LAS PROTEÍNAS DE SOJA PERMITEN CONTROLAR LA DIGESTIÓN DE LÍPIDOS EMULSIONADOS COMO UNA POTENCIAL ESTRATEGIA PARA CONTRIBUIR A LA DISMINUCION DE LAS ENFERMEDADES NO TRANSMISIBLES: UTILIDAD DE MODELOS *IN VITRO*

Bellesi, Fernando A[1,2], Naso Julieta N[1,3], Pizones Ruiz-Henestrosa Víctor M[1,2], Pilosof Ana M R[1,2]
fernandobellesi@gmail.com; julietannaso@gmail.com; vicprh@gmail.com; pilosofana@gmail.com
1- ITAPROQ- Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina.
2-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.
3-Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina.

RESUMEN
Las proteínas de soja (SPI) son proteínas vegetales de importancia comercial por sus propiedades nutricionales y funcionales, entre ellas sus propiedades emulsionantes. Este trabajo proporciona evidencia que estas proteínas cuando se usan como emulsionantes, disminuyen la lipólisis de un aceite emulsionado. Esto permitiría controlar la digestión de lípidos (bioaccesibilidad) constituyendo una estrategia para hacer frente a enfermedades no transmisibles asociadas con la elevada absorción de lípidos como la obesidad y las enfermedades cardiovasculares. El grado de lipólisis de emulsiones estabilizadas por SPI (en comparación con emulsiones de β–lactoglobulina y Tween 80), se evaluó mediante el método pH-stat. Durante la fase duodenal de la digestión *in vitro*, las emulsiones de SPI mostraron el menor grado de lipólisis. Este comportamiento se relacionó con la capacidad de SPI para interactuar y reducir la actividad de las sales biliares (SB), componentes fisiológicos cruciales en el proceso de lipólisis. Las determinaciones interfaciales mostraron que la película interfacial formada por SPI presentó una baja susceptibilidad a la penetración de SB. Estudios en solución acuosa mostraron que SPI interactúa con las SB provocando su precipitación y consecuentemente reduciendo su capacidad para solubilizar los productos de la lipólisis. El grado de unión de las SB por SPI en el fluido intestinal simulado fue del 65,34 % relativo a la colesteramina, fármaco conocido por su capacidad de ligar SB. Se puede concluir que SPI presenta el potencial de modular la digestión de lípidos y, en consecuencia, podría reducir el impacto negativo asociado con el alto consumo de alimentos hiperlipídicos.

INTRODUCCIÓN
Según datos publicados por la organización mundial de la salud (OMS), las enfermedades no transmisibles (ENT), tienden a ser de larga duración y resultan de la combinación de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y conductuales. Las principales tipos de ENT son la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes. Las ENT afectan desproporcionadamente a los países de ingresos bajos y medios, donde se registran más del 75% (32 millones) de las muertes por estas enfermedades (OMS, 2016). Si bien las ENT se suelen asociar a los grupos de edad más avanzada, los datos reportados (2016) mostraron que 15

millones de todas las muertes atribuidas a las ENT se produjeron entre los 30 y los 69 años de edad. Es así que niños, adultos y ancianos son todos ellos vulnerables a los factores de riesgo que favorecen las ENT, entre ellos, las dietas malsanas o hipercalóricas y el sedentarismo. Según los datos reportados por la OMS, desde 1975 a la actualidad, los casos de obesidad se han triplicado alrededor del mundo por lo cual ha sido denominada como la epidemia del siglo XX. Este organismo sostuvo que en el año 2016, el 39% de las personas adultas tenían sobrepeso y el 13% eran obesas. Argentina no es ajena a esta tendencia, según la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo publicada por el Ministerio de Salud y el INDEC (2019)[1] el 61,6% de los argentinos tiene exceso de peso, en una proporción de 36,2% de personas con sobrepeso y 25,4% con obesidad. Los datos confirman el avance de la epidemia, si se considera que la obesidad alcanzó en el último estudio a un cuarto de la población y aumentó desde 2005 a la actualidad en casi 11 puntos porcentuales. Este avance está condicionado por las modificaciones de los regímenes alimentarios derivados de las variaciones en la disponibilidad y accesibilidad a los alimentos, la globalización de hábitos alimentarios y las tendencias a una menor actividad física por el desarrollo científico-tecnológico, la modernización de la economía y la urbanización. Siendo la dieta uno de los principales factores de riesgo que predisponen al desarrollo de obesidad y otras ENT, la ingeniería en alimentos tiene un desafío importante por delante, centrado en el desarrollo de nuevos alimentos e ingredientes funcionales que puedan hacer frente a estas enfermedades.

El desarrollo de estrategias que permitan controlar la digestión de lípidos dentro del tracto gastrointestinal humano podría dar lugar al diseño de alimentos funcionales que disminuyan el riesgo de sufrir enfermedades asociadas con la alta absorción de lípidos como la obesidad y las enfermedades cardiovasculares. Además, este conocimiento es importante para el desarrollo de sistemas de administración basados en lípidos que tienen como objetivo facilitar la incorporación de sustancias bioactivas (vitaminas liposolubles, ácidos grasos esenciales, fármacos, etc.) que presentan beneficios para la salud[2,3].

En la mayoría de los alimentos procesados, los lípidos son consumidos en forma emulsionada, es decir como emulsiones de aceite en agua (o/w), donde se encuentran dispersos en forma de gotas en un medio acuoso contínuo. La superficie de estas gotas se encuentra cubierta por una capa de moléculas interfacialmente activas (emulsionantes), como proteínas, polisacáridos o sustancias de bajo peso molecular. Estas moléculas se adsorben en la interfase o/w jugando un papel importante, no solo en la formación y estabilidad de las emulsiones, sino también en su comportamiento durante el recorrido por el tracto gastrointestinal[4]. Numerosos trabajos en la literatura han evidenciado que las características de la película interfacial que rodea las gotas en una emulsión puede influir en el grado de digestión de los lípidos emulsionados, así como en la tasa de liberación de cualquier componente lipofílico atrapado en dicha emulsión[5–7]. Estos descubrimientos guardan relación con el hecho de que la lipólisis es un proceso interfacial, es decir que tiene lugar en la interfase o/w, sitio donde se encuentra la película interfacial del emulsionante y donde debe absorberse la enzima responsable de la digestión de lípidos, la lipasa pancreática. En el duodeno, donde se desarrolla la lipólisis en un 80%, la actividad de la lipasa pancreática, es facilitada por la presencia de sales biliares (SB), sintetizadas en el hígado y liberadas al duodeno a partir de la vesícula

biliar[8]. Estas moléculas, tienen actividad interfacial, por lo cual se adsorben en la interfase o/w, facilitando la emulsión de los lípidos, lo que da lugar a un incremento del área interfacial expuesta a la lipasa pancreática. La misma a continuación y en asociación con la colipasa, se adsorbe en la interfase para dar lugar a la hidrólisis de los triglicéridos (TG) y la consecuente liberación de una molécula de monoglicérido y dos ácidos grasos (AGL) por cada TG hidrolizado. Finalmente, estos productos luego se incorporan a las micelas de SB para ser transportados hacia el epitelio intestinal donde son absorbidos por los enterocitos. De esta forma, las SB remueven los productos de la digestión liberando la interfase para la continua actividad de la lipasa pancreática, garantizando la eficiencia del proceso de lipólisis[2,9,10].

Dilucidar el comportamiento de los alimentos en el tracto gastrointestinal es esencial para comprender mejor los efectos de los alimentos en la salud y luchar contra las patologías relacionadas con la dieta, como las ENT. A su vez este conocimiento permite el diseño de alimentos de alta calidad nutricional y sensorial para proporcionar al ser humano una dieta saludable. Sin embargo, durante muchos años, las investigaciones sobre la digestión de alimentos, han considerado al aparato digestivo humano como una caja negra, es decir algo complejo y organizado por distintos órganos, donde solo las entradas y salidas se consideraban objetivo de estudio. En este sentido, tradicionalmente las investigaciones han considerado a los alimentos de acuerdo con su composición, limitándose a monitorear los nutrientes en el torrente sanguíneo o demostrar los efectos fisiológicos de una dieta, sin un conocimiento real de los mecanismos de desintegración de los alimentos involucrados[11]. Sin lugar a dudas, una mejor comprensión de los mecanismos que sustentan la digestión, enriquecen nuestro conocimiento sobre la cinética de hidrólisis y bioaccesibilidad de macronutrientes y, en consecuencia, la biodisponibilidad de nutrientes. Esta información resulta de gran importancia para el desarrollo de un enfoque de “ingeniería inversa”, es decir, a partir del efecto biológico o nutricional que se quiere obtener, deducir la estructura alimentaria adecuada y, en consecuencia, las condiciones de elaboración más relevantes para obtenerlo.

Sin embargo, para poder estudiar las interacciones de la matriz alimentaria con el aparato digestivo es necesario contar con herramientas que permitan simular el proceso de digestión. La digestión gastrointestinal simulada se emplea ampliamente en muchos campos de las ciencias de la alimentación y la nutrición, como alternativa a la realización de ensayos en humanos (métodos *in vivo*) que suelen ser costosos, requieren muchos recursos y son éticamente discutibles. En contraste, la utilización de modelos de digestión *in vitro* resulta en una alternativa simple, económica, reproducible y libre de restricciones éticas para simular el proceso de digestión de un alimento. La principal ventaja de aplicar metodologías *in vitro* radica en la posibilidad de realizar determinaciones que permitan entender el impacto de la estructura del alimento y su relación con los componentes fisiológicos presentes en la digestión, brindando información sobre la bioaccesibilidad de determinados nutrientes (es decir, la cantidad de un compuesto que se libera de la matriz y se considera que está disponible para la absorción a través de la pared intestinal). Estos métodos intentan imitar las condiciones fisiológicas *in vivo*, teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, pH, tiempo de digestión y concentraciones de sales, entre otros factores[12]. Se han utilizado

modelos de digestión *in vitro* para abordar cuestiones científicas tan diversas como la digestibilidad y la bioaccesibilidad de productos farmacéuticos y macronutrientes como proteínas[6], carbohidratos[13] y lípidos[14]. También se han utilizado para estudiar la liberación de micronutrientes como minerales y oligoelementos y compuestos vegetales secundarios que incluyen carotenoides y polifenoles[15].

La comunidad científica internacional muestra interés creciente en la mejora de las propiedades saludables de los alimentos y otros productos, y se esfuerza en ampliar su conocimiento en los procesos de digestión. Prueba de ello es la creación, en el año 2011, de la red INFOGEST (COST Action), red internacional de expertos en nutrición, gastroenterología y tecnología de alimentos, de la cual nuestro grupo de investigación es miembro. Entre los objetivos generales planteados por la red, se encuentra el diseño de nuevos alimentos con propiedades nutricionales y funcionales mejoradas, así como la creación de metodologías de estudios de digestión *in vitro* armonizadas y validadas, con el fin de mejorar el conocimiento sobre cómo la estructura de un alimento impacta en su recorrido por el aparato gastrointestinal.

En relación a lo planteado anteriormente y siendo que la reacción de lipólisis es un proceso interfacial, resulta de crucial importancia estudiar el impacto de la película de emulsionante adsorbida en la interfase o/w sobre dicha reacción. En este contexto, las características de la interfase, determinadas por la naturaleza del emulsionante, podrían afectar la velocidad y grado de lipólisis e impactar en la acción de las SB que tienen un rol tanto en facilitar la adsorción de la lipasa, como en la remoción de los productos de digestión. Se muestran a continuación un conjunto de estudios realizados en esta línea[6,7,10,16–20] tendientes a identificar emulsionantes que permitan modular la digestión de lípidos.

Objetivo general

Estudiar el impacto de la composición y la estructura de la película interfacial de emulsiones aceite/agua en la digestión gastroduodenal *in vitro* de las mismas, con el propósito de identificar los factores que permiten retardar/inhibir el proceso de lipólisis.

Objetivos específicos

- Caracterizar la lipólisis de las emulsiones aceite/agua en relación a la naturaleza del emulsionante.
- Estudiar la evolución de las emulsiones durante la digestión gastroduodenal *in vitro*.
- Estudiar la resistencia que ofrece cada película interfacial de emulsionante a la penetración de las SB en la interfase aceite/agua.
- Estudiar la capacidad de los emulsionantes para interaccionar con SB en solución acuosa de un fluido intestinal simulado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como emulsionantes se utilizaron proteínas, β–lactoglobulina (βlg, Food Davisco International) y aislado proteico de soja (SPI), y como emulsionante de bajo peso molecular Tween 80 (T80, Biopack, grado alimentario). Las propiedades funcionales/estructurales y el comportamiento durante la digestión de βlg han sido extensamente estudiadas, motivo por el cual fue elegida como modelo de referencia. La utilización de proteínas vegetales en reemplazo de las

animales ha cobrado cada vez mayor importancia, siempre que sea una fuente proteica completa y de alta calidad. Las proteínas del poroto de soja no solo presentan estas cualidades, sino que su utilización resulta de interés particular debido a sus excelentes propiedades funcionales, entre ellas la formación y estabilización de emulsiones. En el presente estudio se utilizó un SPI soluble desnaturalizado térmicamente a partir de harina desgrasada de soja. Resulta de especial interés comparar el comportamiento de las proteínas con un emulsionante de bajo peso molecular como el T80 ampliamente utilizado en la industria alimentaria, debido a sus excelentes propiedades funcionales para formar y estabilizar emulsiones.

Obtención de emulsiones aceite en agua (o/w)
Se prepararon soluciones al 2% en agua destilada de los emulsionantes a partir de la cual se obtuvieron emulsiones o/w (10/90) con aceite de girasol comercial utilizando un procesador ultrasónico Vibra Cell Sonics, modelo VCX 750, a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud del 20% a 0.5 ºC.

Digestión gastroduodenal *in vitro*
La digestión gastroduodenal *in vitro* se llevó a cabo utilizando la metodología reportada por Bellesi y col (2016)[6]. La simulación de la digestión gástrica se llevó a cabo a partir de la utilización de un fluido (FGS) bajo condiciones fisiológicas (pH 2,5, NaCl, $CaCl_2$, NaH_2PO_4 y KCl), en presencia de pepsina y fosfatidilcolina (Sigma Aldrich). La mezcla de la emulsión y el fluido se mantuvo 1 h en agitación controlada a 37 ºC y pH 2,5. Finalizada la etapa gástrica, se llevó el digerido a pH 7 (NaOH) y la digestión continuó con la incorporación de una solución que simula al fluido duodenal (FIS) con concentraciones fisiológicas de tripsina, quimotripsina, SB y lipasa pancreática (Sigma Aldrich). La mezcla se mantuvo en agitación controlada por 1 h a pH 7 y 37 ºC.

Determinación del grado de lipólisis
Se utilizó un titulador automático (Titrando pH stat, Metrohm) con el fin de neutralizar (NaOH 0,5 M) los AGL producidos por acción de la lipasa pancreática en la etapa duodenal. A partir del volumen de NaOH utilizado, es posible estimar el % de AGL liberados como[21]:

$$\%AGL= ((V_{NaOH}\ (t) * M_{NaOH}*MWTG)/m_{TG}*2)*100$$

donde V_{NaOH} y M_{NaOH} son el volumen y la molaridad del NaOH utilizado, MW_{TG} es el peso molecular promedio de un TG de aceite de girasol y m_{TG} corresponde a la masa de TG presente al momento de incorporar la lipasa pancreática

Análisis del tamaño de partícula
Se determinó el diámetro promedio ($D_{3,2}$), el área superficial específica (SSA) y las curvas de distribución de las gotas de las emulsiones por dispersión estática de luz (analizador de tamaño de partículas Mastersizer 2000, Malvern Instruments). Las determinaciones se realizaron tanto para las emulsiones iniciales como para tiempos intermedios durante el proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*.

Microscopia óptica
La microestructura de las emulsiones o/w (iniciales y digeridas) se analizaron mediante microscopía óptica (OLYMPUS BX43). Cada muestra se agitó antes

del análisis y una gota de emulsión se colocó en el portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se observó con un aumento de 400 X.

Caracterización interfacial

Con la ayuda de un tensiómetro interfacial PAT-1(SINTERFACE Technologies, Berlín, Alemania) empleando el método de gota pendiente, se obtuvo la variación de la presión interfacial (π) y los parámetros reológicos dilatacionales en función del tiempo para los diferentes emulsionantes. Para llevar a cabo las mediciones se formó una gota con la solución del emulsionante en la punta de un capilar, la cual queda inmersa en una cubeta, que contiene el aceite previamente purificado, en un compartimiento que permite regular la temperatura en 37 ºC[16].

Con el objetivo de estudiar el impacto de las SB (concentración fisiológica) sobre la película interfacial formada por cada emulsionante, se estudió el efecto que produce el intercambio de la subfase, empleando un sistema de doble capilar. Para tal fin, la solución de SB fue inyectada desde un capilar interno en el seno de una gota formada con la solución de emulsionante desde el capilar externo. Como parámetros de respuestas a tal perturbación, se determinaron las variaciones en los valores de π como en los parámetros reológicos.

Capacidad de solubilización de ácido un ácido graso

Para determinar la solubilidad de un ácido graso (ácido oleico, AO) se midió la turbidez con un turbidímetro (VELP Scientifica) a una longitud de onda de 850 nm (37 ºC). Se analizó la evolución de la turbidez tras la adición continua de volúmenes de 50 μL de AO en 100 ml de FIS. A la hora de analizar la capacidad que tienen las SB para solubilizar AO se repitió el procedimiento anterior en presencia de SB (0,5 % p/p) en el FIS. Para estudiar el impacto de la presencia de SPI en la capacidad de solubilización de las SB, se realizaron las mismas determinaciones en presencia de un sistema mixto formado por SPI (1,5 % p/p) y SB (0,5% p/p). Finalmente, se determinó el mecanismo de “oiling-off”, entendido como la cantidad de AO que deja de estar solubilizado en el medio acuoso. Esta cantidad se determinó a las 48 horas de haber dejado en reposo el sistema en una cámara termostatizada a 37 °C.

Capacidad de unión de los emulsionantes a SB en solución acuosa

El ensayo de unión *in vitro* a las SB se llevó a cabo mediante el método de Yoshie-Stark y Wa¨sche (2004)[22]. Las muestras de emulsionante (2% p/p) se mezclaron con una solución de SB (1,5 mM) en FIS (pH 7,0) y se incubaron a 37 °C durante 2 h. A continuación se centrifugaron y el contenido de SB en el sobrenadante se analizó espectrofotométricamente (530 nm) utilizando un kit de análisis de ácidos biliares (Diazyme). La resina de colestiramina, un fármaco que se une a las SB y se utiliza como tratamiento para reducir el colesterol en sangre, fue utilizada como control positivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento de las emulsiones durante la digestión gastroduodenal *in vitro*

El tamaño de las gotas de las emulsiones se ve afectado en su paso por el sistema gastrointestinal, afectando el área interfacial disponible para la acción de la lipasa al llegar al duodeno, donde ocurre principalmente la lipólisis. Por ello es clave analizar los cambios sufridos en este tránsito. En la Figura 1 se

muestra la distribución de tamaño de partícula de las emulsiones a lo largo del proceso de digestión *in vitro* estabilizadas con βlg (Fig. 1A), SPI (Fig. 1B) y T80 (Fig. 1C) donde se han incluido también las imágenes obtenidas por microscopía óptica en cada una de las etapas de la digestión. Las emulsiones iniciales (sin digerir) mostraron poblaciones monomodales con un tamaño de gota inferior a 0,3 μm (Tabla 1), lo que refleja las excelentes propiedades emulsionantes de los sistemas utilizados y su capacidad para generar una gran área interfacial o/w con valores de SSA comprendidos entre 17,5 y 22,1 m^2/g (Tabla 1). En las imágenes microscópicas se pude observar que en todos los casos estudiados se obtienen sistemas homogéneos en correlación con la distribución obtenida. A pesar de que las tres emulsiones de partida presentaron iguales tamaño de gota, durante la fase gástrica, las emulsiones proteicas experimentaron un elevado grado de desestabilización, aumentado notablemente el tamaño de las gotas de aceite. Como se ve en las imágenes microscópicas (Fig. 1A y 1B) estos incrementos pueden atribuirse a la floculación de las gotas de aceite. La emulsión de βlg fue la que experimentó el mayor grado de floculación, lo que dio lugar a valores de $D_{3,2}$ que duplican a los obtenidos por SPI hacia el final de la etapa gástrica (Tabla 1). En esta instancia, las emulsiones proteicas presentaron una distribución monomodal, con diámetros promedio que superan los 7 μm. El fenómeno de floculación se ve favorecido por el bajo pH del medio (2,5), como así también por la proteólisis de la película interfacial llevada a cabo por pepsina. Estos factores provocan una reducción de la carga superficial de las gotas y una disminución del espesor de la película, promoviendo la desestabilización de la emulsión[23]. Es importante considerar que las proteínas utilizadas presentan valores de punto isoeléctrico ácido (4-5), por lo que el paso de la emulsión inicial (pH 7) hacia las condiciones gástricas (pH 2,5) promueve la reducción de la carga superficial y por lo tanto la interacción de las gotas con la consecuente formación de flóculos (Fig. 1A y 1B). Por el contrario, la emulsión formada con T80 (Fig. 1C) no presentó cambios en la distribución durante la etapa gástrica, hecho que también puede evidenciarse al observar las imágenes obtenidas por microscopía. Este comportamiento puede atribuirse a que al ser un emulsionante no proteico y no iónico, no es afectado por la pepsina, ni por los cambios de pH o fuerza iónica. En concordancia con la distribución de tamaño obtenida, la Tabla 1 indica que prácticamente los valores de $D_{3,2}$ (y el SSA) no presentaron cambios significativos durante la fase gástrica.

	βlg		**SPI**		**T80**	
	$D_{3,2}$ (μm)	SSA (m^2/g)	$D_{3,2}$ (μm)	SSA (m^2/g)	$D_{3,2}$ (μm)	SSA (m^2/g)
t_0	0,277±0,001	22,1 ± 0.1	0,278±0,001	17,5 ± 0,6	0,283	21,2
t_g	14,6 ± 0,1	0,41± 0.04	7,4 ± 0,1	0,581±0,008	0,277	21,7
t_d	0,46 ± 0,03	12,9 ± 0.9	0,43 ± 0,08	14,2 ± 2,6	0,276	21,7

Tabla 1. Área superficial específica (SSA) y tamaño promedio de partícula ($D_{3,2}$) de las emulsiones iniciales (t_0), al final de la etapa gástrica (t_g) y al final de la etapa duodenal (t_d).

Durante la fase duodenal, los principales cambios se observaron nuevamente, sobre las emulsiones proteicas (Fig. 1A y 1B). En ambos casos, las distribuciones pasaron a ser multimodales pero con predominancia de las poblaciones con menor tamaño, obteniéndose valores de diámetro promedio del orden de los 0,45 μm (Tabla 1). Estos cambios podrían atribuirse

principalmente a la proteólisis llevada a cabo por las enzimas duodenales, tripsina y quimotripsina, y a la emulsificación llevada a cabo por las SB, las cuales, como se observa en la microscopía, rompen los flóculos formados durante la fase gástrica. Este fenómeno, a su vez, da lugar a un aumento de los valores de área interfacial (Tabla 1) lo que favorece la actividad de la lipasa pancreática. Por otra parte, la presencia de picos en la zona de tamaños menores también se relaciona con la formación de micelas de SB, las cuales contienen los productos de la digestión de TG.

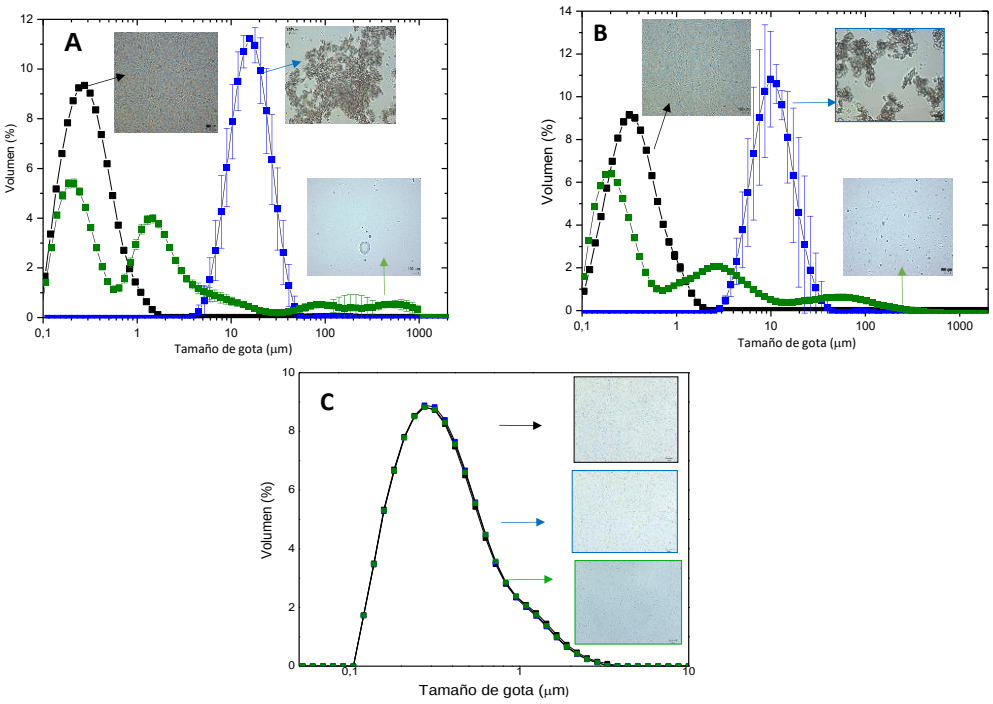

Figura 1: Variación de la distribución de tamaño de gota de aceite e imágenes microscópicas para emulsiones estabilizadas por βlg (A), SPI (B) y T80 (C) a lo largo del proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*: Emulsión inicial (■), al final de la fase gástrica (■), al final de la fase duodenal (■).

Para el caso de la emulsión estabilizada con T80 se observa que la distribución permanece prácticamente idéntica a la inicial, lo que indicaría que la emulsión no fue afectada por las condiciones del medio digestivo, permaneciendo estable tanto en la fase gástrica como en la duodenal. De igual forma a lo concluido en la fase gástrica, se trata de un emulsionante sintético que no es afectado por las proteasas duodenales ni por los cambios de pH o fuerza iónica. El mismo comportamiento se evidencia al analizar las imágenes microscópicas, donde se observa que la microestructura de la emulsión se mantiene uniforme, sin evidenciarse presencia de flóculos y/o gotas de mayor tamaño. Finalmente, la Tabla 1 refleja el mismo comportamiento dado que los valores de $D_{3,2}$ y SSA no experimentaron cambios significativos. En este caso, debido a que las gotas de aceite son muy pequeñas, no es posible identificar la presencia de micelas de SB, cuyo tamaño se superpone con el de las gotas de la emulsión. Sin embargo, al ser la emulsión que mantiene los mayores valores de SSA durante todo el proceso, y en particular (en comparación con las emulsiones proteicas) al final de la fase gástrica, es de esperar un elevado grado de lipólisis, dada la mayor área disponible para la adsorción de la lipasa

pancreática. Los resultados de la reacción de lipólisis serán analizados en la siguiente sección.

Cinética del proceso de lipólisis

En la Figura 2 se muestra la cinética de liberación de los ácidos grasos durante la etapa duodenal (1h), para cada una de las emulsiones. En todos los casos se observó un rápido incremento durante los primeros 10 minutos en el porcentaje de ácidos grasos liberados (% AGL), previo a alcanzar un valor de pseudoequilibrio a tiempos mayores. En trabajos previos se ha comprobado que al trabajar con suficiente concentración de lipasa pancreática, su adsorción a la interfase o/w es casi inmediata a su incorporación al medio de reacción. A raíz de esto, el proceso de lipólisis (que da lugar a la liberación de AG) comienza de manera inmediata una vez que se ha incorporado la lipasa pancreática, sin evidenciarse la existencia de un período de inducción[24,25]. La disminución en la velocidad de lipólisis en el tiempo puede asociarse con la liberación de los productos de reacción (AGL y MG) que al tener actividad interfacial, se acumulan en la superficie de las gotas de aceite, actuando como inhibidores de la lipasa y por lo tanto reduciendo su actividad[26,27].

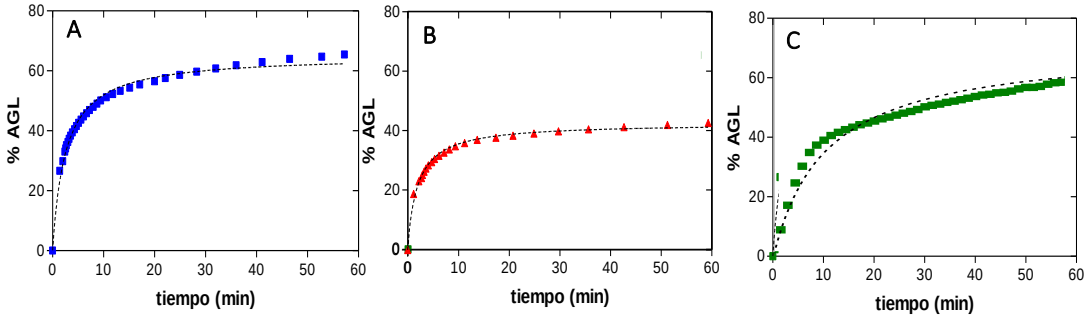

Figura 2: Liberación de los ácidos grasos (% AGL) en el tiempo durante la fase duodenal de la digestión *in vitro* de las emulsiones estabilizadas por: βlg (A), SPI (B) y T80 (C).

Se puede observar que el valor máximo de liberación de ácidos grasos (luego de 1 h) obtenido para las emulsiones estabilizadas por SPI (42,5 %) fue inferior al obtenido por las emulsiones estabilizadas por βlg (65,42%) o T80 (58,6 %).
Al tratarse de un proceso interfacial (la lipasa pancreática debe unirse a la interfase o/w mediante complejación con SB y colipasa), resulta interesante analizar el impacto del área interfacial expuesta de cada emulsión con el grado de lipólisis obtenido. En este sentido, a pesar de que todas las emulsiones partieron del mismo tamaño de gota inicial (y similares valores de SSA) alcanzaron deferentes grados de lipolisis. Este hecho refleja el impacto de la naturaleza del emulsionante que, en mayor o menor medida, será en parte responsable de los fenómenos que tienen lugar en la interfase o/w durante la digestión de lípidos. Estos fenómenos incluyen la adsorción interfacial de las SB, necesaria para la adsorción de la lipasa pancreática y la remoción de los productos de la digestión en micelas de SB, los cuales serán analizados en las siguientes secciones.

Comportamiento de las interfases o/w en presencia de SB

Siendo que las SB cumplen un rol clave en el proceso de lipólisis, en esta sección se analizará el impacto de una solución de SB, a concentración

fisiológica, sobre películas interfaciales adsorbidas en la interfase o/w. Los emulsionantes elegidos fueron SPI, dado que mostró el menor grado de lipólisis y βlg, adoptada como proteína de referencia que, al contrario a lo observado con SPI, mostró un elevado grado de lipólisis (Fig. 2). Se estudiará el impacto de las SB tanto en la cinética de adsorción interfacial como en las propiedades reológicas.

1-Adsorción competitiva: SB vs Emulsionantes

En este apartado se estudiará en primer lugar la adsorción competitiva entre las SB y cada uno de los emulsionantes, es decir, se evaluará la competencia entre los componentes (sistemas mixtos) durante su co-adsorción en la interfase o/w en relación al comportamiento de los sistemas individuales.

En la Figura 3 se muestra el comportamiento interfacial de cada proteína en la interfase o/w bajo condiciones intestinales simuladas. La variación de π con el tiempo se asocia con el aumento de la concentración de proteínas que se adsorben en la interfase. Como se detalla en la literatura, esta adsorción tiene lugar en tres pasos diferentes que incluyen: la difusión de la proteína desde el seno de la solución acuosa a la interfase, su adsorción y despliegue, y finalmente, la reorganización de la proteína adsorbida[28]. Comparando estos resultados con la cinética de adsorción de las SB (Fig. 3, símbolos azules), se puede observar que estas últimas alcanzan un valor de π constante en menos de cuatro minutos, mientras que las proteínas requieren tiempos mayores. Estas diferencias indican que las proteínas se absorben más lentamente en la interfase que las SB, hecho que puede asociarse a las diferencias en la forma, estructura y/o tamaño de las moléculas y a la elevada actividad interfacial de las SB.

La dinámica de co-adsorción de los sistemas mixtos también fue analizada (Fig. 3, símbolos llenos). La evolución en el tiempo de π para el sistema mixto formado por SB y βlg (Fig. 3A) fue similar a la de SB solas, lo que indica que en la interfase la presión interfacial estaría dominada por las SB, ya que las moléculas de SB tienden a ocupar la interfase muy rápidamente. Estos resultados corroboran el hecho de que no existiría sinergismo en estas mezclas, en concordancia con lo reportado por Maldonado-Valderrama y col. (2008)[29]. Sin embargo, la mezcla de SB con SPI (Fig. 3C) presentó valores de π mayores que el correspondiente a SB solas, lo que indicaría la presencia de ambos componentes en la interfase.

En la figura 3 (B y D) se observan los valores del módulo de dilatación interfacial (E) correspondientes a películas obtenidas para cada uno de los sistemas estudiados. La determinación de parámetros reológicos es de suma importancia ya que refleja las interacciones posibles entre la película interfacial y otros componentes fisiológicos, como la SB[30]. Valores muy bajos de E fueron evidenciados para las películas de SB, los cuales reflejan el bajo grado de interacción que se establece entre las SB en la interfase[9,31] e indicaría que prácticamente no hay respuesta de tales películas interfaciales frente a las deformaciones sinusoidales aplicadas. Este resultado guarda relación con los publicados por Wilde y Chu (2011)[32] quienes indicaron que, la morfología de las SB origina una baja densidad de empaquetamiento interfacial, dando lugar a la formación de una película altamente móvil o de bajo carácter sólido.

Por el contrario, las películas formadas por ambas proteínas, mostraron mayor carácter elástico (mayores valores de E). El incremento de E con el tiempo está

asociado con la adsorción de proteínas en la interfase o/w lo que refleja la existencia de interacciones proteína-proteína, las cuales se incrementan con el tiempo de adsorción[33].

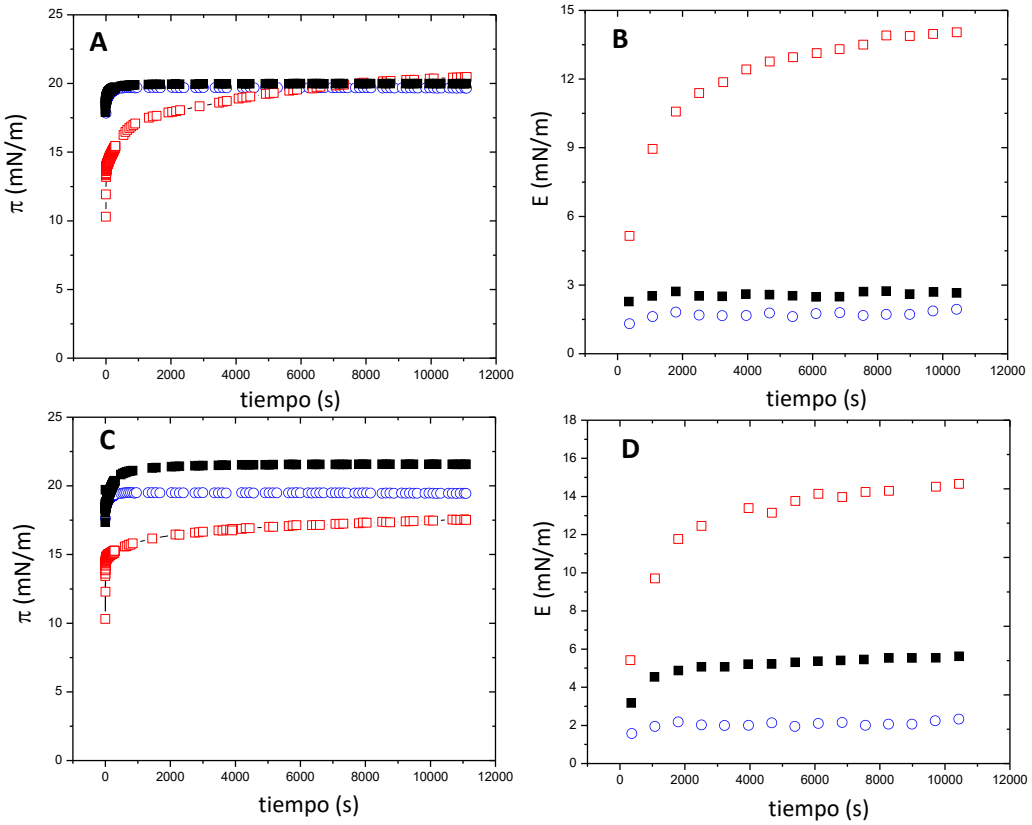

Figura 3: Variación de la presión interfacial (A y C) y del módulo dilatacional interfacial (B y D) para películas interfaciales formadas por βlg (A, B) y SPI (C y D). Proteína 2% p/p (□) y BS 5 mg/ml (○). Los sistemas mixtos se representan con símbolos completos (■).

La co-adsorción de SB y βlg (Fig. 3B) dio lugar a películas interfaciales con valores de E similares a los obtenidos para las SB solas, comportamiento que coincide con el observado al analizar la presión interfacial (Fig.3A), lo que confirma el hecho de que la interfase está ocupada principalmente por SB. Sin embargo, en el sistema mixto formado por SPI y SB (Fig. 3D), los valores de E fueron más altos que los obtenidos por las SB, lo que refleja una mayor grado de coexistencia entre ambos componentes en la interfase o/w en correlación con los resultados de presión interfacial (Fig. 3C).

2-Adsorción secuencial: SB vs Emulsionantes

Los ensayos para evaluar el grado de resistencia que podría presentar la película de emulsionante al desplazamiento interfacial que pueden llevar a cabo las SB (en la fase duodenal de la digestión) se realizaron mediante una adsorción secuencial, empleando el sistema del doble capilar del tensiómetro interfacial explicado previamente. Para esto se formó una película de emulsionante y posteriormente, a los 8000 segundos, se inyectó la solución de SB (5 mg/ml). A este tiempo de adsorción suficientemente largo, todos los emulsionantes estudiados alcanzan un valor de pseudo-equilibrio para π (Fig. 3A y C), indicando la saturación de la interfase, y además forman una película

elástica lo suficientemente estable (Fig. 3B y D). La importancia de los resultados que se obtengan de este estudio radica en que se podría obtener información de la acción de las SB sobre las películas interfaciales bajo condiciones semejantes a las condiciones del duodeno (soluciones preparadas en FIS) simulando de esta manera el proceso interfacial que tiene lugar cuando una emulsión llega al duodeno y toma contacto con una solución fisiológica de SB, iniciando el proceso de digestión de lípidos[8].

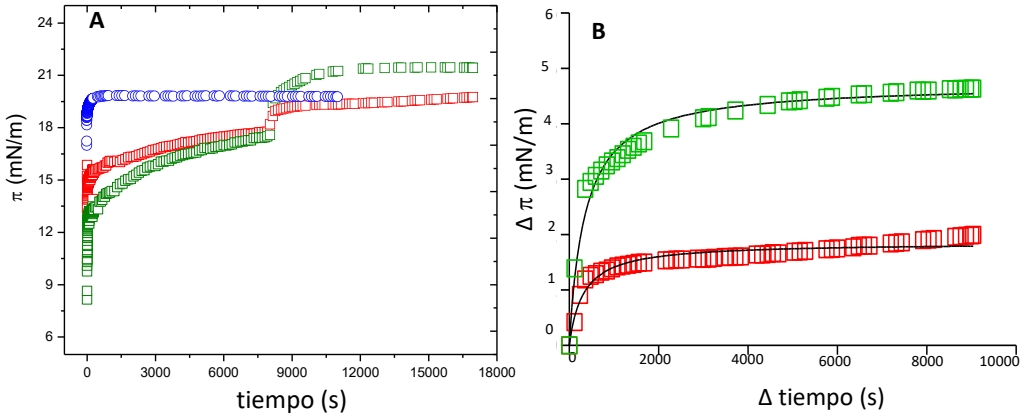

Figura 4: (A) Variación de π con el tiempo tras la adición secuencial de una solución de SB a 37 °C sobre películas de βlg (□) y SPI (□). Los valores de π para las SB se muestran como referencia (○). (B) Aumento de π tras la introducción de las SB a los 8000 s para βlg (□) y SPI (□).

Se puede observar, en la Figura 4, que tras la inyección de las SB se produce un rápido aumento en π para ambos sistemas hasta valores similares, o incluso algo mayores, que los correspondientes a las SB solas (~19,5 mN/m), lo cual indica que las SB han penetrado ambas películas. Para la película formada por SPI, los valores de π alcanzados fueron mayores que los obtenidos para las SB solas, lo que estaría sugiriendo que estas proteínas no serían desplazadas totalmente de la interfase. En el caso hipotético de que las moléculas de SB hubieran desplazado totalmente a las moléculas de proteína adsorbidas en la interfase, y esta quedara ocupada únicamente por las SB, sería de esperar que los valores de π coincidieran con los de las SB solas, ya que en este caso el emulsionante hubiese pasado a la solución. Por lo tanto, cuanto más alejados se encuentren los valores de π del valor para las SB, mayores serán los indicios de la permanencia del emulsionante en la interfase. Para el caso de las películas interfaciales formadas por βlg, a diferencia de lo observado con SPI, al final de la medida, se obtuvieron valores de π más bien similares a los de las SB. Estos resultados indicarían que las SB dominan las características de la interfase formada, algo que ya habían comprobado otros autores al trabajar con películas interfaciales formadas por proteínas[29,34].

El grado en que aumentan los valores de π tras la inyección de las SB puede ser utilizado para establecer un orden tentativo del impacto que presentan las SB en cada una de las películas interfaciales. A tal fin se graficó el aumento de π por encima del valor que tenía la película en el momento de la inyección de las SB, a los 8000 s (Fig. 4B). A partir de esta figura, se puede inferir que los sistemas que sufran los mayores aumentos de presión interfacial serían aquellos donde el emulsionante es menos desplazado por las SB y por lo tanto

puede contribuir a la obtención de un valor de π por encima del obtenido para las SB. Se podría establecer entonces que la película formada por SPI sería la menos desplazada por las SB, ya que es aquella en la que se produce un mayor incremento en los valores de π tras su inyección (Fig. 4B). Por otra parte, en las películas interfaciales de βlg, se produce el menor incremento de π, alcanzándose un valor muy similar al de las SB solas. Esto indicaría que estas películas serían bastante penetradas por las SB y las moléculas de βlg podrían estar siendo desplazadas de la interfase, por lo menos en mayor medida que SPI.

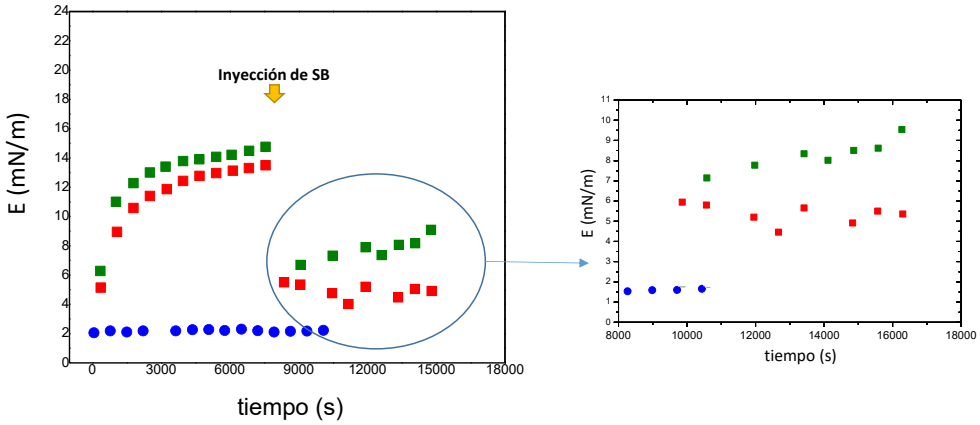

Figura 5: Variación del módulo dilatacional (E) con el tiempo tras la adición secuencial de una solución de SB a 37 °C sobre películas proteicas (2% p/p) de βlg (■) y SPI (■). Se muestra como referencia el resultado de las SB a 5mg/ml (●).

En la Figura 5, se observan los valores de E de las películas interfaciales antes y después de la inyección de la solución de SB. Como se indicó anteriormente, ambas proteínas se caracterizaron por la formación de una película interfacial elástica, sin embargo, tras la inyección de las SB (a los 8000 s) se observó que los valores de E disminuyeron rápidamente en distinta intensidad. Esta disminución indica que las películas interfaciales, serían bastante perturbadas tras la adsorción de las SB, que ingresarían en imperfecciones de cada película evitando, en cierto grado, las interacciones entre las moléculas de emulsionante adsorbidas. Al comparar los emulsionantes, se deduce que la película interfacial formada por βlg sería la más perturbada por la incorporación de las SB, dado que alcanzó valores de E muy similares a los de las SB solas (mostradas en azul como referencia), en concordancia con los efectos observados al analizar la variación que experimentó la presión interfacial.
Para analizar este fenómeno se procedió a cuantificar la variación experimentada por los valores de E tras la incorporación de las SB en cada uno de los casos. En la Tabla 2 se muestra, en la primer columna, la variación experimentada por E entre el instante en que se introdujeron las SB al medio (E_{8000}) y el instante en que se obtuvo el primer valor de E tras dicha adición (E_{9800}), es decir, se estaría analizando la perturbación inicial que sufre el sistema por la incorporación de la solución de SB. En la siguiente columna se representa la variación que experimentó el valor de E entre el momento de adición de las SB (E_{8000}) y el valor final obtenido (E_{Final}). De aquí se puede deducir que la película de βlg (disminución de los valores de E en un 55%) resultó más perturbada que la película formada por SPI, donde la pérdida de

elasticidad fue del 50 %. Estos datos indican en ambos casos que la presencia de las SB impide la asociación de las proteínas en la interfase para mantener la elasticidad inicial característica. Un fenómeno llamativo es que, tras la adsorción de las SB, en el caso de las películas formadas por SPI, el valor de E experimentó un ligero ascenso con el transcurso del tiempo (Fig. 5B), hecho que podría estar relacionado con cambios conformacionales en la película interfacial que involucran el grado de interacción entre las moléculas proteicas adsorbidas en la interfase. Este fenómeno nos permite confirmar que las proteínas de soja adsorbidas en la interfase no han sido desplazadas, al menos totalmente. La recuperación de la elasticidad interfacial solo se observó para la película formada por SPI. Como se observa en la Tabla 2, para la película de SPI, el valor de E solo se redujo en un 34 % al final de la experiencia, respecto al valor que tenía antes de la incorporación de las SB. Esta recuperación podría explicarse considerando el hecho de que las SB ingresarían a la interfase a partir de huecos o imperfecciones de la película interfacial, aumentando así el grado de compactación de las moléculas de proteína adsorbidas, generando por lo tanto un incremento en la rigidez de la película[35].

Proteínas	$\boldsymbol{\Delta E/E}$: $(\boldsymbol{E_{8000}} - \boldsymbol{E_{9800}})/\boldsymbol{E_{8000}}$	$\boldsymbol{\Delta E/E}$: $(\boldsymbol{E_{8000}} - \boldsymbol{E_{Final}})/\boldsymbol{E_{Final}}$
SPI	0,50 ± 0,01	0,34 ± 0,02
βlg	0,55 ± 0,01	0,60 ± 0,01

Tabla 2: Variación de E a partir de la adsorción de las SB en las diferentes películas interfaciales.

Por lo tanto, la interfase formada por la proteína de soja es la que resultó menos desestructurada por las SB, lo cual está de acuerdo con que esta proteína es la que pudo competir con las SB por un sitio en la interfase en las experiencias de co-adsorción realizadas, confirmando que ambas moléculas pueden coexistir en la interfase o/w. Considerando el rol de las SB en la digestión de lípidos, el hecho de que las proteínas de soja demostraran mayor resistencia a su actividad podría dificultar la adsorción posterior de la lipasa pancreática, lo que podría explicar el menor grado de lipólisis observado para las emulsiones estabilizadas por SPI (Fig. 2). Además, dada la compatibilidad/afinidad interfacial de las SB y las proteínas de soja, esta película podría constituir una barrera que dificulte la remoción interfacial de los productos de lipólisis en forma de micelas de SB. Este hecho aumentaría la presencia de AGL en la región interfacial, produciendo un efecto inhibitorio en la actividad de la lipasa. Por el contrario, que la película formada por βlg fuera más susceptible a la penetración de las SB, podría facilitar la adsorción de la lipasa pancreática y la remoción de los productos de la digestión. Esto permitiría la obtención de un mayor grado de lipólisis de sus emulsiones como se observó previamente (Fig.2).

Impacto de SPI en la solubilización micelar de ácidos grasos: modelo *in vitro*

En la Figura 6 se muestra la capacidad de SPI para perturbar la solubilización de un ácido graso modelo (ácido oleico, AO) en una solución micelar de SB preparada en el fluido intestinal simulado (FIS) a pH y temperatura fisiológica. En primer lugar se determinó la solubilización de AO en FIS en ausencia de SB y SPI, con el objetivo de evaluar la solubilidad del ácido graso en este medio.

La adición escalonada de AO al FIS, produjo el continuo aumento de turbidez (Fig.6). Se pudieron identificar dos regiones en la curva: la primera (entre 0 y 350 μL de AO añadido), donde la turbidez aumentó casi de forma lineal, y la segunda región (por encima de 350 μL) donde se produjo un aumento más pronunciado de la turbidez. Los análisis de distribución de tamaño de partícula (datos no mostrados), indicaron que durante la primera región el AO se presenta en forma de vesículas, que aumentaron de tamaño conforme aumentó el volumen de AO adicionado[36,37]. A partir del punto de quiebre (en 350 μL), los resultados indicaron un cambio estructural en las vesículas de AO, lo que dio lugar a la aparición de gotas y la consecuente separación del AO formando una fase superior inmiscible. Este comportamiento sugiere que se ha alcanzado el límite de solubilidad del ácido graso, es decir, a partir de la adición de 350 μL, el sistema se encuentra saturado en AO, motivo por el cual todo el volumen adicionado en la segunda región, abandona la fase acuosa.

Cuando se estudió la solubilidad del AO en presencia de SB micelar (0,5 %p/p), se identificaron tres regiones en el perfil de turbidez: una primera región (0- 350 µL) donde se observa una disminución continua y leve de la turbidez; la segunda región (350-700 µL) donde los valores de turbidez permanecieron bajos y casi constantes y la tercera región (por encima de 700 µL), donde se evidenció un aumento pronunciado en los valores de turbidez. La disminución de los valores de turbidez en la región 1, puede asociarse a la ruptura de los agregados micelares formados por las SB[20], donde a medida que aumenta el contenido de AO (hasta 350 μL) se forman pequeñas micelas que contienen solubilizado al ácido graso. Estos resultados indican que, las pequeñas micelas de SB son capaces de solubilizar el AO agregado, evitando su asociación en forma de grandes vesículas que podrían incrementar los valores de turbidez[38,39]. Conforme aumenta el contenido de AO, las micelas incrementan su tamaño dando lugar al incremento en los valores de turbidez obtenidos en la segunda región del perfil. Un claro punto de quiebre se evidencia (Fig. 6) al final de la segunda región (a 700 µL de AO añadidos), donde los valores de turbidez aumentan abruptamente. Este incremento representa el comienzo de la tercera región, que se correspondió con la aparición gotas de AO y la consecuente separación del ácido graso en una fase superior inmiscible, lo que indica que se ha alcanzado el límite de saturación del sistema. De acuerdo con estos resultados, se puede establecer que las SB solubilizaron 700 µL de AO, donde las micelas son las estructuras supramoleculares predominantes adoptadas en el medio acuoso.

De la comparación de la solubilidad del AO en ausencia y presencia de SB, se demuestra la excelente capacidad de las SB para solubilizar los productos de la lipólisis, una de sus principales funciones, ya que la solubilidad del AO se ha incrementado en un 100% por su presencia en el FIS.

Para analizar el impacto de las proteínas de soja sobre la capacidad de las SB de solubilizar AO se preparó una solución en FIS compuesta por SB (0,5%) y SPI (1,5%) sobre la cual se adicionaron en forma continua diferentes volúmenes de AO. Como se observa en la Fig. 6, se produce un aumento rápido en los valores de turbidez a partir del cual se pueden distinguir dos regiones: la primera (0-200 μL), caracterizada por un aumento lineal, y la segunda región, caracterizada por un incremento abrupto (a partir de 200 μL). De la comparación con los sistemas anteriores, puede deducirse que el incremento abrupto podría relacionarse en parte con el límite de solubilidad del

AO en el sistema, es decir que, a partir de la incorporación de 200 μL de AO, se favorecería la formación de gotas de gran tamaño responsables de los altos valores obtenidos en el perfil, las cuales a continuación abandonan la fase acuosa.

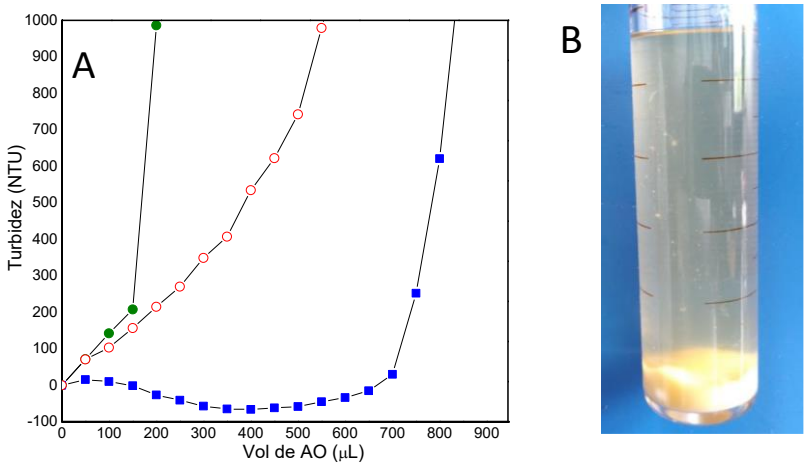

Figura 6: (A) Evolución de la turbidez de FIS tras la adición gradual de AO en ausencia (○) y presencia de 0,5% de SB (■) y un sistema mixto formado por 0,5% de SB y 1,5% de SPI (●). (B) Precipitado de SPI formado durante el ensayo.

Por lo tanto, se puede concluir que en presencia de SPI, la solubilidad del AO disminuyó considerablemente en relación a la obtenida cuando las SB se encontraban solas en solución a la misma concentración (700 μL de AO). Este hecho demuestra que las micelas de SB no se encuentran igualmente disponibles para solubilzar AO en presencia de la proteína. Es decir, los resultados sugieren que, la proteína de soja reduciría la capacidad de las SB para solubilizar los productos de la digestión como el AO. Un hecho importante a tener en cuenta es que, a los pocos minutos de iniciar la determinación en presencia de SPI, se produjo un precipitado formado principalmente por la proteína (Fig. 6B). Siendo que en el apartado anterior, se demostró que las proteínas de soja pueden interaccionar con las SB a nivel interfacial, podría pensarse que esta interacción también esté ocurriendo en la fase acuosa. Por lo tanto, de ser así, es de esperar que la precipitación de las proteínas de soja conlleve a un arrastre de las SB del medio, disminuyendo por lo tanto su disponibilidad para la solubilización del AO.

Interacción SPI-SB en solución acuosa

Durante la formación de una emulsión no todos los emulsionantes quedan adsorbidos en la interfase, sino que en presencia de exceso de emulsionante, muchos de estos quedarán suspendidos en la solución acuosa donde se encuentran dispersas las gotas de aceite. En este apartado se analizará la capacidad de estas proteínas para ligar SB en solución acuosa. Para tal fin, luego de mezclar el SPI con las SB por 2 horas en solución acuosa (FIS) a 37°C, se centrifugaron a alta velocidad para precipitar a la proteína. Sobre el sobrenadante obtenido, se determinó el contenido de SB, el cual corresponde a la SB libre, es decir, aquella que no se encuentra ligada a la proteína precipitada. De la comparación entre el contenido total de SB y la SB libre, se determinó el porcentaje de SB ligada a la proteína en comparación con un control positivo (resina de colesteramina). La colesteramina es un fármaco

recetado para el tratamiento de la hipercolesterolemia. Su principio de acción se basa en la capacidad de formar complejos iónicos no absorbibles con las SB, que son excretados con las heces. Con ello, una parte de las SB producidas en el hígado son eliminadas, motivo por el cual tiene lugar un proceso bioquímico compensatorio, que involucra la síntesis de SB para restaurar la fracción pérdida. Esta síntesis adicional, ocurre a expensas del colesterol circulante en sangre[40].

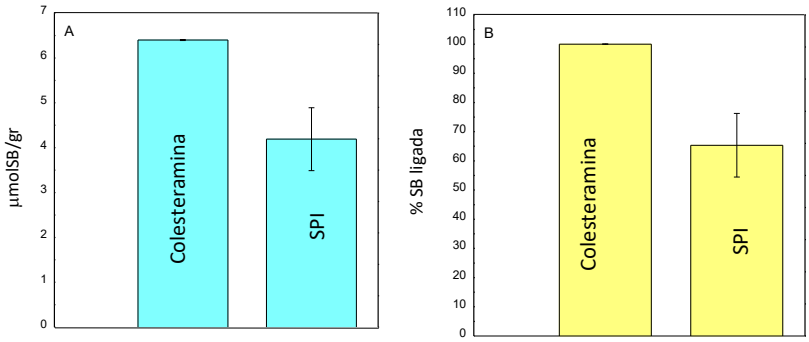

Figura 7: Capacidad de pagado de SB expresado como µmol de SB por gr de muestra (A). Porcentaje de pegado relativo a colesteramina (B).

La Figura 7A representa los µmol de SB ligados por gramo de SPI o colesteramina. Se puede comprobar que la proteína es capaz de ligar 4,19 ± 0,70 µmol/gr, mientras que el control positivo unió un total de 6,40 ± 0.01 µmol/gr de colesteramina.
Estos resultados demuestran que las proteínas de soja, además de interaccionar con las SB a nivel interfacial, pueden hacerlo en solución acuosa. Por lo tanto, la precipitación de las proteínas observada en el apartado anterior, podría ocasionar el arrastre adicional de las moléculas de SB ligadas a SPI, disminuyendo entonces su disponibilidad para solubilizar las moléculas de ácido oleico.
Si consideramos a la colesteramina como el 100% de unión, el valor de unión (relativo a la colesteramina) de las proteínas de soja a la SB fue de un 65.34 ± 10.9 % (Fig. 7B).
En conclusión, estos resultados indican que las proteínas de soja son capaces de actuar sobre las SB siguiendo el mismo mecanismo que un fármaco sintético recetado para el tratamiento de la hipercolesterolemia, lo que determinaría su potencial aplicación para disminuir los niveles de colesterol en sangre. En la literatura existen algunos antecedentes que apoyan las interpretaciones obtenidas en el presente trabajo. Por ejemplo, Anderson, Johnstone y Cook-Newell (1995)[41] demostraron la capacidad de las proteínas de soja para reducir los niveles de colesterol en sangre tanto en humanos como en animales de laboratorios, indicándose que el mecanismo de acción de estas proteínas incluiría la disminución de la adsorción intestinal de las SB.

CONCLUSIÓN

Los resultados presentados demostraron que el grado de lipólisis de las emulsiones obtenido durante la digestión gastroduodenal *in vitro*, depende del tipo de emulsionante adsorbido, siendo las estabilizadas por SPI, las que dieron lugar a un menor grado de lipólisis. Los factores investigados, moduladores del proceso, tienen que ver con el rol de las SB ya sea en: (a) La etapa de adsorción interfacial de estas moléculas para facilitar la adsorción del

complejo lipasa/colipasa, o bien, (b) La etapa de desorción y transporte en forma de micelas de los productos de la lipólisis. Estas micelas de SB a continuación liberan los componentes solubilizados en los enterocitos para luego transitar por el remanente del intestino delgado y grueso donde son reabsorbidas. Por lo tanto, si este mecanismo falla o es lento funcionará como una autorregulación de la lipólisis.

Con respecto a la etapa (a), los estudios de co-adsorción o adsorción secuencial de las SB indicaron que la película interfacial formada por SPI fue la menos perturbada, presentando la mayor compatibilidad interfacial con las mismas. Con respecto a la etapa (b) los estudios en solución acuosa demostraron la capacidad de las proteínas de soja para interaccionar con las SB, lo que podría ocasionar la disminución de su disponibilidad para desorber y transportar los productos de lipólisis, promoviendo la acumulación interfacial de los mismos y por ende la disminución o retardo del proceso de lipólisis.

A pesar de no encontrase una inhibición total de la lipólisis, la reducción de su extensión, resulta de crucial importancia. Actualmente se considera que la velocidad a la cual los ácidos grasos son absorbidos (niveles postprandiales de triglicéridos) resulta de importancia para la salud ya que altos niveles están asociados con la activación de reacciones inflamatorias reconocidas como factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares y diabetes[42] .

A partir de la utilización de modelos de digestión *in vitro* se pudo evaluar el impacto de la estructura interfacial en la reacción de lipólisis de una emulsión aceite/agua. Estos métodos representan una alternativa simple, como primer paso de estudio, que permite entender cómo la estructura de un alimento impacta en su recorrido por el aparato digestivo, conocimiento de gran importancia para el diseño de alimentos que buscan un efecto biológico o nutricional determinado. Sin embargo, se requieren estudios *in vivo* para apoyar las conclusiones obtenidas a partir de modelos de digestión *in vitro*.

Bibliografía

1. Ministerio de Salud y Desarrollo Social, I. N. de E. y C. *4° Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. Resultados definitivos-Republica Argentina*. (2019).

2. Golding, M. & Wooster, T. J. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**, 90–101 (2010).

3. Li, Y., Hu, M. & McClements, D. J. Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chem.* **126**, 498–505 (2011).

4. Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O. & McClements, D. J. Influence of particle size on lipid digestion and β-carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chem.* **141**, 1472–1480 (2013).

5. McClements, D. J. & Li, Y. Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food Funct.* **1**, 32–59 (2010).

6. Bellesi, F. A., Martinez, M. J., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M. & Pilosof, A. M. R. Comparative behavior of protein or polysaccharide stabilized emulsion under in vitro gastrointestinal conditions. *Food Hydrocoll.* **52**, 47–56 (2016).

7. Bellesi, F. A., Ruiz-Henestrosa, V. M. P., Maldonado-Valderrama, J., Del Castillo Santaella, T. & Pilosof, A. M. R. Comparative interfacial in vitro digestion of protein and polysaccharide oil/water films. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **161**, 547–554 (2018).

8. Bauer, E., Jakob, S. & Mosenthin, R. Physiology of Lipid Digestion. 282–

295 (2004).
9. Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., MacIerzanka, A. & MacKie, A. The role of bile salts in digestion. *Adv. Colloid Interface Sci.* **165**, 36–46 (2011).
10. Pilosof, A. M. R. Potential impact of interfacial composition of proteins and polysaccharides stabilized emulsions on the modulation of lipolysis. The role of bile salts. *Food Hydrocoll.* **68**, 178–185 (2017).
11. Dupont, D., Le Feunteun, S., Marze, S. & Souchon, I. Structuring food to control its disintegration in the gastrointestinal tract and optimize nutrient bioavailability. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **46**, 83–90 (2018).
12. Minekus, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food Funct.* **5**, 1113–1124 (2014).
13. Hasjim, J., Lavau, G. C., Gidley, M. J. & Gilbert, R. G. In vivo and in vitro starch digestion: Are current in vitro techniques adequate? *Biomacromolecules* **11**, 3600–3608 (2010).
14. Larsson, K., Cavonius, L., Alminger, M. & Undeland, I. Oxidation of cod liver oil during gastrointestinal in vitro digestion. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 7556–7564 (2012).
15. Bouayed, J., Hoffmann, L. & Bohn, T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chem.* **128**, 14–21 (2011).
16. Bellesi, F. A., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M. & Pilosof, A. M. R. Behavior of protein interfacial films upon bile salts addition. *Food Hydrocoll.* **36**, 115–122 (2014).
17. Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., Bellesi, F. A., Camino, N. A. & Pilosof, A. M. R. The impact of HPMC structure in the modulation of in vitro lipolysis: The role of bile salts. *Food Hydrocoll.* **62**, 251–261 (2017).
18. Naso, J. N., Bellesi, F. A., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M. & Pilosof, A. M. R. Studies on the interactions between bile salts and food emulsifiers under in vitro duodenal digestion conditions to evaluate their bile salt binding potential. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **174**, 493–500 (2018).
19. Bellesi, F. A., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M. & Pilosof, A. M. R. Lipolysis of soy protein and HPMC mixed emulsion as modulated by interfacial competence of emulsifiers. *Food Hydrocoll.* **99**, 105328 (2020).
20. Julieta N.Naso, Fernando A. Bellesi, VIctor M.Pizones Ruiz-Henestrosa, A. M. . P. A new methodology to assess the solubility of fatty acids: Impact of food emulsifiers. *Food Res. Int. En prensa* (2020).
21. Li, Y. & Mcclements, D. J. 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 (2010).
22. Yoshie-Stark, Y. & Wäsche, A. In vitro binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. *Food Chem.* **88**, 179–184 (2004).
23. Li, J., Ye, A., Lee, S. J. & Singh, H. Influence of gastric digestive reaction on subsequent in vitro intestinal digestion of sodium caseinate-stabilized emulsions. *Food Funct.* **3**, 320–326 (2012).
24. Mun, S., Decker, E. A. & McClements, D. J. Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Res. Int.* **40**, 770–781 (2007).
25. McClements, D. J. & Li, Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Adv. Colloid*

Interface Sci. **159**, 213–228 (2010).
26. Troncoso, E., Aguilera, J. M. & McClements, D. J. Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. *Food Hydrocoll.* **27**, 355–363 (2012).
27. Gallier, S. & Singh, H. Behavior of almond oil bodies during in vitro gastric and intestinal digestion. *Food Funct.* **3**, 547–555 (2012).
28. MacRitchie, F. Protein adsorption/desorption at fluid interfaces. *Colloids and Surfaces* **41**, 25–34 (1989).
29. Maldonado-Valderrama, J. *et al.* Interfacial characterization of β-lactoglobulin networks: Displacement by bile salts. *Langmuir* **24**, 6759–6767 (2008).
30. Murray, B. S. Rheological properties of protein films. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **16**, 27–35 (2011).
31. Mackie, A. R., Gunning, A. P., Ridout, M. J., Wilde, P. J. & Patino, J. R. In situ measurement of the displacement of protein films from the air/water interface by surfactant. *Biomacromolecules* **2**, 1001–1006 (2001).
32. Wilde, P. J. & Chu, B. S. Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. *Adv. Colloid Interface Sci.* **165**, 14–22 (2011).
33. Ruíz-Henestrosa, V. P. *et al.* Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **309**, 202–215 (2007).
34. Uri, L., Baudot, P. & Mcclements, D. J. Impact of interfacial composition on physical stability and in vitro lipase digestibility of triacylglycerol oil droplets coated with lactoferrin and/or caseinate. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 7962–7969 (2010).
35. Woodward, N. C., Gunning, A. P., Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P. J. & Morris, V. J. Probing the in situ competitive displacement of protein by nonionic surfactant using atomic force microscopy. *Langmuir* **26**, 12560–12566 (2010).
36. Zakir, F., Vaidya, B., Goyal, A. K., Malik, B. & Vyas, S. P. Development and characterization of oleic acid vesicles for the topical delivery of fluconazole. *Drug Deliv.* **17**, 238–248 (2010).
37. Verma, S. *et al.* Oleic acid vesicles : A new approach for topical delivery of antifungal agent Oleic acid vesicles : a new approach for topical delivery of antifungal agent. (2013) doi:10.3109/21691401.2013.794351.
38. Hofmann, A. F. the Function of Bile Salts in Fat Absorption. the Solvent Properties of Dilute Micellar Solutions of Conjugated Bile Salts. *Biochem. J.* **89**, 57–68 (1963).
39. Freeman, C. P. Properties of fatty acids in dispersions of emulsified lipid and bile salt and the significance of these properties in fat absorption in the pig and the sheep. *Br. J. Nutr.* **23**, 249 (1969).
40. Kahlon, T. S. & Woodruff, C. L. In vitro binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten. *Food Chem.* **79**, 425–429 (2002).
41. Anderson, J. W., Johnstone, B. M. & Cook-Newell, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N. Engl. J. Med.* **333**, 276–282 (1995).
42. Singh, H. & Ye, A. Structural and biochemical factors affecting the digestion of protein-stabilized emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **18**, 360–370 (2013).