



DETERMINACIÓN DE LA LIPÓLISIS DIGESTIVA MEDIANTE EL MÉTODO DEL pH-STAT

Apellidos, nombre	Asensio Grau, Andrea (anasgr@upvnet.es) Calvo Lerma, Joaquim (joacalle@upvnet.es) Heredia Gutiérrez, Ana (anhegu@tal.upv.es) Andrés Grau, Ana (aandres@tal.upv.es)
Departamento	Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Centro	Universitat Politècnica de València



1 Resumen de las ideas clave

Los lípidos son fundamentales para la salud humana ya que intervienen en diversos procesos biológicos del organismo. Por ello, tanto factores estructurales del alimento como las condiciones del medio digestivo pueden influir facilitando o dificultando la digestión de los mismos. En los últimos años, el área de tecnología de los alimentos ha mostrado un interés creciente en estudiar la influencia de estos factores sobre la digestibilidad de los macronutrientes, especialmente los lípidos pues presentan un proceso más complejo de digestión que carbohidratos o proteínas. En este sentido, las metodologías de digestión *in vitro* se presentan como una alternativa analítica para esta finalidad.

La simulación de la digestión de un alimento en el laboratorio, así como la determinación de la lipólisis, se pueden realizar por distintos métodos. En este artículo detallamos cómo analizar la digestión de la grasa, o lipólisis, de un alimento, a través del método del pH-stat, que ofrece la doble ventaja de reproducir la digestión gastrointestinal en el laboratorio, así como de monitorizar el proceso de lipólisis en continuo. Este método se fundamenta en una valoración ácido-base en continuo y automatizada, de forma que el equipo añade el volumen de NaOH necesario para neutralizar la acidificación del medio provocada por la liberación de ácidos grasos a medida que avanza la digestión. Posteriormente, el volumen de NaOH, como valorante a lo largo del proceso, se utiliza para calcular el porcentaje de lipólisis alcanzado.

2 Introducción

Los lípidos son biomoléculas orgánicas formadas principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno. Se caracterizan por ser insolubles en agua y por su baja densidad. También son conocidos comúnmente como "grasas" y constituyen uno de los principales macronutrientes, junto a carbohidratos y proteínas, que conforman los alimentos. La mayoría de los lípidos son triglicéridos (96%), y están formados por tres moléculas de ácidos grasos unidos a una de glicerol.

Para que los macronutrientes de los alimentos puedan ser absorbidos en el intestino, es necesario sean previamente hidrolizados. El proceso de digestión consiste en la descomposición de los macronutrientes de los alimentos en moléculas más simples que pueden ser absorbidas por el organismo. Para ello, diferentes enzimas digestivas tales como lipasas, proteasas y amilasas, se encargan de la hidrólisis de los lípidos, proteínas e hidratos de carbono, respectivamente.

La lipólisis, también conocida como digestión o hidrólisis de los lípidos, consiste en la ruptura de los enlaces que mantienen los ácidos grasos unidos al glicerol. La lipasa es la enzima encargada de mediar esta reacción. De los tres puntos de anclaje que tienen los ácidos grasos al glicerol, las lipasas son específicas de los dos puntos de anclaje externos. De esta manera, de la lipólisis completa resultan dos ácidos grasos libres y un monoglicérido, es decir, un glicerol con una cadena de ácido graso unida. Asimismo, si la lipólisis es parcial y solo se hidroliza por una de las posiciones de los extremos (1 ó 3), el proceso da como resultado la liberación de un ácido graso, quedando el resto de la molécula como diglicérido (dos ácidos grasos unidos a un glicerol).

El proceso digestivo consta principalmente de tres etapas: oral, gástrica e intestinal. La digestión de la grasa ocurre principalmente en la etapa intestinal, gracias a la acción



de las lipasas pancreáticas. Una vez liberados, los ácidos grasos son absorbidos por las células epiteliales del intestino delgado pasando al torrente sanguíneo. Para que los ácidos grasos estén disponibles para el organismo, primero han de estar accesibles. Por ello, la extensión de la lipólisis puede estimarse como la cantidad de ácidos grasos liberados y que son accesibles para el organismo [1].

La digestibilidad de la grasa depende de varios factores, entre los que se la estructura molecular del triglicérido en cuanto a la posición que los ácidos grasos ocupan, el tipo de ácidos grasos (número de átomos de carbono o longitud de cadena (corta, media o larga) y el número de dobles enlaces (saturados, monoinsaturados o poliinsaturados) presentes en las cadenas. Asimismo, la matriz estructural del alimento también condiciona la extensión de la lipólisis ya que modula el acceso de las lipasas al sustrato, es decir a los lípidos. Finalmente, las condiciones del medio digestivo han demostrado ser determinantes en el proceso de lipólisis, de tal manera que, si no son las óptimas, especialmente a nivel intestinal (pH 7, concentración de sales biliares 10 mM), la extensión de la lipólisis se verá disminuida, a distintos niveles, en función del tipo de alimento [2,3]. En este sentido, existen algunas patologías con afectación en los órganos y procesos que intervienen en la digestión, tales como la insuficiencia pancreática exocrina, la fibrosis quística o diferentes alteraciones hepáticas. Por ello, el área de tecnología de alimentos ha mostrado un gran interés no sólo en el diseño de alimentos sino también en estudiar cómo se comportan durante la digestión, ya que de esta va a depender su eventual función biológica. Gracias a estos estudios de digestibilidad in vitro es posible simular las condiciones fisiológicas de la digestión en el laboratorio. Esta metodología se caracteriza por la simulación de los fluidos digestivos (por ejemplo, la saliva con la enzima alfa-amilasa o el jugo pancreático con la enzima lipasa) y la adecuación de las condiciones del medio (el pH, la concentración de electrolitos, de sales biliares, etc.). Así, es posible estudiar y caracterizar la digestibilidad de grasa de un alimento. Las aplicaciones prácticas incluyen el diseño de alimentos que permitan modular la digestión de la grasa mediante su procesado con el fin de promoverla o inhibirla, por ejemplo, o poder anticipar la extensión final de lipólisis que se alcanzará según el tipo de alimento y de condiciones del medio digestivo.

3 Objetivos

El objetivo de este artículo docente es **mostrar al estudiante el protocolo a seguir la cinética y extensión de la lipólisis digestiva en alimentos mediante el método pH-stat.**

Los objetivos específicos son:

- Conocer el fundamento teórico del método pH-stat
- Reproducir la digestión in vitro de un alimento mediante pH-stat
- Cuantificar la cinética y la extensión de la lipólisis de un alimento a partir de los datos contenidos con el método pH-stat.

4 Desarrollo

A continuación, describimos el fundamento y las etapas del proceso experimental para digestión in vitro de un alimento (leche) y la simultánea determinación de la cinética y la extensión de la lipólisis con el método del pH-stat.

4.1 Fundamento del método

La lipólisis, o hidrólisis de un triglicérido, produce la liberación de ácidos grasos, los cuales acidifican el medio en el que tiene lugar la reacción. El método del pH-stat consiste en simular la digestión de la grasa en un medio a pH constante. El equipo consta de una sonda de medida del pH y otra de liberación automática de un valorante alcalino. La cuantificación de la cinética y de la extensión de la lipólisis se fundamenta en la liberación de este valorante al medio en el volumen necesario para compensar la bajada del pH producida por la liberación de ácidos grasos a medida que avanza la lipólisis, manteniendo siempre el pH del medio constante (por eso se conoce el método como pH-stat). Así pues, el fundamento es una valoración ácido-base automatizada y en continuo.

Terminado el experimento, el volumen de valorante añadido es convertido a la unidad de "% de lipólisis". El equipo registra la adición de volumen de valorante cada 10 segundos. Así, terminado el experimento, se dispone de un gran número de datos, que permiten determinar la cinética (% digestibilidad a cada tiempo) y la extensión (% de digestibilidad en el punto final) de la lipólisis.

4.2 Materiales y reactivos

Primeramente, se especifica el material y reactivos necesarios para poder llevar cabo ensayos de digestión in vitro de alimentos y determinación de la extensión de la lipólisis por pH-stat.

Material e instrumentación

- Baño de agua
- Pez de agitación magnética
- Balanza analítica
- Vidrio de reloj
- Vasos de precipitado de 200 mL
- Matraz aforado de 100 mL
- Cubetas de pesada
- Bureta de 100 mL

Reactivos químicos y enzimáticos

- NaCl 0,9%
- HCl 1N
- NaOH 1N
- Pepsina de origen porcino
- Bilis bovina
- Pancreatina porcina

Equipamiento específico

- **718 pH-stat Titrino (Methrom)**
- Software Tiamo 1.3

4.3 Procedimiento experimental

Este objeto de aprendizaje detalla el cómo simular el proceso de digestión gastrointestinal de un alimento en el laboratorio para poder determinar simultáneamente la digestión de la grasa, mediante el método del pH-stat [4]. Para ello, simulamos para cada etapa digestiva las condiciones fisiológicas en cuanto a enzimas y fluidos digestivos, pH y duración. Como ejemplo de alimento de estudio, hemos seleccionado la leche, por ser una matriz alimentaria sencilla en forma de emulsión natural de glóbulos grasos en suero lácteo.

El primer paso del procedimiento experimental será mostrar las condiciones de simulación de cada etapa del proceso. A continuación, prepararemos los fluidos digestivos simulados. Seguidamente, presentamos el equipo pH-stat y sus componentes. Finalmente, definimos las condiciones que se deben programar con el software informático para automatizar la determinación de la lipólisis.



Simulación del proceso gastro-intestinal

Como indicamos al inicio, la simulación de la digestión es una reproducción, de forma simplificada, del proceso fisiológico en el laboratorio. De entre todos los parámetros que podríamos simular en el laboratorio, de manera consensuada a nivel internacional, se han establecido cuales son los más relevantes. Éstos son: la proporción entre alimento y fluidos digestivos, la presencia y concentración de las enzimas principales, el pH al que ocurre cada etapa, y la duración de cada una de ellas. A continuación, detallamos las condiciones de cada etapa. Previamente a la digestiva simulada de la leche, es necesario preparar los fluidos digestivo simulados, cuya composición se detalla a continuación:

Preparación de los fluidos digestivos simulados

Preparamos los fluidos digestivos simulados sobre la base de una solución salina (NaCl al 0.9%) a la que añadiremos soluciones enzimáticas y de otros componentes, específicos de cada etapa, ajustando el pH.

- Fluido salivar simulado (FSS): se requieren 5 mL por experimento. Se prepara con 4.5 mL de la solución de salina salival, ajustando el pH hasta 7 y enrasando hasta 5 mL con agua destilada. En este caso no se añade la solución de alfa amilasa ya que se trata de un alimento sin carbohidratos complejos.
- Fluido gástrico simulado (FGS): se requieren 10 mL por experimento. Se prepara con 7.5 mL de solución salina a la que añadiremos 2 mL de solución de enzima pepsina (5.5 mg pepsina/mL de solución salina) 5 μ L de CaCl_2 , unos 0.2 mL de HCl 1N (hasta ajustar a pH 2) y unos 0.2 mL de H_2O destilada, hasta enrasar a 10 mL.
- Fluido intestinal simulado (FIS): es el más complejo, y se requieren 20 mL por experimento. Para prepararlo, partiremos de una base de 11 mL de solución salina a la que incorporaremos 5 mL de solución de pancreatina (0.25 g pancreatina/mL solución salina), 2.5 mL de solución de bilis (0.077 g bilis bovina/mL solución salina), 40 μ L de CaCl_2 , y aprox. 0.15 mL de NaOH 1N (hasta ajustar a pH 7), y enrasaremos con H_2O destilada, hasta enrasar a 20 mL.

Una vez tenemos preparados los fluidos, podemos comenzar a simular la digestión. Puesto que estamos trabajando con un sistema estático, ésta va a consistir en la adición de los fluidos a los tiempos requeridos y el reajuste del pH del medio al indicado tras cada transición de fase.

Simulación de la digestión gastrointestinal de la leche:

Etapa oral: al tratarse de un alimento líquido, omitimos la simulación de la masticación. Esta etapa ocurre fuera del equipo pH-stat. En un matraz incorporamos el fluido salival simulado (FSS) a 5 g de muestra alimento (leche), es decir, en proporción 1:1 (p/v) y lo dejamos actuar durante 3 minutos.

Etapa gástrica: incorporamos la mezcla alimento + SSS al vaso de reacción del equipo. Seguidamente añadimos el fluido gástrico simulado (FGS), que contiene la pepsina (concentración 2000 U/mL), en proporción 1:1 (v/v) a la muestra tras la fase oral. Ajustamos el pH hasta 3 mediante adición manual de HCl 0.5 N. Tiene una duración de 2h.

Etapa intestinal: incorporamos el fluido intestinal simulado (FIS), formado por la pancreatina (lipasa, alfa-amilasa, tripsina y quimiotripsina) y la bilis (concentración 10 mM en el volumen final), en proporción 1:1 (v/v) a la muestra tras la fase gástrica. Esta etapa ocurre a pH 7. En esta fase tiene lugar la lipólisis gracias a la lipasa pancreática presente en el FIS. Tiene una duración de 2h.

Digestión gastrointestinal en pH-stat

Vamos a simular la digestión gastrointestinal con el equipo de valoración automática pH-stat (718 pH-stat titrino). Este equipo consta de 4 componentes principales (**Figura 1**). Una vez preparados los fluidos digestivos, y antes de empezar la simulación, debemos familiarizarnos con el equipo. En la parte central encontramos el vaso de reacción donde se añade la muestra alimento tras la etapa oral, y actúa como el compartimento de simulación de las etapas gástrica e intestinal, según la configuración explicada en el apartado siguiente. Se sitúa sobre un agitador que mantiene el contenido digestivo simulado en régimen de agitación orbital durante todo el proceso. Una camisa de agua a 37 °C envuelve el vaso, conectada a un baño de temperatura como fuente. A través de la tapa del vaso, se conectan electrodos de medición de temperatura y pH que permiten configurar y monitorizar las condiciones del experimento. Asimismo, un catéter de dispensación del valorante conectado a un dosificador automático permiten la adición del mismo al vaso de reacción de forma automática en función de las condiciones del experimento. Sobre el dispositivo Titrino se sitúa el frasco con el valorante, que permitirá realizar los cambios de pH en el medio cuando sea preciso. En referencia a la dosificación automática, el equipo permite fijar criterios como "dosing rate" o "titration rate". Finalmente, la tapa del vaso cuenta con una apertura para poder incorporar con la pipeta los fluidos digestivos en las distintas etapas. El sistema se encuentra conectado a un software (Tiamo v1.3), a través del cual se programan las etapas y las condiciones de la determinación antes de empezar el experimento. El software recoge además todos los datos del experimento de forma continua: temperatura, pH y volumen de valorante añadido.

Antes de empezar la determinación se deberán tener en cuenta las siguientes acciones:

- Calentar el baño a 37 °C
- Disponer el frasco con el valorante (NaOH 1 N *) sobre el dispositivo Titrino
- Colocar los electrodos y el catéter de dispensación automática sobre la tapa del vaso analizador
- Configurar las condiciones de experimento con el software del equipo

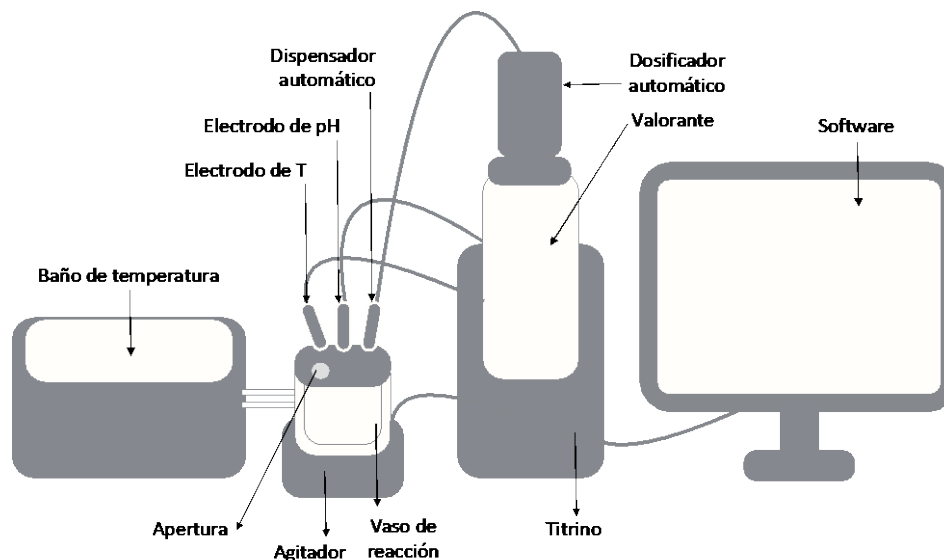


Figura 1. Esquema de los componentes del equipo pH stat

*** Es IMPRESCINDIBLE reajustar la concentración del valorante y la velocidad de titulación para cada matriz que se desee ensayar.**



Configuración del software de valoración automática

El software del equipo permite configurar el método para realizar el experimento mediante bloques que se añaden a un diagrama de flujo. Para cada bloque, se especifican unas condiciones determinadas, como pH, duración o velocidad de agitación. Para la determinación de lipólisis intestinal, llevaremos a cabo la etapa oral de forma externa al equipo, de tal manera que la configuración del método con el equipo será relativa a las etapas gástrica e intestinal. En este apartado, utilizaremos el vocabulario específico del equipo.

En el caso de medir la lipólisis, configuraremos el método con 5 bloques o pasos según las especificaciones en la **Figura 2**. A continuación, detallamos lo que haremos en cada etapa.

- 1) INICIO: incorporamos la muestra alimento con el FGS. Le daremos a "next"
- 2) MEASURE PH: (etapa gástrica) Ajustaremos manualmente con HCl 1N hasta conseguir pH objetivo 3 y dejamos transcurrir la etapa gástrica. Pasadas 2h incorporamos el FIS, y el equipo saltará al paso 3 automáticamente.
- 3) SET PH: una vez incorporado el FIS, el equipo ajusta el pH a 7, dando comienzo a la simulación intestinal. Una vez alcanzado el pH objetivo (7), saltará al paso 4 automáticamente.
- 4) STAT PH: (etapa intestinal) durante 2h, el equipo mantendrá el pH del medio constante en valor de 7 mediante la adición del valorante (NaOH 1 N), en el volumen necesario para neutralizar la acidificación provocada por la liberación de ácidos grasos, como consecuencia de la lipólisis. Terminadas las 2h de duración, se pasa inmediatamente al paso 5.
- 5) DATABASE: el equipo transfiere la información generada durante el experimento (Tabla 1) a una base de datos, que podremos exportar a formato de hoja de cálculo para trabajar sobre los resultados.

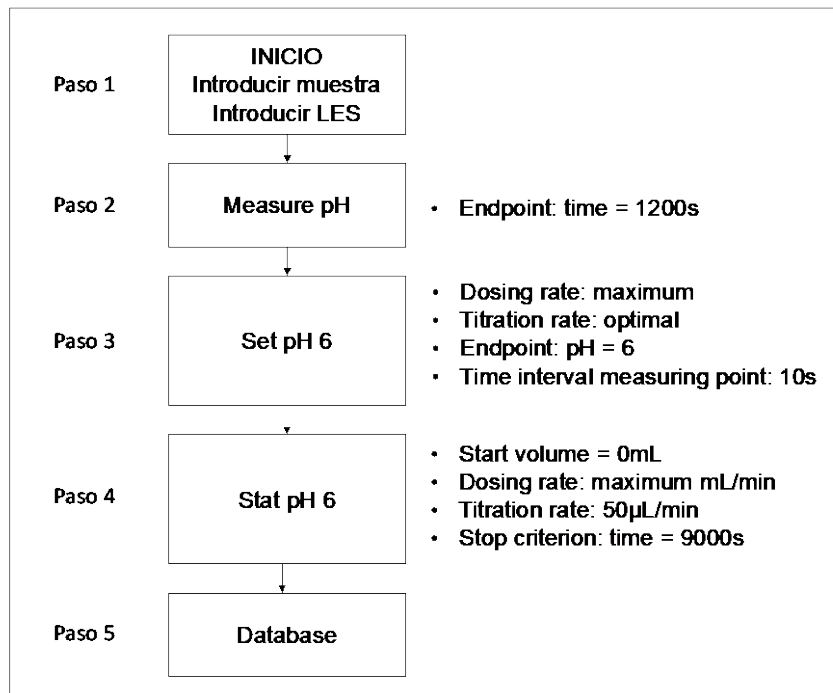


FIGURA 2. Diagrama de las etapas del método de análisis diseñado con el software Tiamo 1.3. y los parámetros seleccionados para cada una de ellas. Se ilustra el método utilizado para pH 6: para pH 7 el método es el mismo, cambiando los valores de pH a 7 en los pasos 3 y 4.

4.4 Cuantificación e interpretación de los resultados

Transcurrido el tiempo del experimento, el equipo genera de forma automática una base de datos en la que se recogen los valores de temperatura, pH y volumen del valorante añadido para cada intervalo de tiempo (10 s) de la fase intestinal (es decir, de la etapa "pH-stat"). Esta base de datos se puede exportar para trabajar con los datos (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplo de base de datos exportada tras la etapa de pH-stat

Tiempo (s)	T° (°C)	pH	Volumen NaOH (mL)
5,04	37,00	6,982	0
14,96	37,00	6,993	0,045
24,96	37,00	7,005	0,065
34,96	37,01	6,998	0,07
44,96	37,00	7,032	0,12
54,96	37,00	7,025	0,12
64,96	37,00	7,018	0,12
74,96	37,00	7,012	0,13
84,96	37,01	7,005	0,14
...
9004,5	37,00	7	14,24

El porcentaje de ácidos grasos liberados (AGL (%)) o porcentaje de digestibilidad de los lípidos, se calcula en base al volumen consumido de NaOH durante la etapa pH-stat, tomando como referencia el ácido oleico y la cantidad de sustrato (de lípidos) en la muestra (**Ecuación 1**).

$$AGL (\%) = \frac{(V \text{ NaOH (mL)})(N \text{ NaOH})(PM \text{ Ác.oleico})(100)}{m \text{ sustrato (mg)}} \quad (1)$$

Donde: $V \text{ NaOH}$ = volumen de valorante alcanzado en cada punto (mL); $N \text{ NaOH}$ = concentración utilizada del valorante (N); $PM \text{ Ác. Oleico}$ = peso molecular del ácido oleico; y $m \text{ sustrato}$ = masa de grasa de la muestra (g).

A modo de ejemplo, vamos a calcular el % de AGL liberados a tiempo = 94.46 s, según los datos recogidos en la Tabla 1. En este caso, el valorante utilizado tenía una concentración 1 N, se tomó como referencia el ácido oleico (Peso molecular = 282,75) y el sustrato utilizado, leche de vaca, tenía un 3,5% de grasa, es decir, 0,175 g en 5 g de muestra empleada en el experimento.

$$AGL (\%) = \frac{(0,13 \text{ mL})(1)(282,47)(100)}{175 \text{ mg}} = 20,98\%$$

De esta manera, podemos obtener el valor de "Extensión de la lipólisis" considerando el % AGL a tiempo final. Para la obtención de la "Cinética de la lipólisis" representamos la dispersión de la matriz "tiempo / % AGL" con todos los valores de la tabla (La **Figura 3** muestra un ejemplo). Como se observa en la misma, la cinética de lipólisis se caracteriza por tres tramos: un periodo breve de activación, donde la pendiente o velocidad es relativamente baja; una etapa de velocidad constante, en la que se produce la mayor parte de la lipólisis; y una etapa de velocidad decreciente, en la que la mayor parte de la lipólisis ya ha ocurrido y tan solo permanece la actividad residual de la enzima, la cual permite alcanzar valores próximos al 100% de % AGL a los 120 minutos de simulación de la fase intestinal.

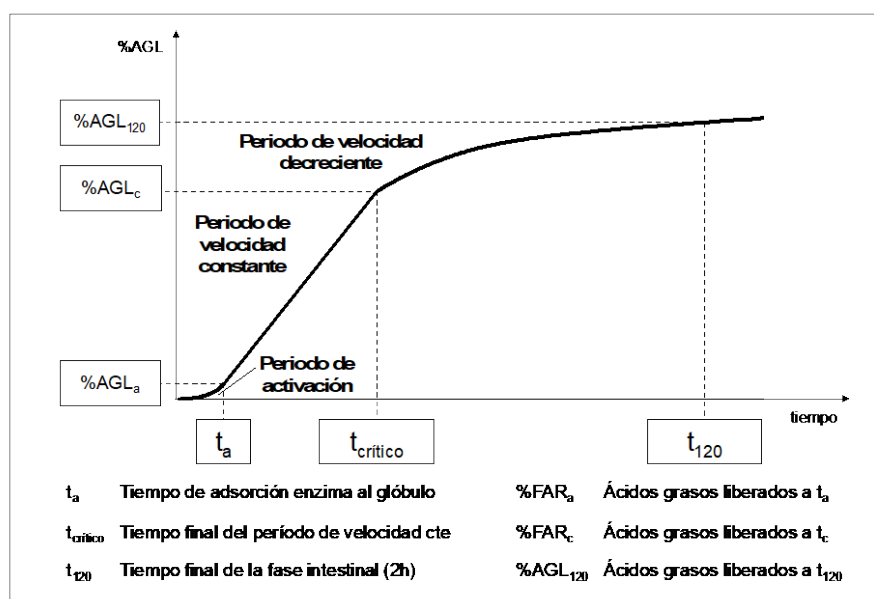


Figura 3. Curva modelo del progreso de la lipólisis con los parámetros característicos que definen cada uno de los periodos.



5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje, el estudiante ha aprendido cómo reproducir en el laboratorio el proceso de digestión gastrointestinal de un alimento (leche) y de forma simultánea, determinar la lipólisis durante la etapa intestinal de la misma, utilizando el método del pH-stat.

6 Bibliografía

[1] Hunter, J. E. (2001). Studies on Effects of Dietary Fatty Acids as Related to Their Position on Triglycerides. *Lipids*, 36(7), 655-668

[2] Asensio-Grau, A., Peinado, I., Heredia, A., & Andrés, A. (2018). Effect of cooking methods and intestinal conditions on lipolysis, proteolysis and xanthophylls bioaccessibility of eggs. *Journal of Functional Foods*, 46, 579-586.

[3] Guo, Q., Ye, A., Bellissimo, N., Singh, H., & Rousseau, D. (2017). Modulating fat digestion through food structure design. *Progress in Lipid Research*, 68, 109-118.

[4] Calvo-Lerma, J., Fornés-Ferrer, V., Heredia, A., & Andrés, A. (2019). In vitro digestion models to assess lipolysis: The impact of the simulated conditions of gastric and intestinal pH, bile salts and digestive fluids. *Food Research International*, 125, 108511.