

# UNIVERSIDAD DE CUENCA



## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

### CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

#### “OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA Y SU APLICACIÓN EN MUESTRAS DE DIGERIDO INTESTINAL IN-VITRO”

Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de  
Bioquímico Farmacéutico

#### **Autoras:**

María José Cajas Bravo

CI.: 0106975386

María Belén Solís Cordero

CI.: 0104452792

#### **Directora:**

Dra. Silvia Johana Ortiz Ulloa, PhD.

CI.: 0301082897

**CUENCA – ECUADOR**

**2017**



## RESUMEN

El presente trabajo de titulación fue optimizar y validar un método cromatográfico para el análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y su posterior aplicación para el análisis de AGCC en muestras de digerido intestinal *in vitro*.

La optimización del método se realizó por Cromatografía de Gases con detección de ionización a la llama (GC-FID). Los parámetros de validación fueron la linealidad, rango dinámico lineal, precisión intra-día e inter-día, límite de detección y límite de cuantificación. Una vez validado el método, se aplicó en 300 muestras por duplicado provistas por el Laboratorio de Nutrición y Alimentos de la Universidad de Cuenca, correspondientes a muestras de simulaciones de digestión gastrointestinal a partir de diez matrices de frutas. El método resultante fue sensible, específico y replicable para el análisis de los AGCC y el estándar interno (ácido 2-metilhexanoico) en una corrida total de 12.75 min. La aplicación del método se comprobó en dos matrices (taxo en batido con leche y taxo en jugo con agua) digeridos conjuntamente con dietas (ecuatoriana vs occidental), observándose una diferencia estadísticamente significativa entre las dietas solamente en la concentración de ácido acético ( $p < 0.001$ ).

Con la optimización del método y su aplicación para cuantificar AGCC se espera contribuir a las investigaciones que se realizan en el Laboratorio de Alimentos y Nutrición con respecto a la producción de AGCC dentro del tracto gastrointestinal para la salud específicamente del colon.

**PALABRAS CLAVE:** Ácidos grasos de cadena corta (AGCC), Cromatografía de Gases con detección de ionización a la llama (GC-FID).



## ABSTRACT

The present titration work was to optimize and validate a chromatographic method for the analysis of short chain fatty acids (SCFA) and its subsequent application for the analysis of SCFA in intestinal digested samples *in vitro*.

The optimization of the method was performed by Gas Chromatography with flame ionization detection (GC-FID). Validation parameters were linearity, linear dynamic range, intra-day and inter-day precision, limit of detection and limit of quantification. Once the method was validated, it was applied in 300 samples in duplicate provided by the Nutrition and Food Laboratory of the University of Cuenca, corresponding to samples of simulations of gastrointestinal digestion from ten fruit matrices.

The resulting method was sensitive, specific and replicable for the analysis of the SCFA and the internal standard (2-methylhexanoic acid) in a total run of 12.75 min. The application of the method was verified in two matrices (taxo in milk shake and taxo in juice with water) digested together with diets (Ecuadorian vs Western), observing a statistically significant difference between the diets only in the concentration of acetic acid ( $p < 0.001$ ).

With the optimization of the method and its application to quantify SCFA, it is expected to contribute to the research carried out in the Food and Nutrition Laboratory regarding the production of SCFA within the gastrointestinal tract specifically for the health of the colon.

**KEYWORDS:** Short chain fatty acids (SCFA), Gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID).

**ÍNDICE GENERAL**

RESUMEN.....	2
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN.....	16
1. MARCO TEÓRICO.....	18
1.1 Concepto de ácidos grasos de cadena corta.....	18
1.2 Producción de ácidos grasos de cadena corta .....	18
1.3 Funciones de los ácidos grasos de cadena corta .....	20
1.4 Absorción de los ácidos grasos de cadena corta .....	21
1.5 Microbiota del tracto gastrointestinal .....	21
1.6 Influencia de la dieta en la microbiota intestinal.....	24
1.6.1 Carbohidratos.....	24
1.6.2 Proteínas dietéticas y bacterias proteolíticas.....	25
1.6.3 Grasas.....	26
1.7 Prebióticos en relación a la producción de AGCC .....	26
1.8 Método de análisis para la cuantificación de ácidos grasos de cadena corta	28
1.8.1 Condiciones cromatográficas de optimización del método analítico.....	29
1.8.2 Validación del método analítico por GC-FID.....	31
2. METODOLOGÍA .....	33
2.1. Diseño y tipo de investigación.....	33
2.2. Muestreo .....	33
2.3. Análisis de las muestras de ácidos grasos de cadena corta.....	33
2.3.1. Procedencia de las muestras .....	33
2.3.2. Equipos, materiales y reactivos.....	34
2.4 Métodos analíticos.....	34
2.4.1 Optimización del método analítico por GC-FID .....	34
2.4.2 Preparación de la solución de estándar interno (IS).....	35
2.4.3 Preparación de la muestra .....	36
2.4.4 Análisis por GC-FID .....	36
2.4.5 Validación del método analítico .....	37



2.4.6 Aplicación del método analítico.....	40
2.4.7 Análisis estadístico.....	41
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	42
3.1 Optimización y validación del método cromatográfico para el análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).....	42
3.2 Aplicabilidad del método optimizado por GC-FID para evaluar el contenido de AGCC en muestras de digerido intestinal in-vitro .....	47
3.3.1 Comparación entre diferentes condiciones de los ensayos gastrointestinales (caso estudio).....	50
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
4.1 Conclusiones .....	55
4.2 Recomendaciones.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57



## LISTA DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1.</b> Pasos finales de la formación, tras la fermentación colónica de polisacáridos, de acetato, propionato y butirato, los AGCC principales y los microorganismos responsables de su formación(Castillo & Marzo, 2017) .....	19
<b>Ilustración 2.</b> Hábitats microbianos en el tracto gastrointestinal inferior humano(Donaldson et al., 2016) .....	23
<b>Ilustración 3.</b> Destino de los componentes alimenticios ingeridos en el intestino delgado y grueso. CHO - carbohidratos, RS - almidón resistente, NSP - polisacárido no amiláceos, OS - oligosacáridos, SCFA - ácidos grasos de cadena corta, BCFA - ácidos grasos de cadena.....	24
<b>Ilustración 4.</b> Acción de prebióticos en el organismo(COFENAT, 2017) .....	28
<b>Ilustración 5.</b> Composición de la dieta Ecuatoriana y Occidental por litro de solución(Laboratorio de Alimentos y Nutrición-VLIR, 2017).....	41
<b>Ilustración 6.</b> Cromatograma de la mezcla de AGCC e IS en base al método optimizado.....	42
<b>Ilustración 7.</b> Cromatogramas: A (taxo en leche); B (taxo en agua); C (taxo fruta); D (guayaba roja fruta); E (guayaba roja en jugo); F (guayaba roja mermelada); G (guayaba blanca fruta); H (guayaba blanca jugo); I (guayaba blanca mermelada) y J (zapote fruta).....	49



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales géneros bacterianos que fermentan carbohidratos complejos en el colon y sus productos de fermentación (Hernández & Sastre, 1999) .....	27
<b>Tabla 2.</b> Serie de diluciones 1:2 a partir de la solución madre estándar (Laboratorio de Alimentos y Nutrición-VLIR, 2017).....	37
<b>Tabla 3.</b> Concentraciones de los estándares de AGCC en los niveles de trabajo en mM y mg/L .....	39
<b>Tabla 4.</b> Tiempos de retención (tR) y las ventanas tR de cada AGCC .....	43
<b>Tabla 5.</b> Resultados de los parámetros analíticos de la validación del método cromatográfico de AGCC .....	45
<b>Tabla 6.</b> Estadística descriptiva de los AGCC en la matriz taxo en batido con leche (JTL) y taxo en jugo con agua (JTA) en blanco de solución gástrica, dieta ecuatoriana y dieta occidental. Observación (n) .....	51
<b>Tabla 7.</b> Valores de AGCC producidos para diferentes matrices de fruta (taxo en batido en leche vs taxo en jugo en agua) combinado con distinta dieta (ecuatoriana vs occidental).....	52



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el  
Repositorio Institucional

---

María José Cajas Bravo en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA Y SU APLICACIÓN EN MUESTRAS DE DIGERIDO INTESTINAL IN-VITRO", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22 de noviembre del 2017

María José Cajas Bravo

C.I: 0106975386





Cláusula de licencia y autorización para publicación en el  
Repositorio Institucional

---

María Belén Solís Cordero en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **"OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA Y SU APLICACIÓN EN MUESTRAS DE DIGERIDO INTESTINAL IN-VITRO"**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22 de noviembre del 2017

María Belén Solís

María Belén Solís Cordero

C.I: 0104452792



Cláusula de propiedad intelectual

---

María José Cajas Bravo del trabajo de titulación "OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA Y SU APLICACIÓN EN MUESTRAS DE DIGERIDO INTESTINAL IN-VITRO", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 22 de noviembre del 2017

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'María José Cajas Bravo', written over a horizontal line.

María José Cajas Bravo

C.I: 0106975386



### Cláusula de propiedad intelectual

---

María Belén Solís Cordero del trabajo de titulación "OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA Y SU APLICACIÓN EN MUESTRAS DE DIGERIDO INTESTINAL IN-VITRO", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 22 de noviembre del 2017

María Belén Solís

María Belén Solís Cordero

C.I: 0104452792



## Dedicatoria

Esta tesis va dedicada para todas las razones especiales de mi vida... Le dedico a mis padres por ser incondicionales, a mis hermanas por recordarme que nunca estaré sola, y a mi pareja favorita, mis abuelitos Mamita Rosa y Papito Isaac, quienes fueron uno de los motivos más importantes para culminar esta meta, por darme ánimos y decirme siempre que si se puede. Gracias por darme un techo, confianza y amor. Y por supuesto a mi Niño, eres el ser más especial y único en el mundo, gracias por esperarme todas las noches con un abracito y un besito de bienvenida porque siempre los necesité. A todos los amo.

Finalmente le dedico a Dios y a la vida, por estos cinco años de aguante, a todas las personas que en algún momento formaron parte del equipo, les dedico esto y les quiero decir que, si se pudo, les quiero mucho a todos. ¡Al fin, soy Bioquímica!

Y, por último, y no menos importante, esta tesis va dedicada a mi compañera porque solo nosotras sabemos lo que significa esta tesis. Gracias por el amor, comprensión y ternura.

**MARÍA JOSÉ CAJAS BRAVO**



## Agradecimientos

Le agradezco principalmente a mis padres, Manuel y Rebeca, porque ellos me enseñaron que con paciencia, responsabilidad y perseverancia se puede lograr todos los sueños que uno se proponga. Esto en gran parte ha sido por ustedes, gracias por su apoyo, en los días buenos y malos. Gracias por retarme cuando no fui cumplida, gracias por ese hombro cuando sacaba malas notas y sobre todo gracias por ser aquellos que nunca me dejaron sola en este parte tan importante de mi vida.

Quiero agradecer de una manera muy especial a la Dra. Johanna Ortiz, no sé qué hubiera sido de ella sin su guía... por su tiempo y paciencia quiero darle las gracias infinitas. Gracias por su apoyo y comprensión que permitió la culminación del presente estudio. Además, gracias por sus conocimientos y experiencias, los tomo como una guía, enseñanza de vida y ejemplo a seguir.

Y agradezco principalmente a Dios, por darme la vida y las fuerzas necesarias para lograr cumplir esta meta tan soñada que hoy acaba.

**MARÍA JOSÉ CAJAS BRAVO**



## **Dedicatoria**

Esta tesis va dedicada principalmente a Dios por la guía en el largo camino de la vida universitaria y en mi presente.

Con mucho cariño a mis padres Jaime y Lourdes por ser la base de amor, responsabilidad y deseos de superación para mi vida profesional.

De manera muy especial dedico mi tesis a un ser especial por todo el apoyo, estabilidad y compañía brindada a lo largo de mi vida juvenil.

Finalmente dedico de manera puntual e importante a los amigos consejeros, primos, sobrinos, estimadas doctoras, profesores por toda la confianza puesta sobre mi persona.

**MARÍA BELÉN SOLIS CORDERO**



## Agradecimientos

Agradecer es simplemente mostrar la satisfacción del trabajo realizado por eso quiero nombrar con todo respeto a la doctora Johanna Ortiz, tutora de mi tesis pues fue una guía muy importante en cada momento de la realización de la tesis. También, por ser una excelente profesora a lo largo de mi camino estudiantil.

De manera muy especial a mis padres por el apoyo económico, emocional y de estabilidad familiar a lo largo de mi vida; nombro a mis hermanos, sobrinos, abuelita por ser un pilar fundamental en mi crecimiento como persona.

Este trabajo de tesis ha sido arduo pero muy gratificante para mí por todo el conocimiento brindado y aprendizaje continuo. Agradezco a todo el personal del Laboratorio de Alimentos y Nutrición por la comunicación, confianza y apoyo provocando sentimientos en mi vida profesional. Agradezco a las doctoras de los laboratorios de instrumental, clínico por la atención y localidad para la realización de la tesis.

Cada momento compartido con mi compañera de tesis, lo valore y agradezco por la amistad y paciencia brindada.

Finalmente, agradezco a Dios no por ser menos importante sino porque con Él tengo paz y vida para continuar superándome intelectualmente y como persona.

**MARIA BELÉN SOLIS CORDERO**



## INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son producidos por bacterias beneficiosas del intestino y constituyen la fuente nutricional principal para las células del colon. Los AGCC más abundantes en el intestino son el acético, el butírico y el propiónico, seguido por el ácido fórmico, ácido heptanoico, ácido hexanoico, ácido isobutírico, ácido isovalérico, 4-metil-valérico y ácido valérico. En la actualidad, estudios han demostrado su papel importante en la salud, particularmente en la fisiología y nutrición del tracto gastro-intestinal (TGI) (Gómez & Acero, 2011).

La dieta es uno de los principales factores que determinan la producción de los AGCC. Actualmente y sobre todo en países industrializados se ha sufrido un profundo cambio en los hábitos dietéticos, resultando que las dietas ricas en cereales, frutas y verduras sean sustituidas en mucho de los casos por una dieta más occidentalizada, logrando un cambio en la composición de la microbiota intestinal, en los diferentes grupos bacterianos que tengan la capacidad de generar AGCC.

La investigación sobre las cantidades excretadas de ácidos grasos de cadena corta en digeridos intestinales es necesaria para la realización de estudios acerca de la importancia de éstos sobre el tracto intestinal. La determinación de AGCC más común se realiza por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GC-FID) que permite el análisis cuantitativo y simultáneo de varios AGCC (Alvarracín & Henao, 2013).

Ante la necesidad de análisis cuantitativo de los AGCC en diversas muestras de estudios de digestión gastro-intestinal en el Laboratorio de Nutrición y Alimentos del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca, este estudio estuvo enfocado en la optimización de un método de análisis por GC-FID que permita el análisis cuantitativo de los diversos AGCC cumpliendo con parámetros de calidad de aplicabilidad, especificidad, precisión, detectabilidad y sensibilidad.





## **OBJETIVOS DE ESTUDIO**

### **Objetivo general**

Optimizar el método cromatográfico para el análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y aplicarlo en el análisis de muestras de digerido intestinal *in vitro*.

### **Objetivos específicos**

1. Optimizar el método cromatográfico por cromatografía de gases con detección de ionización a la llama (GC-FID) para el análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).
2. Aplicar el método optimizado por GC-FID para evaluar el contenido de AGCC en muestras de digerido intestinal *in vitro*.



## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Concepto de ácidos grasos de cadena corta

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son un subgrupo de los ácidos grasos que poseen una cola alifática de un máximo de seis átomos de carbono. La diferencia físico-química de los AGCC con respecto a los ácidos grasos de cadena larga es su alta solubilidad en medio acuoso. Gracias a esta cualidad, los AGCC poseen una total digestibilidad, y al ser monómeros en la fase acuosa luminal son absorbidos en cualquier segmento del tracto digestivo de los mamíferos (Berruezo, Martínez, & Arques, 2011).

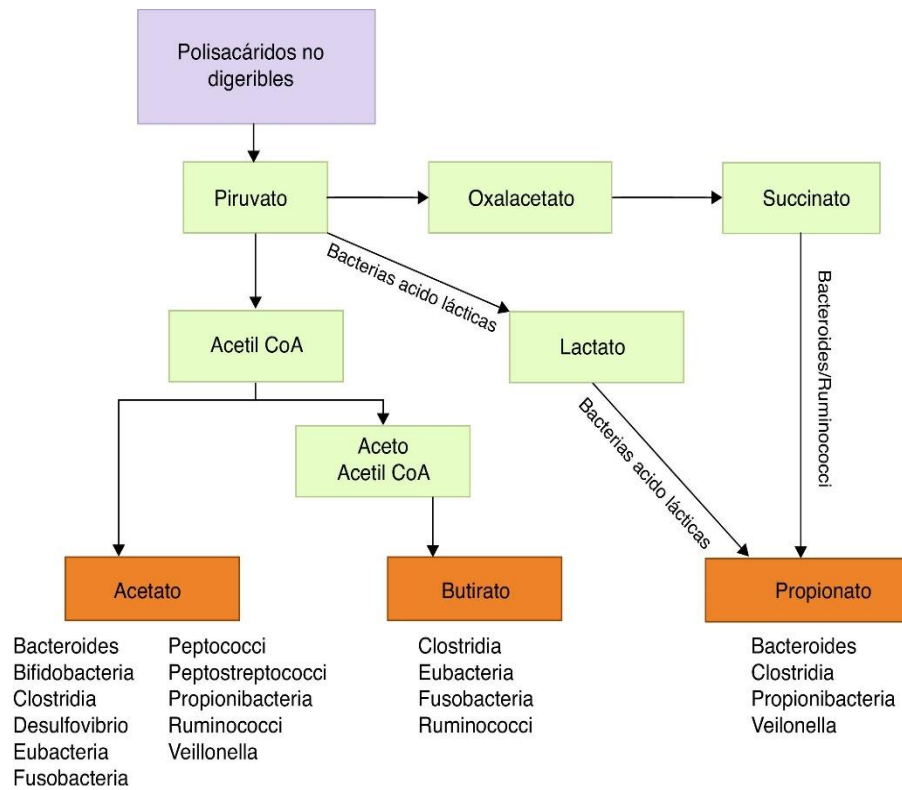
### 1.2 Producción de ácidos grasos de cadena corta

Los AGCC son producidos por la microbiota colónica mediante fermentación anaeróbica y son los productos finales de toda la digestión de los carbohidratos y proteínas. Los principales sustratos disponibles para esta fermentación son los carbohidratos no digeridos, la fibra dietética, el almidón resistente y las proteínas en cantidades más pequeñas (**Ilustración 1**) (Rozenbloom, Fernandez, Gloor, & Wolever, 2014).

Para la formación de los AGCC intervienen un gran número de especies bacterianas a través de vías enzimáticas activadas siendo la vía glucolítica la principal para su producción. En el caso de la Bifidobacterias, los AGCC se generan mediante la vía de las pentosas fosfato (Agudelo, Giraldo, Barrera, & Valdés, 2016).

La fermentación de las bacterias y el contenido de putrefacción intestinal dependen del pH fecal, por lo que los AGCC se relacionan con este pH y con la salud intestinal. Por ejemplo, en la fermentación bacteriana de los carbohidratos se produce un aumento de AGCC y ocurre una disminución del pH, asociándose a una reducción del riesgo de cáncer de colon rectal. Mientras que este riesgo se incrementa cuando la dieta es rica en grasa y azúcares refinados que conlleva a una elevación del pH con la fermentación, por lo que no se produce un aumento de AGCC (Chover, 2011). De igual manera, es importante mencionar que una dieta rica en fibra aumenta la actividad fermentativa de

la flora intestinal, provocando un incremento de AGCC en las heces y la disminución del pH. (Chover, 2011) (Russell & Duthie, 2011).



**Ilustración 1.** Pasos finales de la formación, tras la fermentación colónica de polisacáridos, acetato, propionato y butirato, los AGCC principales y los microorganismos responsables de su formación (Castillo & Marzo, 2017)

En todas las regiones del colon la suma de acetato, propionato y butirato, que son aniones de AGCC que se encuentran presentes en las heces humanas en una relación molar de ~ 60:20:20, respectivamente, representa el 90-95% de todos los AGCC. El rango del 5-10% restante está conformado por isobutirato, valerato, isovalerato y hexanoato que se producen durante la fermentación de proteínas (a partir de aminoácidos ramificados como valina, leucina e isoleucina). Por otro lado, las concentraciones de lactato y ácidos grasos de cadena ramificada aumentan en el colon distal (Rozenbloom et al., 2014).



### 1.3 Funciones de los ácidos grasos de cadena corta

Entre las principales funciones de los AGCC se puede destacar:

- Los AGCC son la fuente principal de energía para las células epiteliales del colonocito, del 5 al 10 % de los requerimientos energéticos basales son provistos por estos ácidos, como también para otros tejidos como el hígado y el músculo (Scott, Dunca, & Flint, 2010).
- Los AGCC modulan la quimiotaxis de células inmunitarias generando especies reactivas de oxígeno y citosinas. Esto ejerce un efecto positivo en la regulación de las enfermedades inflamatorias porque controlan la liberación de las células inmunes hacia el sitio de inflamación (Agudelo et al., 2016).
- Los AGCC favorecen a la proliferación colónica, aumentan el flujo sanguíneo colónico y son los combustibles preferenciales para el colon (Agudelo et al., 2016).
- La absorción de acetato y propionato regula el metabolismo hepático de la glucosa, reduciendo la glicemia postprandial y por tanto la respuesta insulínica, siendo el acetato el único AGCC detectable en sangre periférica (Guarner, 2016).
- El propionato es utilizado como sustrato para la gluconeogénesis y el ácido propiónico disminuye la síntesis hepática de colesterol por la inhibición de la actividad de la hidroximetilglutaril coenzima A (Guarner, 2016).
- El butirato es la principal fuente de energía para los colonocitos, el propionato es transportado al hígado donde tiene un papel en la gluconeogénesis, mientras que el acetato entra en circulación sistémica y se utiliza en la lipogénesis (Guarner, 2016).
- El butirato tiene un gran efecto trófico sobre la mucosa aportando energía, aumento de flujo sanguíneo del colon, incremento de secreción pancreática y estimulación del sistema nervioso autónomo (Guarner, 2016).
- El butirato es el sustrato preferido por el colonocito y provee entre el 60 y el 70 % de los requerimientos energéticos necesarios para su proliferación y diferenciación (Agudelo et al., 2016).
- Los AGCC de cadena ramificada (isovalerato, isocaproato y heptanoato) contribuyen al mantenimiento de la homeostasis de la mucosa intestinal (Agudelo et al., 2016).



#### 1.4 Absorción de los ácidos grasos de cadena corta

Los microorganismos mediante la fermentación logran la transformación de los nutrientes complejos como fibra dietética en AGCC y estos son los productos finales de la digestión de los carbohidratos y proteínas. Estos se absorben en más del 90% en los colonocitos del intestino grueso en su forma protonada por lo que también favorece a la absorción de electrolitos y agua (Berruezo et al., 2011).

La absorción de los AGCC no está influenciada por la presencia de micelas de sales biliares en el medio por lo que no necesitan ser solubilizados en los contenidos del lumen del intestino delgado para posteriormente ser absorbidos. Los mismos se difunden a través del citosol de la mucosa y al entrar en la sangre venosa, en donde mantienen su forma de ácido graso libre. Además, los AGCC no son transportados al retículo endoplásmico por lo que no se produce la reesterificación de los ácidos grasos (Gómez & Acero, 2011).

#### 1.5 Microbiota del tracto gastrointestinal

La actividad metabólica de la flora intestinal está relacionada con la producción de los AGCC por la fermentación bacteriana de los sustratos no digeribles de la dieta, recuperando energía metabólica y favoreciendo a la proliferación del ecosistema bacteriano (Louis & Flint, 2010). En particular, las especies benéficas de Bifidobacterias y Lactobacilos se relacionan con la producción de AGCC, así como también con la inmunoestimulación y efectos inhibitorios sobre el crecimiento de bacterias dañinas (Louis & Flint, 2010).

En el humano adulto existen más de 400 especies bacterianas diferentes en la flora intestinal, aunque solo las más abundantes han sido bien identificadas. Las bacterias residentes se distribuyen por la cavidad oral y a lo largo del tracto gastrointestinal TGI. En los niños recién nacidos, el TGI es prácticamente estéril. El colon en los niños nacidos por parto normal son colonizados principalmente por *Lactobacillus* y *Prevotella* inmediatamente después del nacimiento; mientras que, en el colon de niños nacidos por cesárea dominan las bacterias presentes en la piel de la madre como estafilococos,



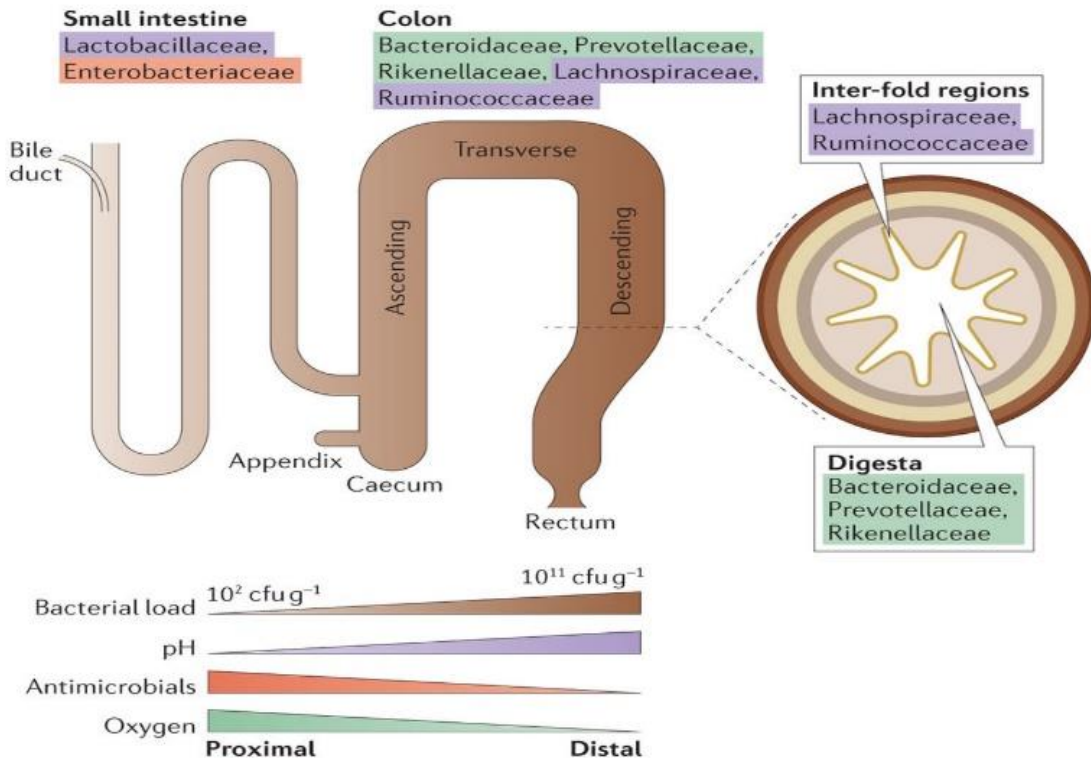
estreptococos y micrococcos, entre otros (Albenberg & Wu, 2014). Los niños alimentados con leche materna presentan bacterias tales como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* mientras que, en el caso de bebés alimentados con fórmulas lácteas predominan *Bacterioides spp.* y *Escherichia coli* (Marti del Moral, Moreno, & Martínez, 2010). Al llegar a los 3 años, la composición de la microbiota se estabiliza y se asemeja a la del futuro adulto, aunque pueden existir cambios al presentarse una enfermedad, ingerir antibióticos o cambios en la dieta (Albenberg & Wu, 2014). En las heces de los niños las bacterias encontradas son particularmente *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Marti del Moral et al., 2010). En los adultos, el estómago y la parte inicial del intestino delgado tienen unas  $10^5$  unidades formadoras de colonias (CFU), el íleon  $10^7$  y el colon entre  $10^{11}$  y  $10^{12}$ . La relación de bacterias anaeróbicas y aeróbicas es de 1.000 a 1 (Marti del Moral et al., 2010) (Walker et al., 2011).

Los phyllos bacterianos dominantes en el intestino son Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia. En el intestino delgado, las familias dominantes son Lactobacillaceae y Enterobacteriaceae, mientras que en el colon se caracteriza por la presencia de especies de las familias Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae, Lachnospiraceae y Ruminococcaceae. Una sección transversal del colon está dominada por Bacteroidaceae, Prevotellaceae y Rikenellaceae. Además, en las regiones entrelazadas de la luz, dominan las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae (**Ilustración 2**) (Donaldson, Lee, & Mazmanian, 2016).

Dominant gut phyla:

Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia

Predominant families in the:



Nature Reviews | Microbiology

**Ilustración 2.** Hábitats microbianos en el tracto gastrointestinal inferior humano (Donaldson et al., 2016)

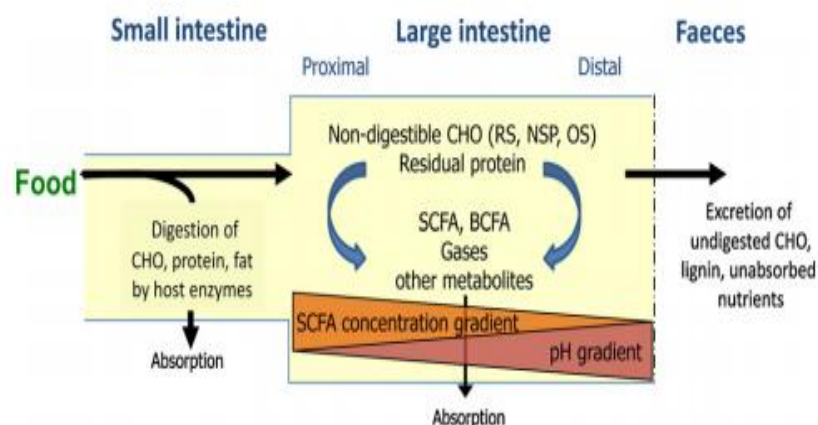
En general, la diversidad bacteriana tiende a disminuir con los años. En los ancianos, la microbiota puede verse afectada por cambios relacionados en la dieta, el sistema inmunitario, enfermedades, tratamiento con antibióticos, entre otros (Louis & Flint, 2010). Por otro lado, la microbiota del intestino delgado y el colon pueden ser influenciadas por factores fisiológicas, por ejemplo, si el gradiente de oxígeno es mayor, el pH es ácido y los péptidos antimicrobianos (incluidos los ácidos biliares, secretados por el conducto biliar) aumentan limitando la densidad bacteriana en el intestino delgado; mientras que en el colon el contenido de oxígeno es menor y el pH se alcaliniza aumentando la carga bacteriana.

## 1.6 Influencia de la dieta en la microbiota intestinal

La cantidad, el tipo y el equilibrio de los principales macronutrientes de la dieta (carbohidratos, proteínas y grasas) tienen un gran impacto en la composición y el metabolismo de la microbiota colónica, que a su vez influye en la producción de AGCC (Albenberg & Wu, 2014) (Chassard et al., 2011).

### 1.6.1 Carbohidratos

Aproximadamente 40 g de carbohidratos de la dieta alcanzan el colon cada día, los mismos que escapan de la digestión por la acción de las enzimas del huésped. Las formas principales de los carbohidratos disponibles para las bacterias en el colon incluyen carbohidratos no digeribles (fibra alimentaria y el almidón resistente), polisacáridos no amiláceos (PNA) y oligosacáridos. La fermentación de los polisacáridos complejos da como resultado la producción de AGCC, principalmente acetato, propionato y butirato, normalmente en una relación de 3:1:1 (**Figura 3**) (Scott et al., 2012).



**Ilustración 3.** Destino de los componentes alimenticios ingeridos en el intestino delgado y grueso. CHO - carbohidratos, RS - almidón resistente, NSP - polisacárido no amiláceos, OS - oligosacáridos, SCFA - ácidos grasos de cadena corta, BCFA - ácidos grasos de cadena (Scott et al., 2012)





El consumo alto de fibra insoluble produce una mayor cantidad de AGCC y estos son capaces de actuar como sustratos en el metabolismo del colesterol y el metabolismo de la glucosa (Albenberg & Wu, 2014).

El cambio de la cantidad o tipo de carbohidratos durante períodos de hasta cuatro semanas tiene una influencia profunda y rápida en la composición de la microbiota intestinal y sus productos metabólicos como los AGCC en adultos (Brinkworth, Noakes, Clifton, & Bird, 2010). El mayor sustrato butirogénico lo proporciona los almidones resistentes de los alimentos (Agudelo et al., 2016).

### **1.6.2 Proteínas dietéticas y bacterias proteolíticas**

Aproximadamente entre 12 y 18 g de proteína dietética residual y enzimas segregadas en el intestino delgado, alcanzan el colon humano a diario. Recientemente se propuso que dietas altas en proteínas se consumen para controlar el peso corporal. Además, de inducir a un cambio en el metabolismo bacteriano hacia la degradación de aminoácidos con diferentes perfiles de metabolitos según la fuente de proteína (Beaumont et al., 2017).

El camino principal de la fermentación de aminoácidos en el colon humano es la desaminación, lo que también conduce a la producción de AGCC y amoníaco. Alrededor del 30% del sustrato se convierte en acetato, propionato y butirato y los ácidos grasos de cadena ramificada (isobutirato, 2-metilbutirato e isovalerato) (Agudelo et al., 2016).

La cantidad y fuente de proteínas dietéticas van actuar como reguladores de la producción de metabolitos de la microbiota intestinal y la expresión génica del huésped en la mucosa rectal. Sin embargo, generan nuevas dudas sobre el impacto en la mucosa del intestino grueso (Beaumont et al., 2017).

En contraste con la fermentación de carbohidratos, el metabolismo microbiano de proteínas en el intestino grueso puede resultar en la formación de metabolitos deletéreos, incluyendo nitrosaminas. Además de los residuos de la dieta, la microbiota también metaboliza los sustratos endógenos tales como enzimas, células intestinales desprendidas y mucina. Específicamente, la *Akkermansia mucinophila* se ha



identificado como un degradador clave de mucina (Derrien, Vaughan, Plugge, & De Vos, 2004).

### 1.6.3 Grasas

Si bien las grasas de la dieta se absorben en la mayoría de los casos, se considera que el 7% de los ácidos grasos son excretados en las heces (Gabert et al., 2011). Pocos estudios han investigado el efecto de la grasa dietética en la microbiota humana. En la actualidad, aún se desconoce si el factor dietético crucial para la composición y el metabolismo de la microbiota es la grasa o contenido reducido de carbohidratos (Brinkworth et al., 2010).

## 1.7 Prebióticos en relación a la producción de AGCC

La dieta puede influir sobre la microbiota de dos maneras:

- Mediante la inclusión viable de microorganismos (probióticos), debido a su resistencia a la digestión, es decir, a los efectos del ácido gástrico, digestivo enzimas y ácidos biliares pueden alcanzar el colon y desarrollarse hasta ser metabólicamente activos (Gabert et al., 2011).
- Mediante la inclusión de sustratos no digeribles (prebióticos) que resisten la digestión y alimentan el colon para estimular el crecimiento y el metabolismo de los residentes en el intestino. (Gabert et al., 2011).

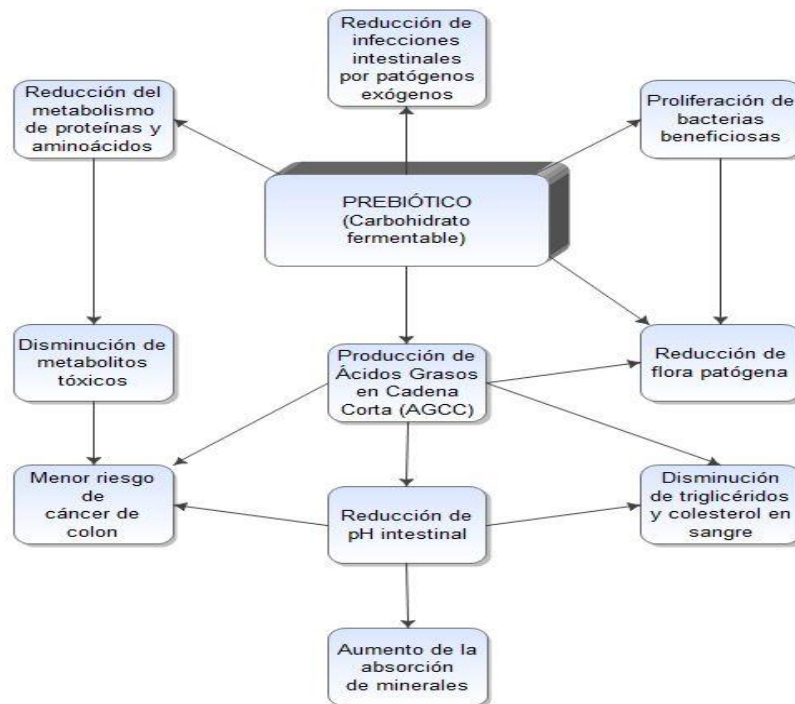
Los prebióticos son definidos como “*ingredientes alimentarios que al ser fermentados selectivamente producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo beneficios en la salud del individuo*” (Gibson et al., 2004). Es así que, los metabolitos generados a partir de carbohidratos prebióticos por los microorganismos mediante fermentación sacrolítica producen AGCC en el intestino grueso (Corzo et al., 2015). Las principales bacterias que degradan polisacáridos en el colon con sus respectivos productos de fermentación se presentan en la **Tabla 1**.



**Tabla 1.** Principales géneros bacterianos que fermentan carbohidratos complejos en el colon y sus productos de fermentación (Hernández & Sastre, 2010)

<b>Género bacteriano</b>	<b>Productos de la fermentación</b>
<i>Eubacterium</i>	Acetato, butirato y lactato
<i>Bifidobacterium</i>	Lactato y acetato
<i>Ruminococcus</i>	Acetato, lactato y succinato
<i>Clostridium</i>	Acetato, lactato, butirato y propionato
<i>Bacteroides</i>	Acetato, propionato y succinato
<i>Lactobacillus</i>	Lactato y acetato

La suplementación de la dieta con los prebióticos promueve el crecimiento de miembros específicos de los residentes de la microbiota intestinal, estimulando la producción de AGCC y reduciendo el pH, de manera que se ayuda en la exclusión de patógenos como se esquematiza en la **Ilustración 4** (COFENAT, 2017).



**Ilustración 4.** Acción de prebióticos en el organismo(COFENAT, 2017)

### 1.8 Método de análisis para la cuantificación de ácidos grasos de cadena corta

La cromatografía de gases es esencialmente un método físico de separación de compuestos químicos, método que falla cuando no se consigue la separación deseada, cuando la resolución entre picos es deficiente, o cuando las separaciones se logran en tiempos excesivamente largo. Las fallas parciales cuando se trata de obtener un método cromatográfico optimizado durante el análisis de analitos pueden ser numerosos, por lo que es necesario conseguir condiciones óptimas que impliquen la selección del tipo de columna, parámetros de la columna cromatográfica y condiciones operativas (Gascó, 2011).

Los ácidos grasos libres suelen analizarse por GC con columnas capilares en forma de ésteres volátiles, específicamente como ésteres metílicos (Rincón & Duque, 2014). Entre los métodos de análisis para la cuantificación y diferenciación de AGCC, el más comúnmente utilizado es el método cromatográfico de gases con detector de ionización a la llama (GC-FID), en donde la muestra ingresa como solución derivatizada en un



puerto de inyección donde es volatilizada y arrastrada a través de la columna cromatográfica por medio de un gas portador químicamente inerte (no interacciona con las moléculas del analito y su función es el transporte del mismo a través de la columna) permitiendo la separación, identificación y cuantificación de AGCC, que son mezclas complejas que requieren un previo tratamiento como la derivatización para lograr ser analizadas (Rincón & Duque, 2014).

### **1.8.1 Condiciones cromatográficas de optimización del método analítico**

Dentro de las condiciones operativas para el proceso de optimización, se considera que el volumen de inyección para muestras líquidas o soluciones previamente preparadas va desde 0,1-10  $\mu\text{L}$ , los cuales deben ser inyectados rápidamente en una sola descarga a una temperatura de 10°C a 50°C mayor a la temperatura de la columna sin la presencia de aire al momento del llenado. Es importante mencionar que, dependiendo de la cantidad de muestra disponible, el tipo de columna que se emplee y la concentración de los analitos, se debe aplicar un sistema de inyección apropiado para que la separación sea la más adecuada (Olguin & Rodriguez, 2004).

La inyección split aplicado en columnas capilares permite la inyección de muestras de tamaño reducido, con un flujo rápido en el inyector, simple de operar y con excelente acoplamiento. Generalmente se inyecta 1  $\mu\text{L}$  de muestra, pero realmente solo ingresan 0,01  $\mu\text{L}$  a la columna, por tal razón entre las desventajas de este sistema de inyección es que resulta en una división no lineal, donde se pierden altos pesos moleculares y degradación térmica, generando análisis limitados debido al desperdicio de cantidades considerables durante la vaporización de muestra en el momento de la inyección (Olguin & Rodriguez, 2004).

Para la elección de la columna cromatográfica se debe considerar la cantidad de muestra que se pueda inyectar sin pérdida apreciable de eficiencia (capacidad de carga) y los valores de los flujos del gas portador. Las columnas capilares contienen una capa de revestimiento sólido dentro de ella con poro en el centro que permiten aplicar una velocidad óptima de flujo más rápida (aproximadamente de 2- 5 ml por min en lugar de 1 ml por min) por lo que el análisis resulta más sensible (Arango & Duque, 2015).

El detector de ionización a la llama es un dispositivo que se encuentra dentro del cromatógrafo de gases, que permite medir la concentración de cada uno de los



componentes de la muestra y genera una señal eléctrica proporcional a dicha concentración. Es uno de los más versátiles y posee una alta selectividad hacia los compuestos que presentan enlaces C-H como los AGCC (Zambrano, Lineth, Arango, & Leidy, 2015). Posee una alta sensibilidad adecuada junto con un bajo nivel de ruido, buena estabilidad y reproducibilidad, manejo sencillo y alta fiabilidad (Rincón & Duque, 2014). La sensibilidad que proporciona el detector permite conocer la cantidad de señal generada por unidad de concentración o por unidad de masa de un analito en el gas transportador. Sin embargo, una desventaja del detector de ionización de llama es que se trata de un detector destructivo de la muestra (Rodríguez, 2014).

La temperatura de la columna es una variable importante en donde es preciso regular a décimas de grado con el fin de obtener una adecuada separación de los analitos, por ello la columna normalmente se introduce dentro de un horno termostaticado. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido. En la práctica, con una temperatura igual o ligeramente superior al punto de ebullición promedio de la muestra, se obtienen tiempos de elución razonables más corto (2 a 30 min). Para muestras con un amplio intervalo de ebullición, a menudo es conveniente emplear una programación de temperatura, con lo que se aumenta la temperatura de la columna de forma continua o por etapas, al mismo tiempo que tiene lugar la separación (Marín et al., 2007).

El programa de temperatura para la cuantificación de los AGCC se ejecuta de acuerdo al punto de ebullición de cada ácido con el fin de obtener el orden de elución establecido. Las condiciones de optimización para dichos compuestos están establecidas de forma semejante en la mayoría de métodos de optimización. Por otro lado, las diferencias que se pueden observar en GC-FID se basan principalmente en los cambios en la rampa de temperatura, ya que esta condición es crítica para la separación cromatográfica de los analitos. Según el criterio del analista se puede modificar la rampa de temperatura para que provoque la elución directa de todos los AGCC (Marín et al., 2007). Por ejemplo, varios métodos indican que la temperatura inicial debe ser de 110 seguido por una tasa de incremento de 6 °C/min (Coma, 2014), mientras que en otros la rampa inicia a una temperatura más baja (80°C) y continua con incrementos de 5 °C/min (Tan, Zhao, Liu, Ju, & Li, J, 2005).



### 1.8.2 Validación del método analítico por GC-FID

La validación de un método analítico consiste de procesos de evaluación sistemática que demuestran que el método a validar cumpla con los parámetros de desempeño analíticos necesarios para el uso que se le va a otorgar y se usa comúnmente para incorporar una técnica nueva al trabajo de rutina del laboratorio. De esta manera permite que el analista pueda estar seguro del grado de confianza sobre el resultado (Rodríguez, 2014).

Si se desea validar un método cromatográfico es necesario que cumpla varios parámetros analíticos instrumentales para demostrar que las características de funcionamiento del procedimiento del método cumplan con los requerimientos necesarios para la aplicación prevista de cuantificar analitos. Entre estos parámetros están especificidad, linealidad, rango dinámico lineal, precisión intra-día e inter-día, límite de detección y límite de cuantificación (Rodríguez, 2014).

La especificidad se refiere al 0% de interferencias de picos ajenos a los del analito de interés, basándose en las ventanas de los tiempos de retención, en donde el analito o los analitos de interés son retenidos durante su recorrido cromatográfico a un tiempo determinado y ese valor se mantiene mientras no se modifiquen las condiciones cromatográficas. Se acepta un coeficiente de variación menor al 5% (Arango & Duque, 2015).

La linealidad y el rango dinámico lineal se determinan mediante la construcción de curvas de calibración permitiendo obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analitos en la muestra dentro de un rango establecido. Este rango va a estar entre la concentración superior e inferior del analito para el cual ya se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método (Arango & Duque, 2015). Los criterios mínimos aplicables para la linealidad son (Rodríguez, 2014):

- Para el rango establecido se recomienda estudiar al menos 5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado. Como punto importante es requerido analizar las muestras en sentido creciente de concentración para minimizar posibles efectos memoria en el equipo.



- Las muestras a analizar se deben preparar a partir de estándares de analito de concentración conocida.
- El número de repeticiones de cada muestra dependerá de la precisión del sistema instrumental empleado (Rodríguez, 2014).
- Preparar una tabla relacionando las concentraciones (X) y áreas (Y). La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo ( $y=mx+b$ ) (Rodríguez, 2014).

En cuanto a precisión se debe tener una concordancia mutua entre datos que se han obtenido de la misma forma, logrando indicar la medida del error aleatorio de un análisis. Es importante evaluar por lo menos tres concentraciones en el rango esperado y realizar tres o cuatro determinaciones para cada concentración (Rodríguez, 2014). Diferentes autores aceptan un coeficiente de variación igual o inferior al 5 o 10 % (Arango & Duque, 2015). Según la legislación europea, en el caso del análisis repetido de una muestra llevada a cabo en condiciones de reproducibilidad dentro del laboratorio, el coeficiente de variación (CV) intra-laboratorio de la media admite hasta <20% para métodos cuantitativos (European Communities, 2010).

Dentro de la precisión existe algunos términos relacionados: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad es donde los resultados deben concordar y ser realizados por el mismo investigador, los mismos reactivos, laboratorio e instrumento en un corto periodo de tiempo. La precisión intermedia trata de la variabilidad del método ejecutando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes y en un mismo laboratorio. La reproducibilidad es donde la variabilidad del método es bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios (Rodríguez, 2014).

En cuanto a la concentración mínima detectable (LOD) corresponde a la concentración más baja del analito presente en una muestra que puede ser detectable en las condiciones experimentales de trabajo. El límite de cuantificación (LOQ) es la concentración más baja del analito presente en una muestra que puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptable en las condiciones experimentales de trabajo. Se pueden determinar de varias formas estos límites como por ejemplo a partir de las curvas de calibración para la linealidad mediante fórmulas (Arango & Duque, 2015).





## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Diseño y tipo de investigación

El presente estudio fue de tipo cuantitativo, analítico, no experimental de corte transversal con un componente de optimización analítica que incluyó optimización del método cromatográfico y la validación del mismo, la determinación de los AGCC y su cuantificación en las muestras de digerido intestinal.

### 2.2. Muestreo

No se aplicó muestreo para la obtención de las muestras. Las muestras de digerido intestinal fueron provistas por el laboratorio de Nutrición y Alimentos del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca y que fueron obtenidas a partir del ensayo gastrointestinal *in vitro* según el “PNT: Gastrointestinal *in vitro* assay” del mencionado laboratorio. En total, se analizaron 300 muestras.

### 2.3. Análisis de las muestras de ácidos grasos de cadena corta

#### 2.3.1. Procedencia de las muestras

Las muestras de AGCC fueron provistas por el laboratorio de Nutrición y Alimentos del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en micro-tubos de polietileno de 1.5 ml. Una vez recolectadas todas las muestras, fueron etiquetadas en períodos 3 y 4 (fase colónica) para su posterior análisis.



### 2.3.2. Equipos, materiales y reactivos

- Instalaciones, estándares y la mayoría de los materiales para la preparación de muestras fueron provistos por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición. El cromatógrafo de gases con un detector de ionización a la llama modelo 6890N (Agilent technologies, Estados Unidos), la microjeringa de inyección 5  $\mu$ l (Hamilton, Estados Unidos) y una columna capilar GC Zebron ZB-FFAP (30 m x 0.53 mm x 1.0  $\mu$ m) ( $^{\circ}$ T máx: 250  $^{\circ}$ C) fueron provisto por el Laboratorio de instrumental de la Facultad de Ciencias Químicas. Las muestras destinadas para el análisis se mantuvieron durante todo el proceso en el ultrafreezer -80  $^{\circ}$ C (Arctiko, Dinamarca) del Laboratorio Clínico de la Universidad de Cuenca. Todos los reactivos dietil éter para análisis, cloruro de sodio puro p.a., hidróxido de sodio 1N p.a. y ácido sulfúrico 1:1 (v/v) todos estos (Merck, Alemania) fueron almacenados a temperatura ambiente excepto el Ácido 2-metilhexanoico (patrón interno para el análisis GC-FID) y la mezcla de estándares de ácidos libres volátiles que se mantuvieron en refrigeración a 4 $^{\circ}$ C durante todo el análisis. Finalmente, el agua destilada que se utilizó se obtuvo a partir de un sistema de purificación de agua Milli-Q $^{\circ}$  adquirida en Merck Millipore.

## 2.4 Métodos analíticos

### 2.4.1 Optimización del método analítico por GC-FID

El primer paso para la optimización del método analítico por GC- FID fue la revisión bibliográfica, en donde se buscaron diferentes alternativas de métodos cromatográficos ya existentes para determinar los parámetros instrumentales comúnmente utilizados para el análisis. Se decidió probar dos posibilidades de parámetros instrumentales según Coma y col. (2014) y Tan y col. (2005) (Coma, 2014), (Tan et al., 2005), los cuales proporcionaron datos sobre el volumen de inyección de la muestra, temperatura del inyector, split ratio, velocidad de flujo en la columna, gas portador, temperatura del detector y programa de temperaturas para el horno. Luego de varios ensayos preliminares, los parámetros instrumentales fueron modificados y adaptados para obtener el método cromatográfico final, en términos de eficiencia y resolución con una



corrida cromatográfica de una duración total de 12,75 min para obtener los 9 picos cromatográficos y del estándar interno (IS). El método presenta las siguientes condiciones:

- Volumen de inyección: 1  $\mu$ L
- Temperatura del inyector: 200°C
- Split ratio: 30:1
- Gas portador: nitrógeno
- Flujo de la columna: constante a 5 mL/min (presión: 4,5 psi; velocidad promedio: 42 cm/s, flujo total: 158 mL/min)
- Programa de temperatura: inicia a 110 °C por 0.5 min, seguido de una rampa hasta 160 °C a una tasa de incremento de 8 °C/min, luego alcanza una temperatura de 180 °C a una tasa de incremento de 10 °C/min, y finalmente se mantiene a 180 °C por 4 minutos
- Temperatura del detector: 200°C
- Proporción Aire sintético/Hidrógeno (FID) fue de 400 / 30 mL/min

#### **2.4.2 Preparación de la solución de estándar interno (IS)**

La determinación de AGCC se realiza utilizando el ácido 2-metilhexanoico como estándar interno (IS). La solución de IS utilizada en el análisis se prepara midiendo 1.5mL del ácido 2-metilhexanoico puro en un balón de aforo de 100 mL y se ajusta el volumen con una solución de hidróxido de sodio 1N. Esta solución resultante se transfiere a un frasco tapa rosca de 250 mL. Se enjuaga el balón de aforo utilizado con exactamente 100 mL de agua tipo I y esto se añade al frasco de 250 mL que contiene la solución anterior. El volumen final de la solución es de 200 mL. Esta solución debe mantenerse en refrigeración (4-8 °C) protegido de la luz hasta el momento del análisis (Laboratorio de Alimentos y Nutrición-VLIR, 2017).



### 2.4.3 Preparación de la muestra

#### 2.4.3.1 Dilución de las muestras de digerido intestinal

Todas las muestras de digerido intestinal fueron previamente diluidas hasta alcanzar un volumen de 2 mL que corresponde al volumen requerido para la reacción de derivatización. La dilución dependió de la cantidad de las muestras provistas en cada microtubo. Para el 90% de las muestras, el volumen provisto fue de 1200  $\mu\text{L}$  de muestra al que se le añadió un volumen de 800  $\mu\text{L}$  de agua tipo I. El 10% restante se trató de un grupo de muestras de guayaba roja fruta (*Psidium guajava L.*) cuya dilución fue de 250  $\mu\text{L}$  de muestra completando el volumen con 1700  $\mu\text{L}$  de agua tipo I.

#### 2.4.3.2 Derivatización y extracción etérea

Se colocaron 2 mL de muestra (o estándar o blanco de agua) en un tubo tapa rosca de 12 mL y se adicionaron 0.5 mL de una solución de ácido sulfúrico 1:1 (v/v), 0.4 g de NaCl sólido, 0.4 mL de la solución alcalina de estándar interno y 2 mL de dietil éter tapando inmediatamente el tubo. Luego se homogenizó durante 2 minutos utilizando un agitador vórtex. Para la separación de fases fue necesario centrifugar la solución por 3 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante o capa orgánica (fase etérea) fue transferida a otro tubo con tapa rosca y se mantuvo en refrigeración (4-8 °C) hasta el momento de la inyección en el GC. Para la adición de la muestra/ estándar/ blanco de agua y de la solución de estándar interno (IS) se usaron micropipetas con el fin de evitar interferencias y errores de medición; mientras que para adicionar las soluciones ácida y etérea se utilizaron pipetas serológicas (Laboratorio de Alimentos y Nutrición-VLIR, 2017).

### 2.4.4 Análisis por GC-FID

Para el análisis de los AGCC, un volumen de 1  $\mu\text{L}$  del extracto etéreo derivatizado fue inyectado manualmente al sistema CG-FID. La separación cromatográfica se realizó en una columna capilar GC Zebron ZB-FFAP (30 m x 0.53 mm x 1.0  $\mu\text{m}$  espesor de



película). La separación de los AGCC se consiguió con el método previamente optimizado (véase 2.4.1.).

#### 2.4.5 Validación del método analítico

La validación del método se realizó siguiendo la estrategia “in-house” que corresponde a la evaluación de los parámetros mínimos y necesarios para asegurar la calidad y aplicabilidad del método optimizado. Los parámetros a evaluarse fueron: rango dinámico lineal, linealidad, precisión inter-día e intra-día, límites de detección, límites de cuantificación y especificidad.

##### 2.4.5.1. Linealidad y Rango dinámico lineal

Para los experimentos de validación, se prepararon una serie de diluciones a partir de una solución stock de estándares *ácidos volátiles libres* de 10 mM (Tabla 2).

**Tabla 2.** Serie de diluciones 1:2 a partir de la solución madre estándar (Laboratorio de Alimentos y Nutrición-VLIR, 2017)

	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6	Nivel 7	Nivel 8
Dilución	½	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/100	1/125
Stock 10 mM (µL)	1000	500	250	125	62,5	37,5*	20	16
Agua HPLC (µL)	1000	1500	1750	1875	1937,5	2362,5*	1980	1984
Volumen total	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2,4ml*	2 ml	2 ml

\* Se preparó 2.4 mL en el nivel 6 para que sea medible en micropipeta.

Todos los estándares fueron derivatizados y se inyectaron por duplicado en el GC-FID. Con los análisis resultantes se establecieron las ventanas de los tiempos de retención (tR) siendo el tR promedio  $\pm$  2,5%.

La linealidad y el rango dinámico lineal se evaluaron realizando las curvas de calibración para cada uno de los ácidos desde el nivel 1 al nivel 8, en donde se calcularon las concentraciones para cada ácido a partir de la solución estándar cuya concentración es



de 10 mM Esta concentración fue dividida para cada factor de dilución obteniéndose así las concentraciones en mM para cada nivel (N1-N8). Luego, se multiplicó las concentraciones calculadas en mM por los pesos moleculares correspondientes para cada AGCC. Cabe recalcar, que lo que se midió en el cromatograma fueron ésteres de metilo (por el proceso previo de derivatización y extracción etérea) mientras que para los cálculos se consideraron a los analitos en su forma de ácidos libres (**Tabla 3**).

Cabe mencionar que se realizaron diluciones superiores a 1/160; sin embargo, al observar una pérdida de la linealidad a partir de este punto, se descartaron estos resultados y se determinó que la máxima dilución posible que permita mantener la linealidad fue la dilución 1/125.

Las curvas de calibración se construyeron siguiendo el método de estandarización interna, en el que el eje de las ordenadas corresponden al área relativa ( $Y_r = \text{área estándar}/\text{área IS}$ ) y el eje de las abscisas corresponde a la concentración relativa ( $X_r = \text{Conc estándar}/\text{Conc IS}$ ) (Laboratorio de Alimentos y Nutrición-VLIR, 2017). La concentración de todos los AGCC fueron determinados mediante interpolación en las curvas de calibración utilizando los valores del área y concentración relativos con respecto al estándar interno (IS) en la siguiente ecuación:

$$Y_r = m X_r + b$$

Dónde:

$Y_r$  corresponde al área relativa (estándar/IS)

$X_r$  corresponde a la concentración relativa (estándar/IS)

$m$  corresponde a la pendiente

$b$  corresponde al intercepto

**Tabla 3.** Concentraciones de los estándares de AGCC en los niveles de trabajo en mM y mg/L

Nivel	Factor de dilución	Concentración mM	Ácido acético	Ácido propiónico	Ácido butírico	Ácido isobutírico	Ácido valérico	Ácido isovalérico	Ácido caproico	Ácido caproico	Ácido heptanoico
N1	1/2	10	600,5	741,0	881,0	881,1	1021,3	1021,3	1161,6	1161,6	1301,8
N2	1/4	2,5	150,1	185,2	220,3	220,3	255,3	255,3	290,4	290,4	325,5
N3	1/8	1,25	75,1	92,6	110,1	110,1	127,7	127,7	145,2	145,2	162,7
N4	1/16	0,625	37,5	46,3	55,1	55,1	63,8	63,8	72,6	72,6	81,4
N5	1/32	0,312	18,7	23,1	27,5	27,5	31,9	31,9	36,2	36,2	40,6
N6	1/64	0,156	9,4	11,6	13,7	13,7	15,9	15,9	18,1	18,1	20,3
N7	1/100	0,1	6,0	7,4	8,8	8,8	10,2	10,2	11,6	11,6	13,0
N8	1/125	0,8	4,8	5,9	7,0	7,0	8,2	8,2	9,3	9,3	10,4



#### **2.4.5.2. Precisión inter-día e intra-día**

La precisión inter e intra-día se determinó por triplicado durante 3 días consecutivos a 3 niveles de las soluciones estándar (N1, N4 y N6). Los coeficientes de variación (%CV) se calcularon para cada nivel. El %CV inter-día se calculó como el pooled CV de cada día en base a un análisis de varianza de un factor; mientras que el %CV intra-día se calculó como el promedio de los 3 días analizados (Kamala et al., 2015).

#### **2.4.5.3. Límites de detección y límites de cuantificación**

Los límites de detección (LOD) se calcularon usando fórmula:

$$\text{LOD} = (3 * s_{eb}/m) * \text{concentración IS}$$

Donde  $s_{eb}$  es el error estándar del intercepto y  $m$  es la pendiente de la curva de calibración.

Los límites de cuantificación (LOQ) se calcularon como  $\text{LOD} \times 2$  (Kamala et al., 2015).

#### **2.4.5.4. Especificidad**

Para determinar la especificidad se analizaron alrededor de 5 muestras blanco de digestión intestinal determinando que no existan interferencias de picos ajenos a los analitos en cada una de las ventanas de  $t_R$ .

#### **2.4.6 Aplicación del método analítico**

El método analítico optimizado y validado se aplicó para el análisis por duplicado de 300 muestras de digerido intestinal provistas por el Laboratorio de Nutrición y Alimentos. Las matrices que se analizaron por GC-FID taxo en batido de leche, taxo en jugo con agua, taxo en fruta (*Passiflora tripartita*), zapote (*Manilkara zapota*), guayaba roja (*Psidium guajava L.*), guayaba roja en jugo, guayaba roja en mermelada, guayaba blanca





(*Psidium guajava*), guayaba blanca en jugo y guayaba blanca en mermelada. Los posteriores análisis estadísticos se realizaron únicamente para las muestras de taxo en jugo de agua y batido de leche para demostrar la aplicabilidad del método analítico. Se utilizó esta matriz con el fin de encontrar diferencias tanto en la dieta ecuatoriana como en la dieta occidental en la producción de AGCC. Estas dietas fueron utilizadas en los ensayos gastrointestinales (**Ilustración 5**).

<b>Ecuadorian Diet</b>			<b>Western Diet</b>		
<b>Food composition</b>	<b>Constituents</b>	<b>Feed (8 g/L)</b>	<b>Food composition</b>	<b>Constituents</b>	<b>Feed (8 g/L)</b>
<b>Carbohydrates</b>	Starch	4.6	<b>Carbohydrates</b>	Starch	0.0
	sucrose	1.1		sucrose	4.9
	dietary fibre	0.2		dietary fibre	0.0
<b>Proteins</b>	Casein	0.3	<b>Proteins</b>	Casein	1.1
	Gluten	1.0		Gluten	0.5
<b>Lipids</b>	Sunflower oil	0.8	<b>Lipids</b>	Sunflower oil	1.5
<b>SUM</b>		8.0	<b>SUM</b>		8.0

**Ilustración 5.** Composición de la dieta Ecuatoriana y Occidental por litro de solución (Laboratorio de Alimentos y Nutrición-VLIR, 2017)

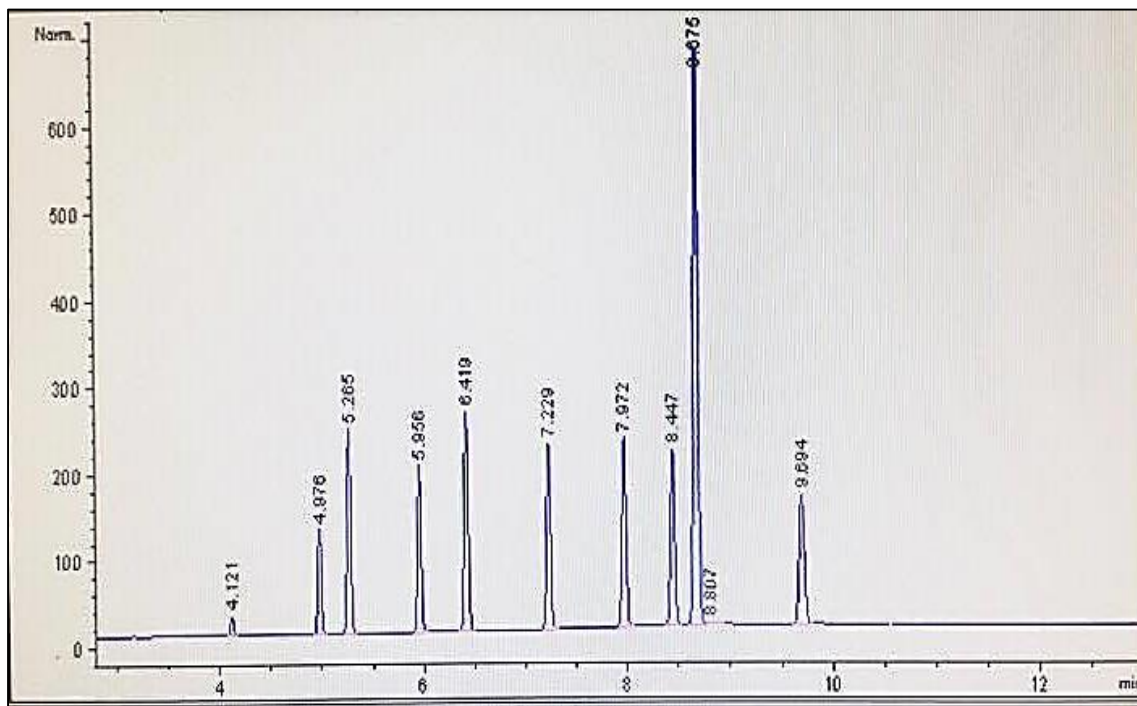
#### 2.4.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en los cálculos de los parámetros de la validación del método analítico. Además, a manera de caso estudio, se realizaron los cálculos de las concentraciones de los ácidos grasos de cadena corta a partir de los cromatogramas de dos de las diez matrices de alimentos en las que se aplicó el método optimizado y validado. En estas muestras (jugo de taxo en agua y jugo de taxo en leche) se realizó un análisis estadístico descriptivo (medidas de tendencia central y gráficos) y comparativo en función de la dieta matriz de los ensayos gastrointestinales (dieta ecuatoriana vs. dieta occidental) mediante un t-t de Student de dos colas con un nivel de significancia del 5% ( $p < 0,05$ ). Los cálculos se realizaron en Microsoft Excel 8.0. y los análisis estadísticos en el programa Stata 10.0.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1 Optimización y validación del método cromatográfico para el análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

El método cromatográfico se optimizó en términos de eficiencia y que cumpla con la resolución de los picos cromatográficos. El método resultante separa los picos y limpieza en un lapso de 12,75 minutos (*Ilustración 6*). Los tiempos de retención (tR) y las ventanas de tR de cada AGCC se presentan en la (*Tabla 4*). Los parámetros de análisis se indican en el punto 2.4.1 de la sección “2. Metodología”.



*Ilustración 6.* Cromatograma de la mezcla de AGCC e IS en base al método optimizado

**Tabla 4.** *Tiempos de retención (tR) y las ventanas tR de cada AGCC*

<b>AGCC</b>	<b>Tiempo de retención (tR) (minutos)</b>	<b>Ventana de tR (minutos)</b>
Ácido acético	4,079	3,9-4,2
Ácido propiónico	4,933	4,8-5,0
Ácido isobutírico	5,223	5,1-5,4
Ácido butírico	5,911	5,8-6,1
Ácido isovalérico	6,375	6,2-6,5
Ácido valérico	7,184	7,0-7,4
Ácido isocaproico	7,927	7,7-8,1
Ácido caproico	8,402	8,2-8,6
Estándar interno (IS)	8,631	9,3-9,8
Ácido heptanoico	9,645	8,4-8,8

Para la optimización del método analítico por CG-FID, fue necesaria la evaluación de diferentes métodos cromatográficos con el fin de determinar que método es el más eficaz para la cuantificación de AGCC. Para poder determinar las condiciones analíticas del método cromatográfico, se valoró la calidad del cromatograma tomando en cuenta la resolución y el tiempo de análisis. Inicialmente, se evaluaron dos métodos analíticos de artículos científicos ((Coma, 2014) y (Tan et al., 2005)), los que presentaban cierta similitud en cuanto a condiciones de volumen de inyección, la temperatura del inyector y el split ratio. Cada método fue probado mediante la inyección de un estándar al cromatógrafo para comprobar que tanto el flujo de la columna y el programa de temperatura del horno no afecten el orden de elución de los AGCC. La temperatura es considerada como una variable determinante dentro de la cromatografía de gases, así como el punto de ebullición de los analitos, ya que esto depende su correcta separación. Por lo tanto, la rampa de temperatura del horno se modificó de acuerdo a los diferentes puntos de ebullición de los ácidos. Sin embargo, se observó que las rampas de temperatura ejecutadas provocaban una elución directa y rápida de los AGCC por su alta volatilidad, por lo que no eran visibles a la vista del analista y se decidió modificar el programa y adaptarlo en las condiciones necesarias que se ajusten correctamente al equipo y el método cromatográfico final.



Como resultado de las pruebas en las rampas de temperatura del inyector, detector y horno, se obtuvo los distintos tiempos de retención de los AGCC de acuerdo al orden de elución que corresponde. La optimización de la rampa de temperatura permitió reducir el tiempo de análisis desde las pruebas iniciales de alrededor de 20 minutos a el método analítico optimizado con una corrida total de 12.75 min.

Las condiciones de separación reportadas en el GC-FID son similares a otros métodos como (Schettino et al., 2011) y (Delgado, 2012). Sin embargo, uno de estos métodos difirió en un punto crítico pues utilizaron temperaturas más altas para la detección no solo de AGCC sino también de ácidos grasos de cadena media y larga de acuerdo a los puntos de ebullición. Por tal razón, se destaca la importancia en la calidad de los métodos cromatográficos en base a los incrementos de temperaturas que se logren ejecutar de acuerdo a las propiedades físico-químicas de los compuestos, principalmente sobre los tiempos de ebullición, ya que dependiendo de esto se establecerá la mejor temperatura de elución para cada ácido y así conseguir las condiciones óptimas de separación y cuantificación de los analitos en cuestión (Schettino et al., 2011).

La separación de los analitos se realizó en una columna capilar GC Zebron ZB-FFAP (30 m x 0.53 mm x 1.0  $\mu$ m) que contiene una fase estacionaria de polietilenglicol modificado con ácido nitrotereftálico. Esta fase estacionaria, gracias a sus características polares, permite la obtención de picos muy bien definidos y resueltos de mezclas mixtas de AGCC, todo esto bajo las condiciones predeterminadas del método optimizado. En general este tipo de columna es utilizada principalmente en la industria alimentaria para la obtención de picos de alta resolución de ácidos no enriquecidos, ácidos orgánicos y ácidos grasos libres (Phenomenex, 2017).

La validación del método se realizó siguiendo la estrategia “in-house” que corresponde a la evaluación de los parámetros mínimos y necesarios para asegurar la calidad y aplicabilidad del método optimizado que fueron rango dinámico lineal, linealidad, precisión inter-día y entre-día, recuperación, límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ) y especificidad (**Tabla 5**).



**Tabla 5.** Resultados de los parámetros analíticos de la validación del método cromatográfico de AGCC

		Características del método analítico									
	Unidad	Ácido acético	Ácido propiónico	Ácido isobutírico	Ácido butírico	Ácido isovalérico	Ácido valérico	Ácido isocaproico	Ácido caproico	Ácido heptanoico	
<b>LOD</b>	mg/L	2,50	2,00	2,02	1,81	1,49	1,14	0,57	1,03	0,74	
<b>LOQ</b>	mg/L	5,01	4,00	4,04	3,63	2,98	2,28	1,15	2,06	1,49	
<b>Precisión Intra- día</b>	%CV	N1(1/2)	9,0	7,5	12,7	10,5	10,6	7,8	3,4	2,0	6,3
		N4(1/16)	12,5	6,6	6,0	6,6	5,6	3,7	1,0	1,7	2,1
		N6(1/64)	6,9	10,2	13,4	14,4	13,5	13,8	0,4	11,2	11,5
<b>Precisión Inter- día</b>	%CV	N1(1/2)	19,9	17,5	15,3	13,6	11,5	8,8	3,5	2,9	7,9
		N4(1/16)	17,5	7,5	6,0	5,5	3,0	3,9	1,8	1,9	3,5
		N6(1/64)	10,7	8,4	6,3	8,6	5,1	4,6	3,9	4,0	1,2
<b>Rango lineal</b>	mg/L	4,8-300,3	5,9-370,5	7,5-440,5	7,5-440,5	8,2-510,7	8,2-510,7	9,3-589,3	9,3-589,3	10,4-650,9	
<b>Linealidad (R<sup>2</sup>)</b>	-	0,989	0,9953	0,9966	0,9973	0,9986	0,9992	0,9998	0,9995	0,9998	

\*(LOD) Límite de detección; (LOQ) Límite de cuantificación; (N1) Nivel uno; (N4) Nivel cuatro; (N6) Nivel seis, Factores de dilución (1/2, 1/16, 1/64)



La linealidad del método se evaluó mediante la construcción de curvas de calibración a partir de la mezcla de estándares de ácidos libres volátiles (Supelco Volatile Free Acid Mix). Se obtuvo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) cercano a uno para todos los AGCC. Con respecto al rango dinámico lineal, para todos los AGCC este fue muy amplio, siendo el más bajo 4,8-300,3 mg/L para el ácido acético y el más alto de 10,4-650,9 para el ácido heptanoico.

Con respecto a la precisión, los coeficientes de variación (%CV) de los ensayos intra-día fueron inferiores a 14.4%. Además, la mayor variación se observó a la menor concentración de los ensayos (N6) con su factor de dilución (1/64), lo que concuerda con la literatura particularmente cuando se acerca al LOD (Taverniers, Loose, & Bockstael, 2004). Por otro lado, los %CV de los ensayos inter-día fueron muy variables e inferiores a 19.9%, siendo excepcionalmente mayor para la concentración más alta (N1) y para el ácido acético en las 3 concentraciones del ensayo (N1, N4 y N6). En general, un %CV < 20 es el límite aceptable según las recomendaciones Europeas para el desarrollo de métodos analíticos cuantitativos (European Communities, 2010). Sin embargo, existen otros autores que refieren valores que oscilan entre 5-10 %CV para aceptar la precisión de un método validado (Rodríguez, 2014). La principal causa de los %CV obtenidos podrían estar relacionada con la inyección manual y volatilidad de las muestras, por lo que resulta fundamental inyectar la muestra por lo menos por duplicado. En cuanto a los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) son lo suficientemente bajos como para detectar y cuantificar la presencia de AGCC en muy pequeñas cantidades, lo que garantiza su aplicabilidad en muestras biológicas.

Al momento de comparar los valores del método GC-FID con otros valores obtenidos de la validación del estudio realizado en el año 2014 de validación de un método cromatográfico para la determinación de AGCC y ácidos grasos de cadena larga en queso (Estrada, Ariño, & Juañe, 2014) se evidenció que el método a la final fue lineal en el rango de concentraciones descritas con un  $R^2$  mayor 0,995 como criterio para determinar la linealidad del método. Además, presentó una buena sensibilidad, considerando los límites de detección y cuantificación. Para el caso del ácido butírico el rango lineal se expresó como el intervalo comprendido entre el límite de cuantificación y la máxima concentración estudiada, mientras que en el método validado por GC-FID

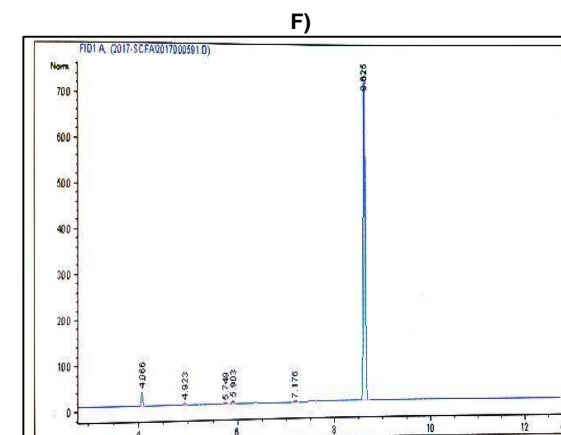
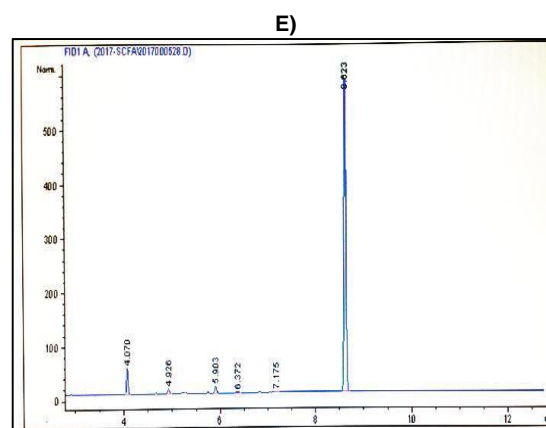
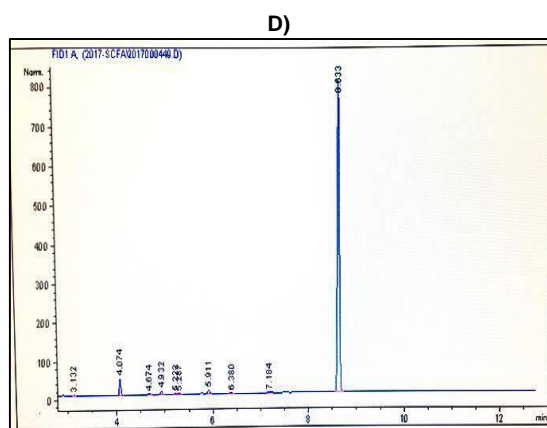
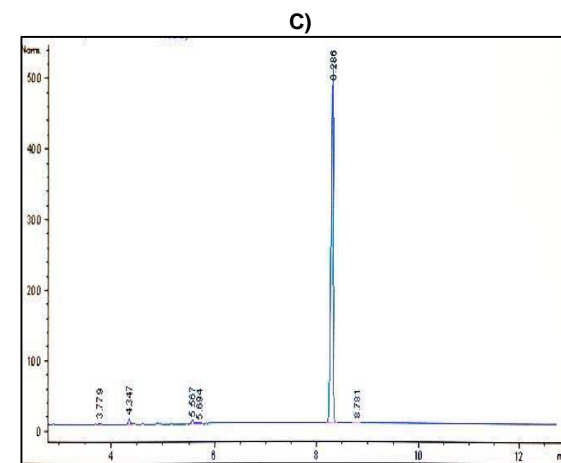
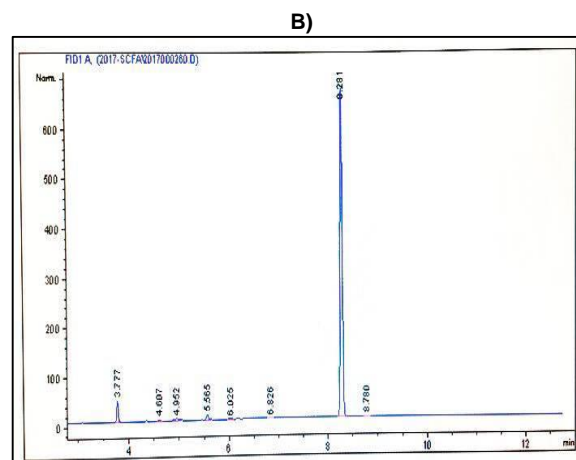
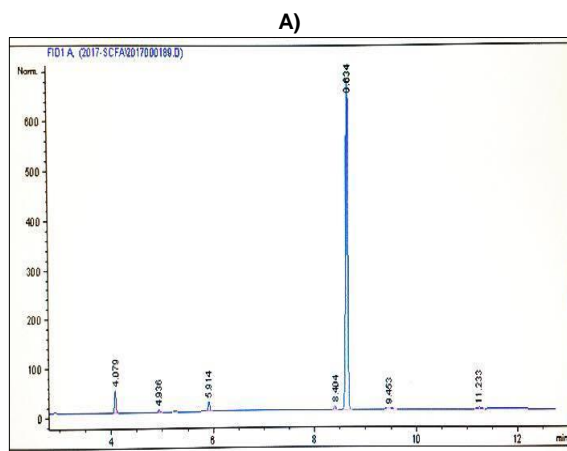


presentó límites como para detectar y cuantificar los AGCC en muy pequeñas cantidades, permitiendo su aplicabilidad en muestra de digerido intestinal.

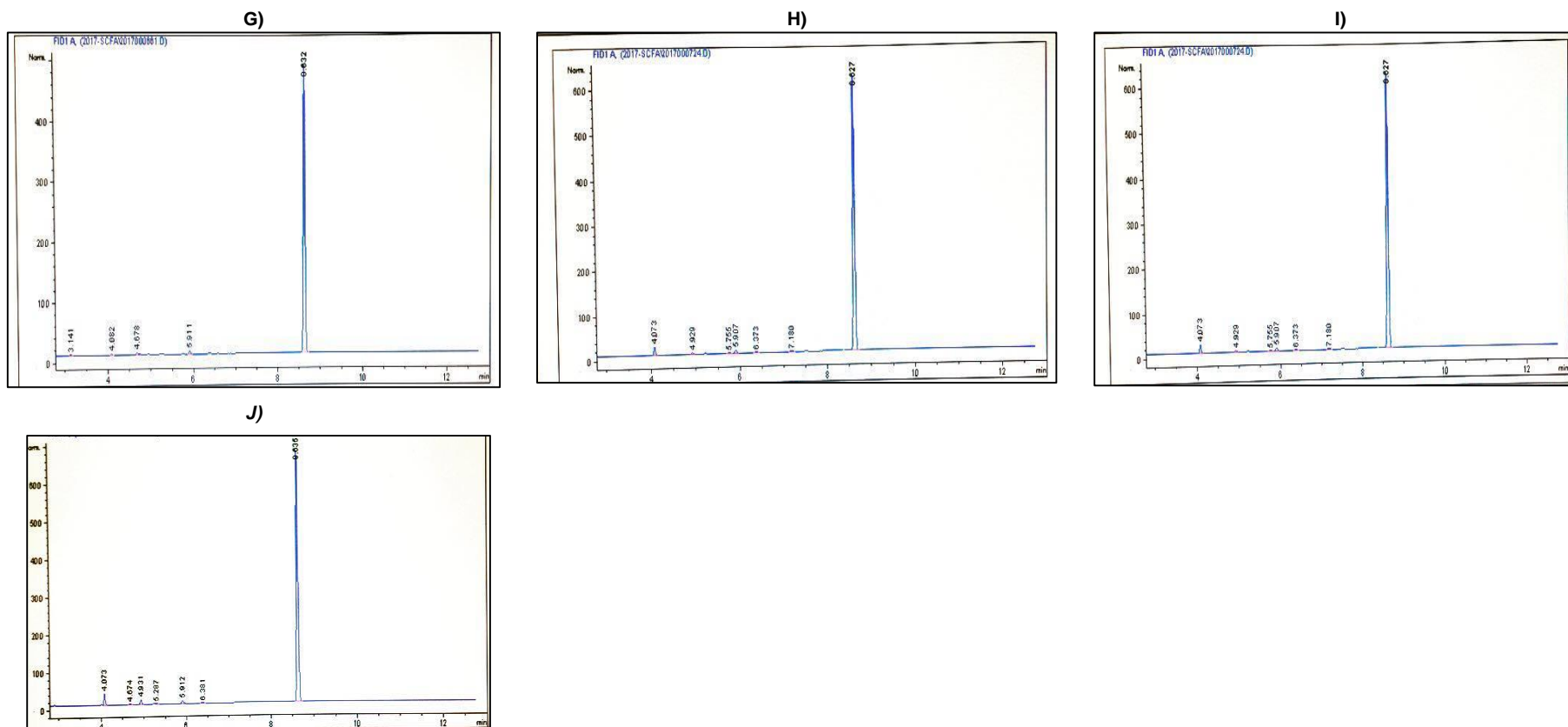
La especificidad del método se comprobó evidenciando la ausencia de picos interferentes mediante la inyección de blancos de muestra y muestras como tal.

### **3.2 Aplicabilidad del método optimizado por GC-FID para evaluar el contenido de AGCC en muestras de digerido intestinal in-vitro**

La aplicabilidad del método analítico optimizado y validado se realizó mediante el análisis de muestras de digerido intestinal con la matriz de taxo en sus preparaciones con agua y leche provistas por el laboratorio de Nutrición y Alimentos. Sin embargo, se analizaron 10 matrices de trabajo (Taxo en batido con leche, taxo en jugo con agua, taxo (fruta), zapote (fruta), guayaba roja (fruta), guayaba roja en jugo, guayaba roja en mermelada, guayaba blanca (fruta), guayaba blanca en jugo y guayaba blanca en mermelada). Los cromatogramas de AGCC generados a partir de estas muestras se presentan en la ***Ilustración 7***.







**Ilustración 7.** Cromatogramas: A (taxo en leche); B (taxo en agua); C (taxo fruta); D (guayaba roja fruta); E (guayaba roja en jugo); F (guayaba roja mermelada); G (guayaba blanca fruta); H (guayaba blanca jugo); I (guayaba blanca mermelada) y J (zapote fruta)



### 3.3.1 Comparación entre diferentes condiciones de los ensayos gastrointestinales (caso estudio)

De todos los tipos de muestras analizadas con el método por GC-FID optimizado y validado, se eligieron dos de las diez matrices de alimentos para evaluar las diferencias en la producción de AGCC por la microflora in vitro en función de la dieta matriz de los ensayos gastrointestinales (dieta ecuatoriana vs. dieta occidental). Estas muestras o matrices fueron: taxo en batido con leche y taxo en jugo con agua. Los resultados de la producción de AGCC por la microflora colónica a partir de cada matriz de alimento sometida a digestión in-vitro con una solución blanco de jugo gástrico, una simulación de jugo gástrico con los componentes de la dieta ecuatoriana promedio y una simulación de jugo gástrico con los componentes de la dieta occidental se presentan en la **Tabla 6**.



**Tabla 6.** Producción de AGCC en la matriz taxo en batido con leche (JTL) y taxo en jugo con agua (JTA) digeridos con un blanco de solución gástrica, dieta ecuatoriana y dieta occidental.

Blanco de solución gástrica																		
AGCC	Ácido acético		Ácido propiónico		Ácido isobutírico		Ácido butírico		Ácido isovalérico		Ácido valérico		Ácido isocaproico		Ácido caproico		Ácido heptanoico	
Matriz	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL
n	12	12	10	12	12	-	8	12	3	-	2	-	-	-	-	12	-	-
X± DE	395,8 ± 392,8	892,6 ± 243,4	9,5 ± 2,8	12,3 ± 4,6	7,9 ± 1,1		24,2 ± 11,1	44,2 ± 8,9	3,3 ± 0,23		2,7 ± 0,4					16,7 ± 1,6		
Min- Max	18,1- 902,6	623- 1507	5,3- 13,7	7,8- 24,5	5,6- 9,6		7,6- 36,4	33,3- 65,5	3,1- 3,5		2,4- 3,0					14,8- 18,8		
Dieta ecuatoriana																		
AGCC	Ácido acético		Ácido propiónico		Ácido isobutírico		Ácido butírico		Ácido isovalérico		Ácido valérico		Ácido isocaproico		Ácido caproico		Ácido heptanoico	
Matriz	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL
n	12	12	8	10	11	-	10	12	1	-	5	2	-	-	-	12	-	
X± DE	461 ± 427,1	739,5 ± 149,6	13,9 ± 7	23 ± 46,4	7,5 ± 3,2		21,2 ± 12,3	43,7 ± 14,8	*		3,1 ± 1,5	2,9 ± 0,5				21,4 ± 6,2		
Min- Max	16,3- 1040,9	487,3- 1027,3	5,7- 24,4	4,1- 154,9	4,3- 15		6,8- 35,2	21- 67,5	*		2,3- 5,8	2,5- 3,1				14,3- 32		
Dieta occidental																		
AGCC	Ácido acético		Ácido propiónico		Ácido isobutírico		Ácido butírico		Ácido isovalérico		Ácido valérico		Ácido isocaproico		Ácido caproico		Ácido heptanoico	
Matriz	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL	JTA	JTL
n	10	12	5	10	11		9	12	2	-	3	3	-	2	-	12	-	2
X± DE	313,7 ± 228,7	999,5 ± 86,9	6,1 ± 1,1	16,6 ± 3,4	8,1 ± 3,9		21,2 ± 12,3	41,8 ± 9,2	*		2,7 ± 0,12	2,7 ± 0,3		3,4 ± 0,6		18,1 ± 3		4 ± 1,2
Min- Max	5,7- 687,8	867,1- 1191,8	4,7- 7,5	6,1- 16,4	4,6- 16,1		5,2- 37,6	30,3- 54,9	*		2,6- 2,8	2,6- 3,1		3- 3,8		14,4- 23,6		3,1- 4,8

Para evaluar la ingesta de la matriz con un tipo de dieta específica, se compararon los resultados de AGCC a partir de la dieta ecuatoriana vs. la dieta occidental mediante un ttest de Student de dos colas con un nivel de significancia del 5% (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Valores de AGCC producidos para diferentes matrices de fruta (taxo en batido en leche vs taxo en jugo en agua) combinado con distinta dieta (ecuatoriana vs occidental)

<b>Matriz experimental: Taxo en batido con leche</b>					
<b>AGCC</b>		<b>n</b>	<b>X ± DE</b>	<b>95% IC</b>	<b>Valor P</b>
<b>Ácido acético</b>	<b>Dieta Ecuatoriana</b>	12	739,5 ± 149,55	(644,483; 834,523)	<0,001
	<b>Dieta Occidental</b>	12	999,5 ± 86,92	(944,233; 1054,690)	
<b>Ácido propiónico</b>	<b>Dieta Ecuatoriana</b>	10	23,0 ± 46,42	(-10,171; 56,241)	0,411
	<b>Dieta Occidental</b>	10	10,6 ± 3,43	(8,189; 13,098)	
<b>Ácido butírico</b>	<b>Dieta Ecuatoriana</b>	12	43,7 ± 14,76	(34,284; 53,039)	0,707
	<b>Dieta Occidental</b>	12	41,8 ± 9,17	(35,923; 47,575)	
<b>Ácido valérico</b>	<b>Dieta Ecuatoriana</b>	2	2,9 ± 0,48	(-1,470; 7,170)	0,759
	<b>Dieta Occidental</b>	3	2,7 ± 0,28	(2,051; 3,429)	
<b>Ácido caproico</b>	<b>Dieta Ecuatoriana</b>	12	21,4 ± 6,15	(17,455; 25,268)	0,118
	<b>Dieta Occidental</b>	12	18,1 ± 3,04	(16,212; 20,076)	
<b>Matriz experimental: Taxo en jugo con agua</b>					
		<b>n</b>	<b>X ± DE</b>	<b>95% IC</b>	<b>Valor P</b>
<b>Ácido acético</b>	<b>Dieta Ecuatoriana</b>	12	461,0 ± 427,10	(189,638; 732,374)	0,340
	<b>Dieta Occidental</b>	10	313,7 ± 228,73	(150,090; 477,332)	
<b>Ácido propiónico</b>	<b>Dieta Ecuatoriana</b>	8	13,9 ± 7,04	(7,974; 19,741)	0,036
	<b>Dieta Occidental</b>	5	6,2 ± 0,42	(4,839; 7,457)	
<b>Ácido isobutírico</b>	<b>Dieta Ecuatoriana</b>	11	7,5 ± 3,23	(5,369; 9,703)	0,702
	<b>Dieta Occidental</b>	11	8,1 ± 3,97	(5,468; 10,803)	
<b>Ácido Butírico</b>	<b>Dieta Ecuatoriana</b>	10	21,2 ± 12,30	(12,398; 29,991)	0,998
	<b>Dieta Occidental</b>	9	21,2 ± 12,30	(11,778; 30,645)	
<b>Ácido valérico</b>	<b>Dieta Ecuatoriana</b>	5	3,1 ± 1,51	(1,264; 5,004)	0,677
	<b>Dieta Occidental</b>	3	2,7 ± 0,12	(2,454; 3,026)	



En base a esta comparación, solamente la producción de ácido acético a partir de la matriz de taxo en batido con leche presentó una diferencia significativa entre la mezcla con la dieta ecuatoriana y occidental ( $p < 0.001$ ) siendo esta producción significativamente mayor en la dieta occidental (999,5 mg/L vs 739,5 mg/L, respectivamente).

Por otro lado, las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico en las dos matrices (taxo en batido con leche y taxo en jugo con agua) representaron el 90-95% de AGCC de mayor producción. Sin embargo, en la matriz de taxo en batido con leche se observó la presencia de ácido isocaproico lo cual denota la digestión de proteínas como producto de la desaminación de las proteínas contenidas en la leche. Las dos matrices recibieron un previo procesamiento mecánico (licuación, mezcla con otros ingredientes), por lo que hizo que exista la presencia de estos ácidos mayoritariamente. Comparando las matrices, la producción del ácido acético presenta una producción considerablemente mayor en la matriz taxo en batido con leche (877,2 mg/L vs 390,2 mg/L), que con respecto a la matriz taxo en jugo con agua respectivamente. Los ácidos propiónico y butírico también se encontraron en mayor producción en la matriz taxo en batido con leche.

En la producción de los AGCC intervienen una variedad de especies bacterianas que se encuentren en el individuo. Esta producción depende de la edad, las condiciones fisiológicas, la dieta, entre otros factores. Gracias a los diferentes macronutrientes que conforman la dieta, particularmente carbohidratos y proteínas, las bacterias colónicas generarán distintos perfiles de AGCC, de los cuales el acetato, propionato y butirato son los más importantes representando el 90-95% de todos los AGCC. El otro rango del 5-10% está conformado por isobutirato, valerato, isovalerato y hexanoato que se producen durante la fermentación de proteínas (Chover, 2011). En este estudio se comparó, en parte, la dieta tipo occidental y la dieta ecuatoriana. La dieta occidental es rica en grasas, azúcares y considerable en polisacáridos (Wu et al., 2011). Por el contrario, en la dieta ecuatoriana existe un consumo alto en carbohidratos, fibra y considerable en grasas, azúcares favoreciendo a la producción de AGCC. La fermentación de carbohidratos complejos en el colon por *Bacteroides spp.*, dan como productos finales de fermentación el acetato y el propionato (Donaldson et al., 2016).



Está científicamente demostrado que la estabilidad, estructura y actividad de la microbiota intestinal está relacionada con la selección de alimentos incorporados a la dieta (Delgado, 2012)(Díaz, Mayorga, Totosaus, & Pérez, 2012). En un estudio realizado en individuos alimentados con una dieta carnívora se observó una abundancia los microorganismos *Alistipes*, *Bilophila* y *Bacteroides*, junto con niveles bajos de *Firmicutes*, lo cual fue diferente a lo observado en individuos alimentados con vegetales que presentaron elevados niveles de *Firmicutes* debido al metabolismo de los polisacáridos presentes en los vegetales. Esto a su vez influye directamente sobre la producción de los diferentes AGCC en mayor o menor cantidad dependiendo del alimento consumido (Wu et al., 2011). Esto fue demostrado en un estudio comparativo entre la microbiota en niños africanos de aldeas rurales en Burkina Faso y en niños europeos. Los niños africanos que se alimentaban con una dieta tradicional rica en proteína animal, almidón, fibra y baja en grasas, presentaron una cantidad elevada de *Bacteroides*, *Prevotella* (capaces de fermentar xilanos y celulosa de la fibra) y niveles bajos de *Firmicutes*; mientras que, los niños europeos que se alimentaban con una dieta occidental típica presentaron niveles relativamente más bajos en cuanto a riqueza microbiana y por lo tanto menor cantidad de AGCC en comparación a los niños africanos. Apoyándose en estos resultados, se demuestra que la fibra en la dieta es esencial para la formación y diversidad de la microbiota intestinal, siendo aún más importante su papel al producir una mayor liberación de AGCC (De Filippo et al., 2011).



## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

La finalidad del presente trabajo de titulación fue optimizar y validar un método cromatográfico para el análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y su posterior aplicación para el análisis de AGCC en muestras de digerido intestinal *in-vitro*.

Se logró validar el método cromatográfico tomando en cuenta los parámetros instrumentales de linealidad, rango dinámico lineal, precisión intra-día, precisión inter-día, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) determinándose que el método es específico ya que, por medio de las curvas de calibración construidas para cada AGCC, no se presentó interferencias al momento de inyectar los blancos de muestra y muestras como tal. Por medio de la linealidad de las curvas de calibración se pudo obtener límites de detección y cuantificación suficientemente bajos como para detectar y cuantificar la presencia de AGCC en muy pequeñas cantidades, lo que garantiza su aplicabilidad en muestras biológicas. Todo esto asegura la confiabilidad y precisión, cumpliendo con los criterios de validación.

El método optimizado y validado GC-FID se aplicó en dos matrices (taxo en batido con leche y taxo en jugo con agua) para evaluar el contenido de AGCC en muestras de digerido intestinal *in-vitro* en referencia a la dieta ecuatoriana vs occidental. Concluyendo que la dieta occidental, hubo mayor producción de AGCC por los constituyentes presentes y se observó que en la matriz taxo en batido con leche la influencia del alimento más leche generó mayor producción de ácido acético en comparación con los demás AGCC.



## 4.2 Recomendaciones

Es de potencial interés que el Laboratorio de Alimentos y Nutrición VLIR siga con el estudio de la influencia de los diferentes alimentos ingeridos en diferentes condiciones (comunidades, dietas), aplicando el método cromatográfico GC-FID ya optimizado y validado por que podrían generar nuevas bases de datos, diferencias entre alimentos contribuyendo a diferentes investigaciones que actualmente están en proceso. Además de generar conocimiento con respecto a la producción de AGCC para que puedan continuar con los avances sobre la salud-nutrición del tracto gastrointestinal.





## BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo, G., Giraldo, N., Barrera, C., & Valdés, B. (2016). Microbiota intestinal y ácidos grasos de cadena corta en pacientes críticos. *Nutrición Humana*, 18.
- Albenberg, L. G., & Wu, G. D. (2014). Diet and the Intestinal Microbiome: Associations, Functions, and Implications for Health and Disease. *Gastroenterology*, 146, 1564–1572. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.058> (
- Alvarracín, J., & Henao, F. (2013). Impacto de tres dietas basadas en forrajes, sobre la producción de metano y ácidos grasos volátiles en producción de metano y ácidos grasos volátiles en bos taurus. Retrieved October 29, 2017, from <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v17n1/v17n1a07.pdf>
- Arango, L., & Duque, S. (2015). Desarrollo de la técnica de cromatografía de gases (GC-FID) para la determinación de contaminantes emergentes tipo productos farmacéuticos. Retrieved December 15, 2017, from <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/6152/66028423D946.pdf?sequence=1>
- Beaumont, M., Portune, K., Steuer, N., Lan, A., Cerrudo, V., Audebert, M., ... Blachier, F. (2017). Quantity and source of dietary protein influence metabolite production by gut microbiota and rectal mucosa gene expression: a randomized, parallel, double-blind trial in overweight humans. *The American Journal of CLINICAL NUTRITION*, 106. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.158816>
- Berruezo, R., Martinez, G., & Arques, V. (2011). Biodisponibilidad de los ácidos grasos de cadena corta. Retrieved from <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/9453>
- Brinkworth, G., Noakes, M., Clifton, P., & Bird, A. (2010). Comparative effects of very low-carbohydrate, high-fat and high-carbohydrate, low-fat weight-loss diets on bowel habit and faecal short-chain fatty acids and bacterial populations. *British Journal of Nutrition*, 101, 502–1493.
- Castillo, F., & Marzo, M. . (2017). Papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la



- esclerosis múltiple. *Elsevier*, 32. Retrieved from <http://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-295-articulo-papel-microbiota-intestinal-el-desarrollo-S0213485315001802>
- Chassard, C., Delmas, E., Robert, C., Lawson, P., Bernalier-Donadille, A., Chassard, C., ... Lawson, P. (2011). *Ruminococcus champanellensis* sp. nov., a cellulose-degrading bacterium from human gut microbiota. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 43–138.
- Chover, A. (2011). Marcadores bioquímicos de la ecología intestinal. In *Medicina Ortomolecular* (Editorial, p. 657). Alicante-España.
- COFENAT. (2017). Prebióticos y probióticos. Que son y para que sirven. Retrieved from <http://blog.aptn-cofenat.es/2017/03/prebioticos-y-probioticos-que-son-y.html>
- Coma, M. (2014). Determination of volatile fatty acids (VFA) from C2 to C8 from a liquid sample previously extracted in Diethyl Ether. *Ghent University*.
- Corzo, N., Alonso, J., Azpiroz, F., Calvo, M., Cirici, M., Leis, R., ... Clemente, A. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Redalyc*, 1, 99–118. Retrieved from <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.redalyc.org/pdf/3092/309238517015.pdf>
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poulet, J., & Massart, S. (2011). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Sciences*, 107, 14691–14696.
- Delgado, S. (2012). Microbiota intestinal humana: análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas. Retrieved November 18, 2017, from <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=11&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi3ydentMfXAhVDWCYKHQSBBGcQFghbMAo&url=http%3A%2F%2Fdigital.csic.es%2Fbitstream%2F10261%2F5220%2F1%2FTESIS%2520Susana%2520Delgado.pdf&usg=AOvVaw1VelbahWhZddpgaNP8>
- Derrien, M., Vaughan, E., Plugge, C., & De Vos, W. (2004). *Akkermansia municipihila*



- gen. nov., sp. nov., una bacteria degradante de mucina intestinal humana. *Revista Internacional de Microbiología Sistemática Y Evolutiva*, 54, 76–1469.
- Díaz, J., Mayorga, L., Totosaus, A., & Pérez, L. (2012). Parámetros cinéticos y perfil de ácidos grasos de cadena corta de bacterias ácido lácticas termotolerantes con diferentes fuentes de carbono parámetros cinéticos y perfil de ácidos grasos de cadena corta de bacterias ácido lácticas termotolerantes con dif. *Scielo*, 19, 253–260.
- Donaldson, G., Lee, M., & Mazmanian, S. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 20–32.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Estrada, O., Ariño, A., & Juañe, T. (2014). Validación de un método cromatográfico para la determinación de ácidos grasos libres en queso con automatización de la etapa de extracción de fase sólida (pp. 142–143). Retrieved from  
[https://citarea.cita-aragon.es/citarea/bitstream/10532/2831/1/2015\\_049.pdf](https://citarea.cita-aragon.es/citarea/bitstream/10532/2831/1/2015_049.pdf)
- European Communities. (2010). Commission Decsion. *Official Journal of the European Communities*, 17, 14–15.
- Gabert, L., Vors, C., Louche-Pélissier, C., Sauvinet, V., Lambert-Porcheron, S., & Drai, J. (2011). <sup>13</sup>C tracer recovery in human stools after digestion of a fat-rich meal labelled with [1,1,1-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]tripalmitin and [1,1,1-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]triolein. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25, 703.
- Gascó, L. (2011). *Optimización de las separaciones cromatográficas en fase gaseosa*. Madrid.
- Gómez, M., & Acero, F. (2011). Composición y funciones de la flora bacteriana intestinal. Retrieved from <http://repertorio.fucsalud.edu.co/pdf/vol20-02-2011/1-COMPOSICION.pdf>
- Guarner, F. (2016). El colon como órgano: hábitat de l flora bacteriana. Retrieved September 7, 2017, from <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3359.pdf>
- Hernández, M., & Sastre, A. (2010). *Tratado de nutrición: composición y calidad*



*nutritiva de los alimentos* (Médica Pan).

- Kamala, A., Ortiz, J., Kimanya, M., Haesaert, G., Donoso, S., Tiisekwa, B., & Meulenaer, B. (2015). Food Control. *Elsevier*, 54, 209–214.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.002>
- Laboratorio de Alimentos y Nutrición-VLIR. (2017). *Protocolo de análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por GC-FID*. Cuenca.
- Louis, P., & Flint, H. (2010). Diversity metabolism and microbial ecology of butyrateproducing bacteria from the human large intestine. In *Federation of European Microbiological Societies* (pp. 1–8).
- Marín, J., Pozo, L., Colina, G., Rincón, N., Behling, E., Díaz, A., & Fernández, N. (2007). *Optimización de un método para la determinación simultánea de H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> por cromatografía gas-sólido en biorreactores anaeróbicos*.
- Marti del Moral, A., Moreno, M., & Martínez, A. (2010). Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. *Nutrición Hospitalaria*, 18(Recuerado 7 de septiembre del 2017), 181–188. <https://doi.org/1699-5198>
- Olguin, L., & Rodriguez, H. (2004). Métodos de biotecnología: cromatografía de gases. Retrieved December 15, 2017, from [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia\\_de\\_gases.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_gases.pdf)
- Phenomenex. (2017). Zebron GC columns. Retrieved November 18, 2017, from <http://www.phenomenex.com/Products/Part/7HG-G009-11>
- Rincón, S., & Duque, V. (2014). Desarrollo de la técnica por cromatografía de gases (GC-FID) y extracción en fase sólida (SPE) para la determinación de contaminantes emergentes de tipo productos de cuidado personal. Retrieved October 23, 2017, from <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/4808/66028423R579.pdf;jsessionid=C3742153F2C6BDEFBCBE3BEEB7B1B0EF?sequence=1>
- Rodriguez, J. (2014). Estandarización y validación del método por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (GC- MS) para el análisis de 4



- benzodiazepinas y sus metabolitos en muestras biológicas de interés forense en el instituto nacional de medicina legal y ci. Retrieved from <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/4082/66028423R696.pdf?sequence=1>
- Rozenbloom, R., Fernandez, J., Gloor, G., & Wolever, T. (2014). Fatty, Evidence for greater production of colonic short-chain Humans, acids in overweight than lean. *Nature*, 2–3. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.46>
- Russell, W., & Duthie, G. (2011). influencias de los constituyentes de alimentos en la salud intestinal: metabolitos secundarios de plantas y salud intestinal: el caso de los ácidos fenólicos. *Actas de La Sociedad de Nutrición*, 70, 96.
- Schettino, B., Pérez, J., Gutiérrez, R., Vega, S., Faure, R., & Escobar, A. (2011). Análisis de la robustez en la determinación de ácidos grasos por cromatografía gaseosa en leche de cabra. *Revista de Salud Animal*. Retrieved November 18, 2017, from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2011000200003&lng=es&tIng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2011000200003&lng=es&tIng=pt).
- Scott, K., Silvia, W., Gratz, P., Sheridan, H., FLint, S., & Duncan. (2012). La influencia de la dieta en la microbiota intestinal. *Elsevier*, 60, 52.
- Scott, Dunca, & Flint. (2010). Fibra dietética y la microbiota intestinal. *Nutrición*, 33, 11–201.
- Tan, L., Zhao, X. ., Liu, X. ., Ju, H. ., & Li, J, S. (2005). Headspace Liquid-Phase Microextraction of Short-Chain Fatty Acids in Plasma, and Gas Chromatography with Flame Ionization Detection. <https://doi.org/10.1365/s10337-005-0604-x> 0009-5893/05/09
- Taverniers, I., Loose, M., & Bockstael, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Elsevier*, 23, 530–539. <https://doi.org/10.1016>
- Walker, A., Ince, J., Duncan, S., Webster, L., Holtrop, G., & Ze, X, y col. (2011). Dominante y grupos de bacterias que responden a la dieta dentro de la microbiota colónica humana. *ISME Journal*, 5, 30–220.



- Wu, G., Chen, J., Hoffman, C., Bittinger, K., Chen, Y., & Keilbaugh, S. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105–108. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>
- Zambrano, D., Lineth, S., Arango, R., & Leidy, J. (2015). Desarrollo de la técnica de cromatografía de gases (GC-FID) para la determinación de contaminantes emergentes tipo productos farmacéuticos. Retrieved October 23, 2017, from <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/6152>