

2°-03: Efecto inhibitor del té blanco sobre la enzima Lipasa en la hidrólisis de los triglicéridos presentes en la leche

Diseño

Objetivo: Determinar si el té blanco tiene efecto inhibitor sobre la actividad de la enzima lipasa obtenida del aguacate en la hidrólisis de los triglicéridos de la leche midiendo el cambio de pH.

Dispondremos de una solución alcalina de 5 cm³ de leche, 7 cm³ de carbonato de sodio y 10 cm³ de una solución de té blanco (cuya concentración será diferente para cada grupo). y lipasa (obtenida del aguacate) que cambiará de rosa a incolora pues la grasa de la leche se rompera y tendremos ácidos grasos y glicerol. (Foundation, 2011).

Fundamento: La enzima lipasa, que en el cuerpo humano es producida en el páncreas, es la encargada de catalizar la hidrólisis de los triglicéridos o grasas en ácidos grasos y glicerol (Foundation, 2011). Los ácidos grasos reducirán el pH de la solución de leche y este cambio de pH, medido con el sensor de pH, será el indicador de la actividad de la enzima lipasa. En esta investigación, la enzima lipasa se obtendrá del aguacate (Last, n.d).

Variables: Dispondremos de una solución alcalina de 5 cm³ de leche, 7 cm³ de carbonato de sodio 0,05 M (Foundation, 2011) y 10 cm³ de una solución de té blanco, cuya concentración será diferente para cada grupo. Por tanto, la variable independiente será la concentración de té blanco, del cual se estudiará el efecto inhibitor (Gondoin, Grussu, Stewart, & McDougall, 2010). Se dispondrá de una solución madre de té de 10 bolsas de té blanco comercial de 3 gramos cada una en 250 ml de agua. A partir de esta solución, se preparan las diferentes soluciones que se añadirán a la leche y el carbonato de sodio, diluyendo la solución madre con agua. Así, al grupo control se le añadirán 10 cm³ de agua y 0 cm³ de té (solución de té al 0%), al grupo 1 se le añadirán 2,5 cm³ de té y 7,5 cm³ de agua (solución de té al 25%), al grupo 2 se le añadirán 5 cm³ de té y 5 cm³ de agua (solución de té al 50%), al grupo 3, 7,5 cm³ de té y 2,5 cm³ de agua (solución de té al 75%) y al grupo 4, 10 cm³ de té y 0 cm³ de agua (solución de té al 100%). Se medirá el pH de esta solución antes de añadir la lipasa, la cual estará dentro del aguacate, por tanto se añadirán piezas de aguacate de 2 gramos de masa. La variable dependiente será el cambio de pH de las soluciones el cual se calculará restando el pH inicial de la solución y el pH final (medido 2 horas después de añadir el aguacate). Tanto los volúmenes de la leche y del carbonato de sodio como de la solución de té se mantendrán constantes. La concentración de la leche, que se preparó en el laboratorio a partir de leche en polvo, y la concentración del carbonato de sodio, que también se preparó en el laboratorio, serán variables controladas; así como la masa de aguacate que se añadirá, directamente proporcional a la cantidad de lipasa disponible. También serán variables controladas la temperatura, humedad y luz, pues todas las muestras se situaran

en el mismo lugar, y el área superficial de contacto del aguacate con la solución, pues se intentó que todas las piezas de aguacate tuvieran la misma forma y todos estaban en tubos de ensayo de igual volumen.

Materiales:

- 25 tubos de ensayo
- 125 cm³ de leche
- 175 cm³ de carbonato de sodio 0,05 M
- 125 cm³ de solución de 10 bolsitas de té en 250 ml de agua
- 125 cm³ de agua
- 25 piezas de 2 gramos de aguacate
- Sensor de pH

Método:

- Preparar solución de leche disolviendo 12 gramos de leche en polvo en 200 ml de agua a unos 40-50°C.
- Preparar solución de carbonato de sodio 0,05 M añadiendo 1,001 g de CaCO₃ a 200 cm³ de agua.
- Añadir 5 cm³ de la solución de leche y 7 cm³ de carbonato de sodio a cada uno de los 25 tubos de ensayo.
- Dividir los tubos de ensayo en cinco grupos de cinco y numerar los grupos y los tubos.
- Añadir 10 cm³ de la solución de té al 0% a cada uno de los tubos del grupo Control, 10 cm³ de la solución de té al 25% a cada uno de los tubos del grupo 1, 10 cm³ de la solución de té al 50% a cada uno de los tubos del grupo 2, 10 cm³ de la solución de té al 75% a cada uno de los tubos del grupo 3 y 10 cm³ de la solución de té al 100% a cada uno de los tubos del grupo 4.
- Medir el pH de cada tubo de ensayo con un sensor de pH Vernier.
- Cortar 25 piezas de aguacate de 2 gramos de masa y añadir una a cada tubo de ensayo.
- Dos horas después de añadir el aguacate, volver a medir el pH de la solución.

Obtención y procesamiento de datos:

En la siguiente tabla se muestran los valores del pH inicial y el pH final (tras dos horas de actividad de la enzima lipasa) para muestra, así como las medias y las desviaciones estándar de cada grupo.

Tabla 1: Valores del pH inicial y pH final de las soluciones de leche, carbonato de calcio y té tras dos horas de actividad de la enzima lipasa contenida en el aguacate

Concentración de té blanco de la solución ¹ %	Muestra	pH inicial \pm 0,2 unidades de pH	pH final \pm 0,2 unidades de pH
0	1	10,6	8,9
	2	10,5	9,0
	3	10,6	8,9
	4	10,4	8,8
	5	10,4	8,6
	Media	10,5	8,8
	SD	0,1	0,1
25	1	10,1	9,0
	2	10,1	9,2
	3	10,1	9,0
	4	10,9	9,1
	5	10,1	8,9
	Media	10,3	9,0
	SD	0,4	0,1
50	1	9,7	8,8
	2	9,7	8,8
	3	9,3	8,6
	4	9,6	9,0
	5	9,8	9,1
	Media	9,6	8,9
	SD	0,2	0,2
75	1	9,1	8,9
	2	9,2	8,8
	3	9,1	8,9
	4	9,2	8,9
	5	9,1	8,9
	Media	9,1	8,9
	SD	0,1	0,0
100	1	9,1	9,1
	2	9,4	9,1
	3	9,0	9,1
	4	9,2	9,1
	5	9,1	9,1
	Media	9,2	9,1
	SD	0,1	0,0

¹ Para preparar estas soluciones se diluyó la solución madre, pipeteando los cm³ previamente indicados de té y los restantes de agua hasta obtener 10 ml para añadirlos a los tubos de ensayo. La incertidumbre de las pipetas utilizadas (una para el agua y otra para el té) era de $\pm 0,05$ ml.

Con referencia a los datos cualitativos observados en el laboratorio, se observó que algunas piezas de aguacate tenían fragmentos de un verde más intenso mientras que otras tenían un verde más claro, ya que la parte externa del aguacate es de un verde más oscuro que el interior. Además, si bien se intentó que la forma fuera igual para todas las piezas de aguacate, al tener el aguacate forma ovalada, algunas eran más rectas, mientras que otras eran ligeramente más curvas. Asimismo se observó que el volumen del agua de la solución madre de té disminuía al sacar las bolsas de té, ya que estas absorbían aproximadamente 10 ml de agua. Por otro lado, cuando se limpiaron los tubos de ensayo se observaba que un residuo sólido de leche quedaba en el fondo del tubo. Por último, las piezas de aguacate de los tubos de ensayo tras las dos horas en los tubos estaban muy blandas, casi se deshacían.

A continuación se presenta una tabla que recoge las diferencias entre las medias del los valores del pH inicial y el pH final de cada grupo, calculadas de la siguiente manera:

$$\text{Diferencia de pH} = \text{pH inicial} - \text{pH final}$$

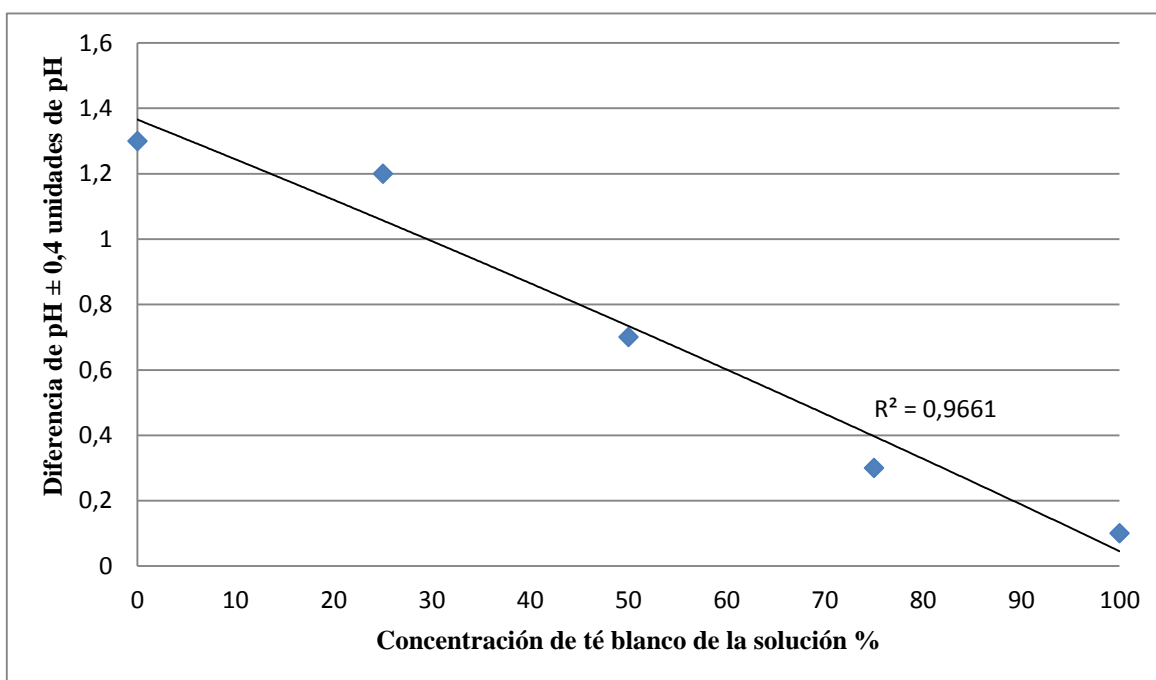
Tabla 2: Diferencia de pH de soluciones de leche, carbonato de calcio y té tras dos horas de actividad de la enzima lipasa

Concentración de té blanco de la solución %	Diferencia de pH $\pm 0,4^2$ unidades de pH
0	1,3
25	1,2
50	0,7
75	0,3
100	0,1

El siguiente gráfico muestra la tendencia de la diferencia de pH en función de la concentración de té de la solución.

² Esta incertidumbre ha sido obtenida de la suma de las incertidumbres de las medidas del pH a partir de las cuales se ha calculado este valor.

Gráfico 1: Diferencia de pH en función de la concentración de té en la solución



Conclusión y evaluación:

Como se observa en el gráfico presentado, al aumentar la concentración de té blanco disminuye la diferencia del pH entre la solución inicial y la solución final, es decir, disminuye la actividad de la enzima lipasa. Por tanto, podemos concluir que efectivamente el té blanco tiene un efecto inhibitor en la actividad de la enzima lipasa.

En el gráfico, la línea de mejor ajuste con un coeficiente de determinación elevado de 0,9661, representa una relación cuadrática entre ambas variables. El alto valor de R^2 indica que la correlación entre ambas variables es muy fuerte. Además, el coeficiente de correlación de Pearson³ es 0,9829 que, según la tabla de los valores críticos del coeficiente de Pearson presentada por la Universidad de Valencia, para una prueba de grado de libertad 23 (N-2) se corresponde con una probabilidad menor del 0,005. Por tanto, mantenemos la hipótesis de que el té blanco es inhibitor de la lipasa porque los tests estadísticos muestran una fuerte correlación entre los datos (Meliá, n.d).

Por otro lado en cuanto a las SD aunque no se han representado en el gráfico porque los datos representados en el gráfico son datos procesados, no obtenidos directamente en el laboratorio, en la tabla se han recogido y en ningún caso superan el 33% de la media, por tanto asumimos que son pequeñas y que el instrumento utilizado era bastante preciso. En cualquier caso, la incertidumbre del sensor del pH ($\pm 0,2$ unidades de pH) ha causado que hayamos tenido que redondear los valores a solo dos cifras significativas y por tanto se aprecia poca diferencia entre los valores. Si se utilizara un sensor de pH con

³ Coeficiente de correlación de Pearson= $R=\sqrt{R^2}$

menos incertidumbre, se obtendrían datos más exactos y se apreciaría una mayor diferencia entre los datos.

Se observa que la diferencia entre el grupo control y el grupo al 25% es menor que la diferencia entre los demás grupos. Esto podría ser porque una concentración de té tan baja tiene poco efecto inhibitor sobre la lipasa y, sin embargo, cuando esta concentración aumenta, aumenta el efecto inhibitor y por tanto disminuye la actividad de la enzima, disminuyendo la diferencia de pH. El hecho de que el té blanco fuera un inhibidor competitivo para la lipasa explicaría que con una concentración tan baja la diferencia sea poca pero que, al aumentar la concentración al 50% se aprecie una mayor diferencia, ya que cuando el té se encuentra en tan poca concentración apenas es competencia para el sustrato, pero cuando esta concentración aumenta la competencia se intensifica.

En cuanto a los errores del experimento y haciendo referencia a lo recogido en los datos cualitativos, el hecho de que hubiera fragmentos en las piezas de aguacate de un verde más intenso que otros que eran de un verde más claro pudo afectar los resultados del experimento en la medida en la que la coloración más oscura de la fruta, verde muy oscuro e incluso marrón, está causada por la oxidación de la superficie de la fruta. De forma natural, cuando se corta la fruta y se expone la carne del fruto al aire, esta tiende a oxidarse, además de que las enzimas (oxidases) que quedan en libertad atacan y degradan las pectinas. Las pectinas de la fruta están presentes en dos formas: protopectina, que atrapa al agua formando una especie de malla y la pectina soluble, que queda disuelta en el agua que contiene la fruta (Anónimo, 2014). Las pectinas determinan la porosidad de la pared celular de las células vegetales, y por tanto el grado de disponibilidad de los sustratos para las enzimas de la fruta (Gunning AP, 2009). Así, se presume que los fragmentos más oscuros tenían una concentración de pectina soluble más alta que los claros, que tenían una mayor concentración de protopectina. La pectina soluble hacía que la superficie de estas piezas de aguacate fuera más permeable y por tanto se facilitaba el contacto de la enzima lipasa y los triglicéridos de la leche, facilitando la actividad enzimática de lipasa. Por tanto, los tubos de ensayo que contenían estas piezas de aguacate mostrarían una mayor diferencia de pH. La solución a esto sería cortar el aguacate de la siguiente manera: Se le quita la piel al aguacate y se corta por la mitad para quitarle el hueso. A continuación, se corta la superficie del aguacate de manera que se quede con forma de prisma, con las paredes rectas. Así nos aseguraríamos de coger solo la carne del interior del aguacate y evitaríamos el problema de la oxidación.

Además, con esa manera de cortar el aguacate también evitaríamos el problema de que las piezas de aguacate tuvieran una forma diferente. Se recogió en los datos cualitativos que algunas piezas eran rectangulares mientras que otras eran más curvas. Esto pudo afectar los resultados en tanto que el área superficial del aguacate, que contiene la enzima, y la solución no era la misma. En los que eran más rectangulares, la superficie de contacto aumentaba y, por tanto, cabe asumir que también aumentaba la actividad de lipasa. Con la manera de cortar el aguacate planteada, se evitaría también este problema.

En cuanto al residuo sólido de leche que quedaba en el fondo del tubo, este probablemente se debiera a la precipitación de las proteínas de la leche como consecuencia de la acidificación del medio por la liberación de los ácidos grasos de la hidrólisis de los triglicéridos. Esto planteó el hecho de que no se agitaron los tubos de ensayo antes de medir el pH tras las dos horas de actividad de la lipasa. Sería recomendable agitarlos ya que el sensor del pH no llega al fondo del vaso y pudiera ser que, tras dos horas, las diferentes sustancias de la solución se hubieran depositado en capas por diferencias de densidad. Así se asegura que el pH medido corresponde a la solución al completo, no solo a la capa superficial.

El hecho de que las piezas de aguacate estuvieran tan blandas cuando se sacaban de los tubos de ensayo también se debió a la oxidación previamente explicada. Al haber más pectina, en lugar de protopectina, las piezas de aguacate se ablandaron. Esto no pudo afectar a los resultados del experimento porque fue un proceso que sufrieron todas las piezas así que, si bien es cierto que una mayor concentración de pectina puede facilitar el contacto de la enzima con el sustrato, esto pasó en todas las muestras, por tanto el posible efecto queda neutralizado.

Además, cuando se añadieron las soluciones de té a los tubos de ensayo se pipeteaba de la solución madre los centímetros cúbicos de té que se necesitaban para alcanzar la concentración del grupo y a continuación, con otra pipeta, se pipeteaba el agua que faltaba para añadir los 10 cm³ planeados. Este método provoca por un lado que la incertidumbre de la concentración de té sea $\pm 0,1$ ml en lugar de $\pm 0,05$ ml y por otro que, los errores entre las diferencias de concentraciones en las muestras de un mismo grupo aumenten. Para minimizar estas diferencias, sería recomendable preparar soluciones de 50 cm³ diluyendo la solución madre con agua y, de estas soluciones pipetear 10 cm³ en cada muestra.

Por otro lado, se observó que se tardaba más tiempo al medir el pH final que al añadir las piezas de aguacate en las muestras, por tanto en las muestras cuyo pH se midió al final, la enzima estuvo más tiempo trabajando. Para evitar esto, se puede tener en cuenta ese intervalo de tiempo que se tarde en medir el pH de cada muestra, limpiar el sensor con agua destilada entre muestra y muestra, y dejar pasar 5 minutos entre la adición de las piezas de aguacate en el grupo control y la adición de las piezas de aguacate en los demás grupos, para que el tiempo de actividad de la enzima sea el mismo en cada muestra.

Por último, el pH inicial de las muestras fue medido antes de añadir el aguacate pero la simple adición del aguacate pudo cambiar ligeramente el pH de la muestra, por tanto, es posible que no toda la diferencia de pH entre la inicial y la final se deba a la actividad de lipasa. Para evitar esto, habría que medir el pH inicial tras la adición de la pieza de aguacate y, para evitar que la enzima trabaje antes de la medición del pH inicial, se debe medir el pH inmediatamente después de añadir la pieza de aguacate. Esto quiere decir, no debe añadirse el aguacate a todas las muestras y después proceder a la medida del

pH, sino muestra a muestra se añade el aguacate y se mide el pH inmediatamente después.

Fuentes de información

- Anónimo. (2014). *Word Press* . Obtenido de La oxidación en las frutas :
<https://oxidacionbym.wordpress.com/informacion-conceptual/>
- Foundation, N. (24 de Noviembre de 2011). *Nuffield Foundation Society of Biology* .
Obtenido de Investigatin effect of temperature on the activity of lipase :
<http://www.nuffieldfoundation.org/practical-biology/investigating-effect-temperature-activity-lipase>
- Glider, W., & Hargrove, M. (2002). *Association for Biology laboratory education* .
Obtenido de Chapter 16: Using Bromelain in Pineapple Juice to Investigate
Enzyme Function : <http://www.ableweb.org/volumes/vol-23/16-glider.pdf>
- Gondoin, A., Grussu, D., Stewart, & McDougall. (29 de Abril de 2010). White and
green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase in vitro. *Food Research
International*.
- Gunning AP, B. R. (2009). Recognition of galactan components of pectin by galectin-3.
The FASEB Journal .
- Last, W. (n.d). *LIPASE and the FAT METABOLISM*. Obtenido de <http://www.health-science-spirit.com/lipase.html>
- Meliá, J. L. (n.d). *Unitat d'Investigació de Psicometria Universitat de Valencia* .
Obtenido de Valores críticos de la r de Pearson para una prueba unilateral según
grados de libertad (N-2): <http://www.uv.es/meliajl/Docencia/Tablas/TablaR.PDF>
- Quintero Durón, C. (12 de Febrero de 2014). *Prezi* . Obtenido de Enzimas :
https://prezi.com/mwvay4_xbnqs/enzimas/