
	(mg/mL)	g)	DE	(%)	DE	control	control	V	c
C	0,0	1612,2	28,7	64,4	0,5				
LiD	2,3	1081,5	20,9	63,3	1,8	0,67	0,98	d	a,b
	4,5	1344,8	13,7	64,1	0,3	0,83	1,00	b	a,b
	6,8	1662,8	58,6	65,1	1,3	1,03	1,01	a	a
LiED	2,3	886,8	61,9	56,6	0,7	0,55	0,88	e	c
	4,5	1117,6	17,3	58,6	4,3	0,69	0,91	c,d	b,c
	6,8	1238,0	81,4	58,6	2,7	0,77	0,91	b,c	b,c